



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

Geruza Rezende Paiva

**Células-tronco na neurorrafia látero-terminal.
Estudo experimental em ratos.**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Doutora em Bases Gerais da Cirurgia.

Orientador: Prof. Adj. Fausto Viterbo
Coorientadora: Profa. Adj. Elenice Deffune

**Botucatu
(2016)**

Geruza Rezende Paiva

**Células-tronco na neurorrafia látero-terminal.
Estudo experimental em ratos.**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de Botucatu, para obtenção do título de Doutora em Bases Gerais da Cirurgia.

Orientador: Prof. Adj. Fausto Viterbo

Coorientadora: Profa. Adj. Elenice Deffune

**Botucatu
(2016)**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Paiva, Geruza Rezende.

Células-tronco na neurorrafia látero-terminal : estudo experimental em ratos / Geruza Rezende Paiva. - Botucatu, 2015

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Fausto Viterbo

Coorientador: Elenice Deffune

Capes: 4010201

1. Células-tronco. 2. Tecido adiposo. 3. Rato como animal de laboratório. 4. Nervos periféricos. 5. Regeneração (Biologia).

Palavras-chave: Células-tronco; Nervos periféricos; Rato; Regeneração; Tecido adiposo.

Geruza Rezende Paiva

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Doutora em Bases Gerais da Cirurgia.

Células-tronco na neurorrafia látero-terminal. Estudo experimental em ratos.

Comissão Examinadora da Qualificação:

- 1) _____
Prof. Dr. Fausto Viterbo
Faculdade de Medicina de Botucatu - FMB - UNESP
- 2) _____
Profa. Dra. Maria Aparecida Custódio Domingues
Faculdade de Medicina de Botucatu - FMB - UNESP
- 3) _____
Prof. Dr. José de Anchieta de Castro e Horta Júnior
Instituto de Biociências - IB - UNESP
- 4) _____
Prof. Dr. Amilton Antunes Barreira
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - FMRP - USP
- 5) _____
Prof. Dr. Alexandre Leite Rodrigues Oliveira
Instituto de Biologia - UNICAMP
- 1) _____
Suplente: Profa. Dra. Selma Maria Michelin Matheus
Instituto de Biociências - FMB - UNESP
- 2) _____
Prof. Dr. Flávio Ramalho Romero
Suplente: Faculdade de Medicina de Botucatu - FMB - UNESP
- 3) _____
Prof. Dr. Marco Antônio Zanini
Suplente: Faculdade de Medicina de Botucatu - FMB - UNESP

Botucatu, janeiro de 2016.

Curriculum

Geruza Rezende Paiva formou-se em Medicina em 1997, na Universidade do Vale do Sapucaí (UNIVÁS), Pouso Alegre, Minas Gerais. Tornou-se Cirurgiã Geral pelo Programa de Residência Médica em Cirurgia Geral (1999) na mesma Universidade.

Obteve o título de Especialista em Cirurgia Plástica (2003), pelo programa de Cirurgia Plástica da Universidade Federal de São Paulo e pela Sociedade Brasileira de Cirurgia Plástica, recebendo o prêmio Farid Hakme pelo terceiro lugar no concurso nacional para esse título.

Concluiu o Mestrado em Cirurgia Plástica (2004), pela Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), São Paulo, com o trabalho: 99m Tc-fitato e 99m Tc-dextran 500 na linfocintilografia para biópsia de linfonodo sentinela em ratos.

Tornou-se professora assistente de Cirurgia da Universidade Federal de Rondônia em 2004, trabalho que exerceu até 2007. Trabalhou como cirurgiã plástica em reconstrução e fissura labiopalatal no programa do Hospital das Clínicas de Rio Branco, no Acre.

Tornou-se membro Titular da Sociedade Brasileira de Cirurgia Plástica em 2008, recebendo Menção Honrosa do Prêmio Nemer Chidid com o trabalho: Retalho musculocutâneo nasal ilhado para reconstrução de defeitos no nariz.

Nesse momento dedica-se à pesquisa de laboratório, no Programa de Doutorado em Bases Gerais da Cirurgia da Universidade Estadual de São Paulo - UNESP, Botucatu.

Dedicatória

A todos que me apoiaram.

Agradecimentos

Ao Professor Dr. Fausto Viterbo, pelas orientações, apoio e confiança. Por ser generoso, por dividir as conquistas e por levar a todos consigo. Obrigada.

À Professora Dra. Elenice Deffune por toda ajuda e por ser um dos maiores exemplos que encontrei. Obrigada.

A toda equipe do laboratório da Profa. Elenice pelo apoio.

À Professora Maria Aparecida Domingues pela ajuda, apoio e disponibilidade.

Ao amigo Fábio Oliveira Maciel pelo companheirismo.

Ao amigo Ednelson Henrique Bianchi pela ajuda incondicional.

Ao amigo Luis Carlos Edevalter Bardela pelo apoio tão importante.

Ao amigo José Lucas Carvalho não só pelas lâminas, mas por toda atenção.

Aos amigos Carlos Roberto Gonçalves de Lima, Carlos de Lalla, Danilo Cesar Borsatto e Danilo Chaguri por toda ajuda, amizade e força.

À secretária do programa de pós-graduação Marcia Fonseca Piagentini Cruz, pela ajuda sempre carinhosa.

Às secretárias Lilian Cristina Nadal Bianchi e Regina Célia Spadin pelo cuidado e atenção em todas as horas.

À FAPESP pelo apoio financeiro ao **projeto 2011/13112-6**.

À minha família, pelo apoio. À Bibi por esperar tanto.

Resumo

O tratamento das lesões em nervos periféricos normalmente constitui um desafio. Os resultados clínicos são pobres na maioria dos casos de lesões com perda da continuidade do axônio. Viterbo (1992) propôs a neurorrafia látero-terminal sem incisão do nervo doador, uma alternativa para a neurorrafia término-terminal. Novas pesquisas devem esclarecer porque são tão controversos os resultados experimentais e os da prática clínica entre os diversos autores sobre a neurorrafia látero-terminal. Muitos estudos têm buscado alternativas para alcançar melhores resultados no tratamento das lesões nervosas periféricas. A reposição de células, introdução de fatores neurotróficos e a introdução de células-tronco têm sido algumas das alternativas exploradas na literatura atual. Quanto às células-tronco ainda há muito a ser pesquisado, seja sobre o potencial regenerativo das células-tronco e suas fontes, formas de oferecimento dessas células no local da lesão ou como acompanhar a integração e confirmar a sobrevivência dessas células no local da injúria do nervo. Este estudo objetivou avaliar a influência de células-tronco mesenquimais provenientes do tecido adiposo na neurorrafia látero-terminal quanto à regeneração e reinervação periférica, por meio de estudo experimental em ratos. Foram estudados 150 animais, 140 animais dispostos em sete grupos, 10 outros animais foram necessários para se fazer o gel de plaquetas. Em um dos grupos a neurorrafia látero-terminal foi realizada com a interposição de células-tronco removidas do tecido adiposo do animal. Foram realizados testes de avaliação da marcha, estudo eletromiográfico, avaliação da força de contração muscular e exames de morfologia e morfometria de nervos e músculos após 180 dias do experimento. O grupo no qual se usou células-tronco apresentou valores semelhantes aos observados no grupo controle de normalidade quanto aos índices funcionais dos nervos ciático (pelo “CatWalk” e “Walking Track” respectivamente) e quanto ao número de fibras nervosas no nervo fibular comum.

Palavras-chave: células-tronco; tecido adiposo; nervos periféricos; regeneração nervosa; rato

Abstract

The treatment of peripheral nerve injuries is often a challenge. In most cases of injury with loss of continuity of the axon the clinical results are poor. Viterbo (1992) published the lateral-terminal neurorrhaphy without incision of the donor nerve, an alternative for the end-to-end neurorrhaphy. Further research should clarify why the experimental results and the clinical practice about the lateral-terminal neurorrhaphy are so controversial among the various authors. Many studies have sought for alternatives to achieve better results in the treatment of peripheral nerve injuries. The replacement of cells, the introduction of neurotrophic factors and the introduction of stem cells have been some of the alternatives explored in the literature. As for the stem cells, much remains to be searched, either on the regenerative potential of stem cells and their sources, offering forms of these cells at the injury site or on how to support the integration and confirm the survival of these cells at the site of the nerve injury. This study experimental study in rats aimed to evaluate the influence of stem cells from adipose tissue in the lateral-terminal neurorrhaphy focusing the regeneration and the peripheral reinnervation. 150 animals were studied, 140 animals arranged in seven groups, other 10 animals were needed to make the platelet gel. In one group the lateral-terminal neurorrhaphy was performed with the interposition of stem cells removed from the adipose tissue of the animal. Gait assessment tests, electromyographic study, evaluation of the muscle contraction force and histological examinations of the nerves and muscles after 180 days of the experiment were conducted and performed. The group which underwent the interposition of stem cells showed values similar to those seen in the normal control group as well as the functional indices of the common sciatic and peroneal nerves (the "Catwalk" and "Walking Track" respectively) and upon the number of nerve fibers in the common fibular nerve.

Keywords: stem cells; adipose tissue; peripheral nerves; nerve regeneration; mouse.

Lista de ilustrações

Figura 1 – A e B (grupo 1), A: nervos ciático, tibial e fibular comum 63 identificados, B: nervos dissecados. C e D (grupo 2), C: secção do nervo fibular comum, D: inversão e fixação do coto proximal na superfócie do músculo bíceps femoral. E e F (grupo 3), E: neurorrafia látero-terminal, F: neurorrafia sem tensão, outro exemplo. G e H (grupo 4), G: fásia removida, H: fásia envolvendo a neurorrafia látero-termnal.

Figura 2 – A e B (grupo 5), A: gel de plaquetas preparado em moedas ou 64 gotas. B: aspecto de neurorrafia látero-terminal no grupo 5, com o gel e recoberto pela fásia. C (grupo 6): gel de plaquetas sobre a neurorrafia, sem fásia. D, E, F e G (grupo 7), D: fásia sob a neurorrafia, E: gel de plaqueta contendo células-tronco, F: gel de plaquetas contendo células-tronco sobre a neurorrafia, G: aspecto da neurorrafia envolta pela fásia e gel de plaquetas contendo células-tronco.

Figura 3 - A: Controle, 7 dias de cultura. B: CTMs com meio osteogênico, 7 71 dias de cultura. C: CTMs com meio adipogênico, 7 dias de cultura. D: Controle corado, 14 dias de cultura. E: Células osteogênicas coradas com Alizarin Red, 14 dias de cultura. F: Células adipogênicas coradas com Oil Red, 14 dias de cultura. Aumento de 20X.

Figura 4 - A: posicionamento do animal na cápsula metálica. B: molde para 73 posicionamento do animal.

Figura 5 - A: animal percorrendo o corredor. B: impressão deixada no papel. 75

Figura 6 - A: corredor pelo qual o animal anda. B: imagem captada pela 77 câmara abaixo do corredor.

Figura 7 - Gráfico do número de eventos analisados, por citometria de fluxo, 84 na técnica de imunofenotipagem.

Figura 8 - Gráfico da média da intensidade de fluorescência (%) nas 33 85 amostras analisadas. Em azul os marcadores de padrão negativo e em vermelho os marcadores de padrão positivo.

Figura 9 - Gráfico da massa (g) dos animais no início (em azul) e no final do 87 experimento (em vermelho).

Figura 10 - Gráfico da massa (g) dos músculos tibiais craniais direito e 89 esquerdo.

Figura 11 - Gráfico da perimetria (mm) dos membros posteriores com o animal 91 acordado.

Figura 12 - Gráfico da perimetria (mm) dos membros posteriores com o animal anestesiado.	93
Figura 13 - Latência e amplitude com os nervos e neurografia mantidos conforme o experimento para cada grupo.	95
Figura 14 - Gráfico do teste eletrofisiológico com secção do nervo tibial, distal à neurografia.	97
Figura 15 - Gráfico do teste eletrofisiológico com secção dos nervos tibial e sural.	99
Figura 16 - Gráfico do índice funcional do nervo ciático com intervalos de 30 dias.	101
Figura 17 - Gráfico do índice funcional do nervo tibial com intervalos de 30 dias.	103
Figura 18 - Gráfico do índice funcional do nervo fibular comum com intervalos de 30 dias.	106
Figura 19 - Gráfico do índice funcional do nervo ciático, com 0,6 cm para medidas entre os dedos, analisado pelo “CatWalk”.	108
Figura 20 - Gráfico do índice funcional do nervo tibial, com 0,6 cm para medidas entre os dedos, analisado pelo “CatWalk”.	109
Figura 21 - Gráfico do índice funcional do nervo fibular comum pelo “CatWalk”.	110
Figura 22 - Gráfico da média (N) da força máxima de contração do músculo tibial cranial direito após estímulo direto no músculo tibial cranial direito ou no nervo fibular comum conforme o grupo.	119
Figura 23 – Músculos tibiais craniais. A e B (grupo 1, animal nº 27). C e D (grupo 2, animal nº 44). E e F (grupo 3, animal nº 64). A, C e E: músculos tibiais craniais esquerdos. B, D e F: músculos tibiais craniais direitos. A coloração usada foi hematoxilina e eosina (HE) e as imagens foram fotografadas com aumento de 20X (HE/20X). A barra nas figuras mostra a medida de 200µm.	120
Figura 24 – Músculos Tibiais Craniais. A e B (grupo 4, animal nº 98). C e D (grupo 5, animal nº 143). E e F (grupo 6, rato nº 124). G e H (grupo 7, animal nº 102). A, C, E e G: músculos tibiais craniais esquerdos. B, D, F e H: músculos tibiais craniais direitos. A coloração usada foi hematoxilina e eosina (HE) e as imagens foram fotografadas com aumento de 20X (HE/20X). A barra nas figuras mostra a medida de 200µm.	121
Figura 25 - Gráfico mostrando média (µm) do diâmetro mínimo das fibras	123

musculares dos músculos tibiais craniais, conforme o grupo, dos lados direito (experimento – em azul) e esquerdo (controle – em vermelho).

Figura 26 - Gráfico mostrando a média (μm) do perímetro das fibras musculares dos músculos tibiais craniais, conforme o grupo, dos lados direito (experimento – em azul) e esquerdo (controle – em vermelho). 125

Figura 27 - Gráfico mostrando a média (μm^2) da área das fibras musculares dos músculos tibiais craniais, conforme o grupo, dos lados direito (experimento - em azul) e esquerdo (controle - em vermelho). 127

Figura 28 – Nervos fibulares comum. A e B (grupo 1, animal nº 37), nervo fibular comum após a neurografia. C e D (grupo 2, animal nº 44), coto distal do nervo fibular comum. E e F (grupo 3, animal nº 71): nervo fibular comum após a neurografia. A, C e E: AT/10X. B, D e F: AT/40X. AT (azul de toluidina). 128

Figura 29 – Nervo fibular comum após a neurografia. A e B: grupo 4, animal nº 84. C e D: grupo 5, animal nº 153. E e F: grupo 6, animal nº 131. G e H: grupo 7, animal nº 101. A, C, E e G: AT/10X. B, D, F e H: AT/40X. AT: azul de toluidina. 129

Figura 30 - Gráfico do número de fibras nervosas no segmento N1 do nervo fibular comum. 130

Figura 31 - Gráfico mostrando a área da fibra nervosa (μm^2) do segmento N1 do nervo fibular comum. 132

Figura 32 - Gráfico mostrando o diâmetro mínimo (μm) do nervo fibular comum. 133

Figura 33 - Gráfico da área do axônio (μm^2) do segmento N1 do nervo fibular comum. 134

Figura 34 - Gráfico do diâmetro mínimo do axônio (μm) do segmento N1 do nervo fibular comum 135

Figura 35 - Gráfico da área da bainha de mielina (μm^2) do segmento N1 do nervo fibular comum. 136

Figura 36 - Gráfico da espessura da bainha de mielina (μm) do segmento N1 do nervo fibular comum. 137

Figura 37: Gráfico da razão G no segmento N1 do nervo fibular comum. 138

Figura 38 – Coto proximal do nervo fibular comum. A e B: grupo 2, animal nº 52. C e D: grupo 3, animal nº 66. E e F: grupo 4, animal nº 94. Figuras A, C e E: PB/1X. Figuras B e F: PB/10X. Figura D: PB/5X. 139

Figura 39 - Coto proximal do nervo fibular comum. A e B: grupo 5, rato nº 156. C e D: grupo 6, rato nº 126. E e F: grupo 7, rato nº 106. Figuras A, C e E: 140

PB/1X. Figura B: PB/10X. Figuras D e F: PB/5X.

Figura 40 - Imagens da neurografia (N3). A: animal 74, grupo 3, mostrando a transição da neurografia (HE/2X). B: observar a migração de axônios do nervo tibial para o nervo fibular comum e C: granuloma de fio de sutura (B: HE/5X, C: HE/20X). D: animal 72, grupo 4 (HE/2X). E: migração de axônios do nervo tibial para o nervo fibular comum direito e vascularização score 1 (HE/20X). As setas vermelhas indicam a direção da migração dos axônios. 141

Figura 41 - Imagens da neurografia (N3) mostrando a migração de axônios do nervo tibial para o nervo fibular comum e o aumento da vascularização peri neurografia látero-terminal. A e B: Grupo 4, animal 96. C e D: Grupo 5, animal 144. E e F: grupo 6, animal 126. G e H: grupo 7, animal 100. A, B, E e G: HE/2X. C, D, F e H: HE/10X. 142

Figura 42 - Imagens da neurografia (N3). A e B: animais 159, grupo 5, mostrando edema, vascularização e inflamação aumentados (Score 2 para edema, 1 para inflamação e 3 para vasos). C e D: animal 124, grupo 6, mostrando menor edema, menos inflamação e menor vascularização na neurografia (score 1 para edema, inflamação e vasos). A: HE/2X. C: HE/1X. B: HE/20X e D: HE/10X. 143

Figura 43 – Imagens de segmentos da neurografia (N3) coradas pelo S100 em animal nº 89, grupo 4. A: neurografia (IMH-S100/1X). B: S100 mais intenso no nervo fibular comum do que no nervo tibial (IMH-S100/10X). C: S100 no nervo fibular comum marcando células de Schwann (IMH-S100/40X). 144

Figura 44 - Imagens da neurografia (N3) coradas pelo S100 em animal nº 101 do grupo 7. A: neurografia (IMH-S100/1X). B: S100 mais intenso no nervo fibular comum do que no nervo tibial (IMH-S100/5X). C: marcador S100 no nervo fibular comum marcando células de Schwann (IMH-S100/40X). 145

Figura 45 - Imagens da neurografia (N3) coradas pelo CD90 em animal nº 101 do grupo 7. A: neurografia (IMH-CD90/X). B: nervo fibular comum com acúmulo do marcador CD90 (IMH-CD90/10X). C: os vasos não se coram pelo CD90 (IMH-CD90/ 20X). D, E e F: algumas células marcadas, D: IMH-CD90/20X), E e F: IMH-CD90/40X. 146

Figura 46 - Imagens da neurografia (N3), em animal nº 89 do grupo 4 coradas pelo CD 105. A: IMH-CD105/2X. B e C: maior intensidade do marcador no nervo fibular comum quando comparado ao nervo tibial, IMH-CD105/5X. D: vaso NÃO marcado pelo CD105 no nervo fibular comum direito, IMH-CD105/40X. E: vasos marcados pelo CD105 dentro do nervo fibular comum, IMH-CD105/40X. 147

Figura 47 – A: Imagens da neurografia (N3), em animal nº 101 do grupo 7, marcadas pelo CD34. A: neurografia (IMH-CD34/1X). B: maior intensidade do 148

marcador no nervo fibular comum quando comparado ao nervo tibial (IMH-CD34/20X). C: vasos marcados pelo CD34 no nervo fibular comum direito (IMH-CD34/40X). D: vasos marcados na periferia da neurorrafia, (IMH-CD34/40X). E: vasos marcados na periferia da neurorrafia, (IMH-CD34/20X).

Lista de quadros

Quadro 1 - Grupos de 1 a 7 e suas variações.	62
Quadro 2 - Padrão negativo e positivo dos diferentes marcadores de superfície usados na imunofenotipagem por citometria de fluxo das células-tronco mesenquimais obtidas.	69
Quadro 3 - Padrão de reatividade das células linfó mononucleares de rato frente a diferentes marcadores de superfície (CDs), pela técnica de citometria de fluxo.	70
Quadro 4 - Especificações dos anticorpos utilizados:	80
Quadro 5 - Avaliação percentual da expressão dos diferentes marcadores utilizados, CD11b, CD31, CD34, CD40, CD44, CD45, CD71, CD73, CD90, CD105 e CD105 nas amostras de 33 animais estudados, segundo o nível de expressão destes marcadores.	85

Lista de tabelas

Tabela 1 - Peso da gordura removida da região inguinal, número de células e a viabilidade das células em cada amostra de animal do grupo 7.	83
Tabela 2 - Massa (g) dos animais antes e após o experimento.	86
Tabela 3 - Massa (g) dos músculos tibiais craniais direito e esquerdo.	88
Tabela 4 - Perimetria (mm) dos membros posteriores com o animal acordado.	90
Tabela 5 - Perimetria (mm) dos membros posteriores com o animal anestesiado.	92
Tabela 6 - Teste eletrofisiológico com os nervos e neurorrafia mantidos.	94
Tabela 7 - Teste eletrofisiológico com secção do nervo tibial, distal à neurorrafia.	96
Tabela 8 - Teste eletrofisiológico com secção dos nervos tibial e sural.	98

Tabela 9 - Índice funcional do nervo ciático.	100
Tabela 10 - Índice funcional do nervo tibial.	102
Tabela 11 - Índice funcional do nervo fibular comum.	105
Tabela 12 - Índice funcional do nervo ciático.	107
Tabela 13 - Índice funcional do nervo tibial.	107
Tabela 14 - Índice funcional do nervo ciático, com 0,6 cm para medidas entre os dedos, analisado pelo “CatWalk”.	108
Tabela 15 - Índice funcional do nervo tibial, com 0,6 cm para medidas entre os dedos, analisado pelo “CatWalk”.	109
Tabela 16 - Índice funcional do nervo fibular comum, com 0,6 cm para medidas entre os dedos, analisado pelo “CatWalk”.	110
Tabela 17 - Índice de regularidade.	111
Tabela 18 - Intensidade máxima da pegada completa.	111
Tabela 19 - “Stand” ou fase de apoio, traduz a sequência de passos normais.	112
Tabela 20 - “Stand index” ou índice da fase de apoio.	112
Tabela 21 - “Print area” ou área de contato, é a área de impressão da pegada.	112
Tabela 22 - “Max contact area” (cm ²) ou área do contato máximo.	113
Tabela 23 - “Max contact max intensity” ou intensidade máxima no contato máximo.	113
Tabela 24 - “Max contact mean intensity” ou intensidade média no contato máximo.	113
Tabela 25 - “Swing” (s): tempo sem contato da pata com o vidro.	114
Tabela 26 - “Swing speed” (cm/s) velocidade da fase do “swing”.	114
Tabela 27 - “Stride length” (cm) ou distância de pegadas de uma mesma pata.	114
Tabela 28 - “Step cycle” (s) ou tempo em segundos entre dois contatos da mesma pata.	115
Tabela 29 - “Duty cycle” (%), expressa a fase de apoio como porcentagem do ciclo de passos.	115
Tabela 30 - “Print positions”.	116

Tabela 31 - “Base of suport”.	117
Tabela 32 - Média (N) e mediana da força máxima de contração do músculo tibial cranial com o estímulo feito no nervo fibular comum ou no próprio músculo.	118
Tabela 33 - Média (μm), desvio padrão, mediana, valor mínimo e máximo do diâmetro mínimo das fibras musculares do músculo tibial cranial direito e esquerdo nos animais dos grupos 1 a 7.	122
Tabela 34 - Média (μm), desvio padrão, mediana, valor mínimo e máximo do perímetro das fibras musculares do músculo tibial cranial dos lados direito e esquerdo nos animais dos grupos 1 a 7.	124
Tabela 35 - Média (μm^2), desvio padrão, mediana, valor mínimo e máximo da área das fibras musculares do músculo tibial cranial dos lados direito e esquerdo nos animais dos grupos 1 a 7.	126
Tabela 36 - Número de fibras nervosas no segmento N1 do nervo fibular comum.	130
Tabela 37 - Área da fibra nervosa (μm^2) do segmento N1 do nervo fibular comum.	132
Tabela 38 - Diâmetro mínimo (μm) da fibra nervosa do segmento N1.	133
Tabela 39 - Área do axônio (μm^2) do segmento N1 do nervo fibular comum.	134
Tabela 40 - Diâmetro mínimo do axônio (μm) do segmento N1 do nervo fibular comum.	135
Tabela 41 - Área da bainha de mielina (μm^2) do segmento N1 do nervo fibular comum.	136
Tabela 42 - Espessura da bainha de mielina (μm) do segmento N1.	137
Tabela 43 - Razão G (diâmetro do axônio/ diâmetro da fibra nervosa) em N1.	138
Tabela 44 - Intensidade e extensão dos anticorpos S100, CD90, CD34 e CD105.	149
Tabela 45 - Comparação entre os grupos de 3 a 7 quanto aos quesitos hemorragia, edema, inflamação e presença de vasos no segmento N3.	151
Tabela 46 - Comparação entre os grupos de 3 a 7 quanto ao quesito granuloma no segmento N3.	152

Lista de quadros do Apêndice

Quadro 1 – Resumo de resultados de massa dos animais, dos músculos tibiais craniais e perimetria do membro posterior direito.	223
Quadro 2 – Resumo dos resultados da eletroneuromiografia.	223
Quadro 3 – Resumo dos índices funcionais dos nervos ciático, tibial e fibular pelo “Walking Track” e “CatWalk” e da força de contração do músculo tibial cranial direito com estímulos no nervo e no próprio músculo.	224
Quadro 4 – Resumo das avaliações histológicas feitas nas fibras musculares do músculo tibial cranial direito e esquerdo.	224
Quadro 5 - Resumo das avaliações histológicas feitas no segmento distal à neurorrafia do nervo fibular comum direito (N1).	225
Quadro 6 – Resumo das avaliações histológicas por imunoistoquímica e HE feitas na área da neurorrafia (N3).	225
Quadro 7: Resumo das tabelas e dados mais relevantes.	226
Quadro 8 - Marcadores adquiridos para Imunofenotipagem das células tronco, por citometria de fluxo versus marca, concentração, nº de catálogo, lote, classe da imunoglobulina e data de vencimento.	227
Quadro 9 - Características da cola de fibrina versus gel de plaquetas obtidos por lisado plaquetário.	227

Sumário

1. Introdução	20
1.1 Lesão em nervos periféricos	22
1.2 Degeneração e regeneração em nervos periféricos	23
Alterações histológicas	23
1.3 Reparação nervosa periférica	25
Neurorrafia	25
Neurorrafia término-terminal	26
Neurorrafia látero-terminal	27
Enxerto de nervo	36
Neurotização	36
Condutores e tubos na regeneração nervosa	38
1.4 Fatores neurotróficos	40
1.5 Engenharia de tecidos e células-tronco	43
Células-tronco	44
Células-tronco embrionárias e adultas	45
Células-tronco mesenquimais	46
1.6 Células-tronco na regeneração de nervos	49
1.7 Estudos recentes e justificativa	59
2. Objetivo	61
3. Método	62
3.1 Organização dos grupos	62
3.2 Obtenção das células-tronco mesenquimais e gel de plaquetas	66
3.3 Avaliações realizadas em cada animal	73
3.3.1 Massa dos animais no início e no final do experimento	73
3.3.2 Massa dos músculos tibial cranial direito e esquerdo	73
3.3.3 Perimetria dos membros posteriores direito e esquerdo	73
3.3.4 Estudo eletrofisiológico dos músculos tibial cranial direito	74

3.3.5 Avaliação da marcha pelo teste de “Walking Track”	75
3.3.6 Avaliação da marcha pelo teste de “CatWalk”	77
3.3.7 Força máxima de contração do músculo tibial cranial	78
3.3.8 Coleta das amostras e análise histológica e morfométrica	79
3.4 Análise estatística	83
4. Resultados	84
4.1 Sobre as células-tronco retiradas da gordura inguinal	84
4.2 Massa dos animais no início e no final do experimento	87
4.3 Massa dos músculos tibial cranial direito e esquerdo	89
4.4 Perimetria dos membros posteriores direito e esquerdo	91
4.5 Estudo eletrofisiológico do músculo tibial cranial direito	95
4.6 Avaliação da marcha pelo teste de “Walking Track”	101
4.7 Avaliação da marcha pelo teste de “CatWalk”	108
4.8 Força máxima de contração do músculo tibial cranial	119
4.9 Análise histológica e morfométrica de músculos e nervos	121
4.9.1 Morfologia e morfometria dos músculos tíbias craniais	121
4.9.2 Histologia e morfometria do nervo fibular comum – N1	129
4.9.3 Histologia e morfometria do nervo fibular comum – N2	140
4.9.4 Histologia e morfometria da neurorrafia – N3	142
5. Discussão	154
4.1 Método	154
4.2 Neurorrafia látero-terminal	158
4.3 A escolha das células tronco mesenquimais da gordura	159
4.4 Massa inicial e final dos animais	166
4.5 Massa dos músculos tibial cranial direito e esquerdo	166
4.3 Perimetria dos membros posteriores direito e esquerdo	169
4.4 Estudo eletrofisiológico do músculo tibial cranial direito	171
4.5 Avaliação da marcha pelo teste de “Walking Track”	175
4.6 Avaliação da marcha pelo teste de “CatWalk”	181

4.7 Força máxima de contração do músculo tibial cranial	190
4.8 Análise histológica e morfométrica de músculos e nervos	193
6. Conclusão	208
7. Referências	209
8. Apêndice	226
9. Anexo	231

1 Introdução

As lesões de nervos periféricos são um desafio na prática médica há muito tempo. O tratamento é extensamente discutido e fonte de diversos estudos clínicos e experimentais (Lundborg, 1987; Jonhson et al., 2008; Walsh e Midha, 2009).

Bons resultados são vistos nos casos em que não há lesão direta ou secção do nervo. Frequentemente, nas secções completas, os resultados funcionais são frustrantes para médicos e pacientes, mesmo quando há regeneração e crescimento do axônio lesado (Chen et al., 2006; Colomé et al., 2008; Walsh e Midha, 2009). A dificuldade em se encontrar bons resultados é mais comum quando a neurografia é protelada e nos casos em que a lesão está distante do órgão-alvo (Lundborg e Swedenn, 2000; Walsh e Midha, 2009).

Profissionais de diversas áreas se envolveram na busca de alternativas terapêuticas para estas lesões, estudando a fisiopatologia das lesões nervosas periféricas com o intuito de promover a regeneração destes nervos e a recuperação funcional (Radtke et al., 2009). Deve-se destacar que recentemente surgiu o conceito de Medicina Regenerativa, que consiste na utilização de células, fatores de crescimento e biomateriais com o intuito de reparar tecidos lesados (Oliveira et al., 2006; Colomé et al., 2008).

É importante salientar que hoje a grande arma da medicina regenerativa é a célula-tronco, fonte de inúmeros estudos. Nesse sentido, após uma revisão sobre diversos aspectos da aplicação de células-tronco e da medicina regenerativa, Oliveira et al. (2006) concluem que, embora o uso de células-tronco para a regeneração ou reparo de tecidos seja uma área muito promissora na pesquisa biomédica, algumas importantes questões merecem estudo. Essas questões incluem: o estudo de quais as melhores estratégias para direcionar as células-tronco na diferenciação em células do tecido a ser regenerado, o desenvolvimento de técnicas para o cultivo em larga escala das células-tronco, a determinação da eficácia das várias técnicas de transplante destas células, a caracterização das propriedades das células-tronco e a resolução de questões bioéticas quanto ao uso de células-tronco embrionárias.

Quanto às lesões traumáticas de nervos, as células-tronco poderiam repor os neurônios motores e/ ou sensitivos ou incrementar a população de células de

Schwann, tornando a regeneração de axônios mais eficiente. Embora a maioria dos estudos com células-tronco ainda seja experimental, é possível acreditar que o tratamento de um paciente portador de lesão traumática de nervos incluirá o uso de células-tronco em um futuro não muito distante (Martins e Siqueira 2005).

A maioria das pesquisas sobre células-tronco e regeneração nervosa periférica tem observado a diferenciação de células-tronco em células de Schwann ou células tipo Schwann (Martins e Siqueira, 2005; Pan et al., 2006; Chen et al., 2006; Braga-Silva et al., 2006; Chen et al., 2007; Johnson et al., 2008; Arino et al., 2008; Lago et al., 2009; Walsh e Midha, 2009).

Logo após uma lesão periférica, as células de Schwann deixam de ser produtoras de mielina para tornarem-se o suporte na fase inicial de desnervação. As células de Schwann são fonte de fatores neurotróficos, moléculas de adesão e citocinas que darão suporte à regeneração axonal, além de recrutarem outras células para o local da lesão, como os macrófagos. No entanto, a menos que o contato entre os axônios seja restabelecido, este suporte não se mantém (Walsh e Midha, 2009).

Dado que as células de Schwann podem tornar-se hipofuncionantes, uma medida lógica é dar suporte ao coto distal, melhorando as condições locais e substituindo células hospedeiras por células exógenas. Algumas células-tronco têm sido pesquisadas a fim de serem aplicadas na regeneração nervosa periférica. As células-tronco mais promissoras são aquelas derivadas de pele, medula óssea e tecido adiposo. Todas têm mostrado capacidade de tornarem-se células tipo Schwann (Walsh e Midha, 2009).

Embora muitas células-tronco tenham mostrado potencial de auxílio na regeneração nervosa periférica, há necessidade de aperfeiçoar esta terapia para o uso clínico (Walsh e Midha, 2009). Para o uso de células de Schwann autólogas seria necessário dispor de outro nervo do mesmo paciente e cultivar estas células para obter número suficiente e então transplantá-las ao local da lesão nervosa, o que demandaria muito tempo e aumentaria o tempo de desnervação da zona atingida. As células-tronco seriam uma boa opção como fonte de células que se tornariam tipo Schwann.

Os estudos atuais têm se empenhado em avaliar o potencial de células-tronco de diversas fontes na regeneração nervosa periférica, procurando desvendar seu mecanismo de ação, com ênfase na praticidade e facilidade de obtenção. Tem-se

buscado a expansão rápida destas células em cultura, sempre atentando para a possibilidade de teratogenicidade.

1.1 Lesão em nervos periféricos

Os nervos possuem um limite de distensibilidade, caso esse limite seja ultrapassado, haverá dano como a perda da sensibilidade e/ ou motricidade do território por ele innervado (Weinstein e Hering, 1992). Dentre as classificações para lesões de nervos periféricos, as mais usadas são as de Seddon (1943) e de Sunderland (1968).

Seddon (1943) dividiu as lesões nervosas em três graus: neuropraxia, axoniotmese e neurotmese. Na neuropraxia ou lesão leve, não há alteração na estrutura do axônio, pois a lesão se restringe à bainha de mielina, com grandes chances de regeneração. A neuropraxia caracteriza-se por desmielinização segmentar das fibras de grande calibre. Normalmente decorrente de uma compressão, o axônio é preservado e não há degeneração nervosa distal (Seddon, 1943; Siemionow e Sonmez, 2007). Espera-se que a recuperação se dê espontaneamente em dias ou semanas conforme a extensão atingida (Seddon, 1943; Lundborg, 1987).

Na axoniotmese há perda da continuidade do axônio (lesão do axônio e da bainha de mielina), mas o tubo neural permanece íntegro (o endoneuro permanece íntegro), o que implica em degeneração walleriana distal, mas com potencial para recuperação adequada e espontânea devido à manutenção do endoneuro. Na fase aguda, o quadro é semelhante à neuropraxia, chamado de pseudobloqueio de condução, entretanto após o quinto dia da lesão, os potenciais motores e sensoriais tornam-se anormais distalmente à lesão. Após a segunda semana, os potenciais de desnervação começam a surgir em grande quantidade. Quando a regeneração começa a acontecer, a amplitude dos potenciais de ação motores começa a melhorar e potenciais de reinervação podem ser vistos na eletromiografia como contração voluntária. Exemplos são as neuropatias compressivas crônicas, neuropatias secundárias à tração e as lesões nervosas secundárias às fraturas ósseas. A recuperação é muito mais demorada comparada à neuropraxia e na maioria das vezes é incompleta (Seddon, 1943; Lundborg, 1987).

Na neurotmese há transecção total do nervo, o que implica em degeneração axonal severa quando as extremidades nervosas separadas não são unidas cirurgicamente. A recuperação funcional da área afetada somente será possível através de intervenção cirúrgica e o resultado será limitado (Seddon, 1943; Lundborg, 1987; Siemionow e Sonmez, 2007).

Sunderland (1968) propôs outra classificação. Segundo este autor, a lesão tipo I (correspondente à neuropraxia de Seddon) é aquela na qual apenas a bainha de mielina é lesada, com o axônio íntegro. A recuperação, nesse caso, ocorre em semanas ou meses. Na lesão tipo II (correspondente à axoniotmese), o axônio foi lesado, mas pode-se observar o endoneuro preservado. Nas lesões tipo III o endoneuro está envolvido na lesão; na lesão tipo IV, o perineuro; e na lesão tipo V, o epineuro está lesado (Sunderland 1968; Lundborg, 1987). O tipo III correspondente juntamente com a IV e V à neurotmese de Seddon.

Além das lesões já citadas, foi proposta mais um tipo de lesão, a lesão tipo VI, que seria a combinação de várias lesões descritas anteriormente (Mackinnon, 1989). E quando ocorre a neurotmese ou secção do nervo inicia-se um processo de tentativa de regeneração.

1.2 Degeneração e regeneração em nervos periféricos

Alterações histológicas

Waller (1850, apud Koeppen 2004) descreveu as mudanças degenerativas que ocorrem no coto distal de um nervo periférico lesado e chamou de degeneração Walleriana.

Logo após a secção do nervo a mielina começa a degenerar, axônios e debris de mielina são fagocitados por macrófagos e células de Schwann. Esse processo pode levar desde uma semana a muitos meses. As células de Schwann se tornam mais ativas em 24 horas, com aumento da taxa de mitose, além da ampliação do núcleo e do citoplasma. As mesmas mudanças ocorrem no coto proximal do nervo, com intensidade proporcional à da lesão (Siemionow e Sonmez, 2007).

No coto distal do axônio seccionado inicia-se um processo autolítico caracterizado pela tumefação e lise mitocondrial, desintegração de microtúbulos e neurofilamentos, intumescimento axoplasmático e fragmentação do axônio. Os

remanescentes do axônio são fagocitados por macrófagos. A área de contato sináptica é invadida por células de Schwann produtoras de fatores neurotróficos que influenciarão na sobrevivência do neurônio e crescimento do axônio vindo do coto proximal (Lundborg, 1987; Lundborg & Swedenn, 2000).

Segundo Jiao et al. (2009) as células de Schwann presentes no coto distal, multiplicam-se e mudam seu fenótipo para que possam preparar o meio ambiente local e favorecer a regeneração dos axônios lesados, mas este suporte não é mantido por tempo indefinido e decresce à medida que o tempo de desnervação aumenta. Este fenômeno ocorre provavelmente pela redução do número de células de Schwann que sobrevivem e pela deterioração dos fatores que permitiram condicionamento do meio, por diversas razões locais. Os autores conseguiram observar reinervação após seis meses de desnervação em modelo experimental e discutem se tentativas de reinervação tardias seriam realmente desaconselháveis.

No coto proximal, o axônio se degenera até o primeiro nodo de Ranvier proximal à lesão, em seguida emite brotos que progridem em direção ao coto distal. Segundo Ferreira (1999), a mielina fragmenta-se no dia seguinte ao da lesão retraindo-se a partir dos nodos de Ranvier e, cerca de 48 horas após a lesão, já existe fragmentação do axônio.

Os axônios, a partir do nodo de Ranvier mais proximal, iniciam uma tentativa de crescimento, emitindo ramificações que vão ao encontro do coto distal, continuando seu crescimento ao longo das bandas de Büngner. Fato que não ocorre em lesões com degeneração avançada, já que nesses casos as estruturas endoneurais não respondem (Da-Silva, 1995; Royttä & Salonen, 1988).

As bandas de Büngner são formadas pelas células de Schwann que se dividem e se organizam no interior de tubos de membrana basal, de forma linear, (Lundborg, 1987; Ferreira, 1999; Rodrigues e Silva, 2001).

E análises bioquímicas e estruturais mostraram que as células de Schwann em contato com axônios estão aptas para gerar uma lâmina basal e colágeno fibroso (Bunge, 1987). A estrutura da lâmina basal das células de Schwann serve como conduto eficaz para o desenvolvimento, manutenção e maturação dos axônios em regeneração (Walsh e Midha, 2009).

Desta forma, o coto proximal emite numerosas expansões filiformes (cones de crescimento), esses brotos axonais são prolongamentos protoplasmáticos que atravessam o segmento lesado. Os brotos dos axônios em regeneração invadem o

coto distal e a estrutura prévia volta a se estabelecer entre o axônio e as células de Schwann que produz novamente a mielina, depois disso, os vasos sanguíneos e os envoltórios dos nervos se restabelecem (Bunge, 1987; Toby et al., 1996; Lundborg e Swedenn, 2000).

Todo esforço é feito para que o neurônio não degenere e alguns fatores são importantes para a sobrevivência do neurônio, como a idade do paciente, o tipo de neurônio lesado, o tipo de lesão e a distância da lesão ao órgão-alvo. Quanto à idade, sabemos que os mais jovens têm, em geral, melhores resultados funcionais e que a idade talvez seja o fator mais importante na qualidade da recuperação sensorial. Quanto ao tipo de neurônio, os motores espinhais são os mais resistentes em comparação aos neurônios espinhais sensitivos e cranianos. Enquanto na neuropraxia e axoniotmese o tratamento é conservador, na neurotmese a correção será cirúrgica (Lundborg e Sweden, 2000).

Pode-se afirmar que quanto maior o tempo entre a lesão e a reinervação muscular, pior a recuperação funcional. Estudos em primatas apontam que o tempo entre a lesão e a terapêutica não deve ser maior que 100 dias (Lykissas et al., 2007). Permanece o conceito de que a neurorrafia, quando indicada deve ser o mais precoce possível (Ballance, 1903).

Inúmeras técnicas foram introduzidas e aprimoradas no intuito de promover a regeneração do nervo e recuperação funcional dos músculos acometidos.

1.3 Reparação Nervosa Periférica

Neurorrafia

Segundo Jiao et al. (2009) na axoniotmese está estabelecido que a demora na correção cirúrgica diminui a chance de reinervação e restituição da função do axônio lesado. Os resultados ruins são atribuídos ao tempo prolongado de axoniotomia, degeneração crônica do coto distal e longo tempo de desnervação com atrofia do músculo correspondente. Segundo os autores, em ortopedia e neurologia, não se esperam resultados satisfatórios para lesões de nervos cuja terapêutica cirúrgica tenha sido protelada por mais de um ano, embora exista a descrição de casos que repudiam esta afirmação.

Sempre que houver secção nervosa, os cotos devem ser mantidos alinhados, por sutura, preferencialmente. Quando os cotos proximal e distal não são alinhados e reparados, há formação de um neuroma, definido por um conjunto de fibras nervosas em regeneração e tecido conjuntivo, demonstrando desorganização local (Lundborg, 1987).

Segundo Lundborg e Sweden (2000), a neurorrafia deve ser feita o quanto antes e o alinhamento deve ser o melhor possível. Os autores acreditam que o bom alinhamento dos cotos seja suficiente (rafia do epineuro), caso haja uma diferenciação na topografia, o alinhamento dos fascículos é recomendado. Quando há diferenciação entre fascículos motores e sensitivos, o alinhamento dos fascículos também é recomendado.

A neurorrafia deve ser feita por meio de magnificação da imagem, usando-se técnicas microcirúrgicas de forma atraumática. A sutura deve ser realizada sem tensão e o mais precocemente possível. Quando necessário, deve-se lançar mão de enxertos e/ ou condutores. Deve-se usar fio o menos reacional possível, como o náilon, e fino, como 9.0 ou 10.0. (Braun, 1982; Lundborg, 1987; Toby et al., 1996; Lundborg e Sweden, 2000; Jiao et al., 2009).

Neurorrafia término-terminal

Segundo Moraes (2009), a primeira neurorrafia foi realizada por William de Saliceto (1210 a 1277), em Bolonha. A neurorrafia término-terminal é a forma de neurorrafia classicamente indicada quando estão presentes os dois cotos, proximal e distal.

Babcock definiu os princípios da neurorrafia em 1927, declarou que os melhores resultados para a regeneração nervosa são alcançados através da sutura término-terminal das bainhas nervosas. Este conceito é compartilhado por autores atuais (Sunderland, 1968; Braun, 1982; Lundborg, 1987; Liu et al., 1999; Cederna et al., 2001; Piskin et al., 2009).

A neurorrafia término-terminal é a neurorrafia direta, realizada suturando-se os cotos para a passagem das fibras em regeneração do coto proximal para o distal, pode ser feita através de suturas epineurais, perineurais ou epiperineurais.

A sutura epineural é facilmente realizada e proporciona menor trauma ao nervo, posto que as fibras nervosas e o tecido conjuntivo, rico em vasos que circundam o perineuro, não precisam ser manipulados. Evitam-se, então, lesões da estrutura nervosa, há menor reação inflamatória e consequentemente menor formação de tecido cicatricial (Braun, 1982).

A neurorrafia término-terminal perineural pretende proporcionar melhor alinhamento entre os fascículos quando comparada à epineural (Bora, 1967; Braun, 1982; Stopiglia e Erhart, 1987; Millesi, 1981). Segundo Bora (1967), esta técnica apresenta a desvantagem de causar lesões no suprimento vascular do nervo devido à manipulação de tecido junto dos fascículos.

Rouleau et al. (1981) realizaram estudo experimental em gatos, seccionando o ramo orbicular do nervo facial e realizando sutura nervosa epineural e perineural para compará-las. Concluíram que a sutura epineural trouxe melhores resultados quanto à histologia, mas não quanto aos resultados clínicos. Já Lundborg (1987), em estudos comparando as neurorrafias término-terminais epineurais e perineurais, não encontrou diferenças significativas.

Neurorrafia látero-terminal

Em algumas ocasiões, o coto proximal do nervo lesado não está presente, como nas avulsões ou ressecções por câncer. Na impossibilidade da neurorrafia término-terminal, desenvolveu-se técnica na qual se sacrificava um nervo de menor comprometimento funcional (motor ou sensitivo) para a neurorrafia término-terminal. Um exemplo é a neurorrafia do coto distal do nervo facial lesado ao coto proximal do nervo hipoglosso, com comprometimento da região innervada pelo nervo hipoglosso.

Os primeiros relatos sobre neurorrafia término-lateral são de Ballance et al. (1903). Nesta publicação, os autores relatam que em 1895, no St. Thoma's Hospital, realizou-se a união do nervo facial ao nervo espinhal acessório para alívio da paralisia facial resultante à doença auricular. Nessa publicação, relatam que em 1899, Kennedy seccionou o nervo facial para espasmo facial e uniu-o ao espinhal acessório (junção término-lateral). O espasmo foi curado e notáveis movimentos livres da face ocorreram ao movimentar-se o ombro.

Em janeiro de 1903, Ballance uniu o nervo facial ao hipoglosso (junção término-lateral), mas o resultado não pode ser determinado ainda por alguns meses. Recomendou-se, portanto, o procedimento para paralisias faciais de longa data. Neste mesmo ano, Harris (1903) publicou o emprego da neurorrafia término-lateral para tratamento de lesão de plexo braquial.

O maior empecilho era a lesão do nervo doador. Isso acontecia, pois não só se abria o epineuro, como se provocava grande lesão no nervo doador, com incisão até o epineuro contralateral (Sherren, 1906) praticamente realizando-se uma neurorrafia término-terminal, o que provocava dano funcional (motor ou sensitivo) ao território inervado pelo nervo doador. A orientação foi o abandono de tal técnica (Babcock, 1927).

Viterbo (1992) propôs a neurorrafia látero-terminal sem incisão do nervo doador. Desta forma o nervo doador não sofre lesão e não há nenhum comprometimento das estruturas inervadas por ele. O autor seccionou o nervo fibular e suturou seu coto distal à face lateral do nervo tibial, sem a remoção do epineuro e concluiu que a neurorrafia látero-terminal foi funcionante e manteve o trofismo muscular. A presença do epineuro não impediu a regeneração axonal ou a passagem do estímulo elétrico. (Viterbo, 1992; Viterbo et al, 1992; Viterbo et al, 1998).

Os termos término-lateral e látero-terminal são usados na literatura com o mesmo significado. Ballance et al. (1903) descreveram a neurorrafia término-lateral pela primeira vez. Papalia et al. (2007) descreveram a neurorrafia término-lateral como a sutura do coto do nervo seccionado ao epineuro do nervo doador intacto.

O termo neurorrafia látero-terminal foi usado pela primeira vez por Gatta (1938). Viterbo começou a usar o termo neurorrafia látero-terminal em sua tese de Doutorado em 1992. Papalia et al. (2001), publicaram um trabalho experimental utilizando o termo neurorrafia término-lateral, no entanto, relatam na discussão do trabalho que o termo correto seria neurorrafia látero-terminal.

Na neurorrafia látero-terminal ou término-lateral, o princípio baseia-se no neurotropismo que o coto distal exerce no nervo doador, permitindo que brotos do nervo saudável e intacto invadam o coto do nervo lesado e reinervem a zona que havia sido desnervada (Lundborg e Sweden, 2000).

Muitos autores confirmaram o neurotropismo e o brotamento ou invasão do coto distal por axônios vindos do nervo doador, por meio de diferentes técnicas

(Viterbo et al., 1992; Lundborg et al., 1994; MacCallister et al., 1999; Hayashi et al., 2004). Em 1992, Viterbo et al. publicaram estudo sobre a neurorrafia látero-terminal sem lesão do epineuro do nervo doador, com resultados promissores.

Lundborg et al. (1994) realizaram experimento em lesão de nervo em ratos e concluíram que, na neurorrafia término-lateral, o segmento de nervo lesado (o nervo que foi seccionado) suturado ao nervo doador (nervo intacto) atraiu axônios sensitivos e motores desse nervo doador. O nervo doador é o nervo ao qual o nervo lesado é suturado. Essa neurorrafia foi feita sem que o nervo doador fosse lesado, pois as neurorrafias látero-terminais eram feitas sempre com alguma lesão do nervo doador, seja lesão parcial ou janela no epineuro.

Viterbo et al. (1994b) publicaram estudo experimental em ratos, semelhante ao realizado em 1992. Nesse estudo, os pesquisadores removeram uma janela do epineuro para a neurorrafia látero-terminal do nervo fibular ao nervo tibial, constatando que a neurorrafia foi funcional, permitindo o crescimento de axônios lateralmente para o coto distal do nervo suturado, conduzindo estímulo elétrico e mantendo o trofismo do músculo correspondente e sem danos do nervo ao qual ele foi suturado, tratando-se de opção terapêutica quando não for possível a neurorrafia término-terminal.

Viterbo et al. (1994c) publicaram outro estudo realizando duas neurorrafias látero-terminais e um enxerto nervoso em modelo experimental de lesão nervosa periférica em ratos, demonstrando que havia axônios deixando o nervo doador para o enxerto de nervo na neurorrafia látero-terminal.

Zhao et al. (1997), após estudo experimental em neurorrafias término-laterais com e sem enxerto nervoso, concluíram que as fibras nervosas conseguem atravessar o epineuro, perineuro e endoneuro.

Zhang et al. (1998) realizaram estudo experimental com três neurorrafias látero-terminal diferentes, do nervo fibular ao tibial, do ramo muscular do gastrocnêmio ao tibial e do obturador ao ciático com remoção de epineuro, constataram regeneração do axônio com reinervação muscular, após três meses. Compararam com o lado oposto para o controle de normalidade. Quanto ao número de fibras nervosas e quanto ao peso dos músculos reinervados obtendo resultados semelhantes aos obtidos por Viterbo et al. (1992).

Viterbo et al. (1998) compararam a neurorrafia látero-terminal com e sem lesão de epineuro e usaram os seguintes parâmetros de comparação: peso do

músculo tibial cranial, teste eletrofisiológico, contagem de fibras nervosas no nervo doador acima e abaixo da neurorafia e área das fibras musculares do músculo tibial cranial e aspecto histológico do músculo tibial cranial. Não houve diferença entre os grupos para todos os parâmetros acima avaliados após seis meses entre as duas variantes da técnica de neurorafia látero-terminal.

Liu et al, (1999) compararam a neurorafia látero-terminal do nervo fibular ao nervo tibial com e sem janela de epineuro, neurorafia término-terminal com grupos normais e denervados. Os parâmetros usados foram índice funcional do fibular, medidas de contração do nervo extensor longo dos dedos ou teste de força, medida de massa desse músculo e histologia: morfologia e densidade de fibras nervosas nos nervos receptores. Concluíram que houve reinervação nas duas formas de neurorafia e que a neurorafia término-terminal foi melhor.

Em 1999, Kalliainen et al. relataram em estudo experimental que os músculos reinervados após neurorafia término-lateral apresentaram diminuição da massa muscular e muitas fibras deservadas, com força motora e área da secção transversal do músculo-alvo semelhante ao grupo no qual a neurorafia foi término-terminal.

Al-Qattan (2001) faz uma revisão realista da evolução das pesquisas sobre neurorafia látero-terminal que ganharam enorme força com as pesquisas de Viterbo em 1992. Dentre as conclusões, o autor salienta que para lesões nervosas com comprometimento motor a neurorafia látero-terminal deve ser guardada para quando a neurorafia término-terminal não for possível. Recomenda a neurorafia látero-terminal para lesões sensitivas e para o tratamento de neuromas, citando estudo próprio com oito casos clínicos e boa evolução.

Lutz et al. (2000) realizaram estudo sobre o nervo doador em ratos, por meio de neurorafia do nervo radial (antagonista) e do nervo ulnar (agonista) no nervo mediano (receptor). Concluíram que a neurorafia término-lateral alcançou força motora de 70% quando comparada à neurorafia término-terminal. Nervos antagonistas como doadores oferecem reinervação, mas a função é comprometida por contração conjunta. Concluíram também que o brotamento de axônios do nervo doador, provavelmente, ocorre por indução de fatores neurotróficos provenientes do coto distal a ele ligado, e em sua maioria produzidos por células de Schwann do coto distal.

No entanto, Papalia et al. (2007) após estudo experimental concluíram que a recuperação funcional motora após neurorrafia término-lateral também pode ser esperada quando o nervo antagonista é usado como nervo doador.

Em 2001, Cederna et al., em estudos experimentais, constataram desnervação aguda do músculo relacionado ao nervo doador após neurorrafia término-lateral. Embora o músculo inervado pelo doador tenha sofrido alteração em sua estrutura ou função (diminuição da força motora) ao longo do tempo (seis meses), não contraindicaram a técnica.

Viterbo e Faleiros (2002) e Viterbo (2003) divulgam os princípios e indicações da neurorrafia látero-terminal.

Também em 2002, Zhang e Fisher, confirmaram o brotamento colateral no nodo de Ranvier, tanto in vivo quanto in vitro e o importante papel das células de Schwann do nervo receptor na inicialização deste processo.

Jaberi et al. (2003), em estudo experimental, não conseguiram recuperação funcional do órgão alvo, embora tenham constatado a presença de fibras nervosas nas neurorrafias término-laterais.

Hayashi et al. (2004) constataram, através de estudo experimental, que a regeneração nervosa na neurorrafia término-lateral ocorre através do brotamento colateral dos axônios do nervo doador, embora o mecanismo de brotamento colateral permanecesse em maior parte desconhecido (Lykissas et al., 2007).

Ozmen et al. (2004), através de estudo experimental, concluíram que a neurorrafia término-lateral com a introdução do coto distal no nervo doador tem melhores resultados funcionais e histomorfométricos quanto à neurorrafia término-lateral com ou sem a janela epineural.

Papalia et al. 2007 realizaram neurorrafia látero terminal de nervo mediano ao nervo radial na tentativa de comprovar a reinervação por nervo antagonista. Os autores usaram teste funcional ("grasping test"), teste eletrofisiológico, peso dos músculos e histologia de nervos (número de fibras e diâmetro das fibras). O número de fibras nervosas e diâmetro foram menores que no grupo controle. O peso dos músculos reinervados foi maior que o denervado. Quanto ao teste funcional houve recuperação e melhora no desempenho até a 30ª semana, correspondendo a 42% da função normal.

Brenner et al. (2007) realizaram estudo em ratos e concluíram que, para haver regeneração de nervos motores, é necessário que o nervo doador seja

seccionado, ao menos em parte. O grau de lesão (quanto deve ser seccionado) não foi determinado pelos autores, que sugeriram mais estudos para que o dano seja o menor possível.

Yu et al. (2010) concluíram que existe reinervação funcional com base no brotamento de axônios de um nervo doador (ulnar) para um nervo receptor (nervo musculocutâneo) e que a especificidade de ser um nervo doador motor ou sensitivo não é importante. Foi feita neurorrafia látero-terminal do nervo musculocutâneo ao nervo ulnar. A observação durou cinco meses. Testes funcionais (“grooming test”) teste eletrofisiológico e exames histopatológico de nervos e músculos foram usados nesse estudo. Concluíram que a reinervação do nervo musculocutâneo não resultou do brotamento consequente à lesão axonal do nervo ulnar, mas sim de brotamento colateral dos axônios desse nervo, em resposta a estímulos neurotróficos provenientes do coto distal do nervo musculocutâneo. Concluíram também que a especificidade motora ou sensitiva para a escolha do tipo de fibra nervosa do nervo doador não era importante.

Jaeger et al. (2011) realizaram estudo experimental comparando a neurorrafia látero-terminal com a neurorrafia término-terminal usando nervo doador com fibras predominantemente sensitivas ou motoras. Concluíram que nervos doadores sensitivos para nervos receptores motores na neurorrafia látero-terminal não são capazes de preservar a massa muscular do músculo-alvo na neurorrafia. O músculo-alvo foi o músculo gastrocnêmio, os testes comparativos foram a massa final e histologia do músculo gastrocnêmio e dos nervos envolvidos no experimento. O tempo de observação foi de 16 semanas.

Em 2012, Viterbo et al. compararam três formas diferentes de neurorrafia látero-terminal em modelo experimental de rato. Usaram o nervo peroneal como receptor e o nervo tibial como doador. As três formas de neurorrafia foram: a forma clássica, na qual se sutura o coto distal do nervo receptor ao nervo doador; forma na qual a extremidade do coto distal do nervo peroneal foi dividido longitudinalmente em duas partes e os axônios foram removidos, resultando em dois retalhos epi-perineurais, estes retalhos circundaram o nervo tibial e foram fixadas com pontos de náilon 10.0 e a terceira forma, em que uma sutura foi realizada abraçando o nervo tibial. Nela um único ponto de nylon 10-0 atravessou o epineuro do nervo fibular, passou por trás do nervo tibial, voltou e passou na frente deste nervo e depois atravessou o epineuro do nervo peroneal de novo, como um laço, aproximado da

extremidade do nervo peroneal. Os autores compararam as três formas de neurografia látero-terminal através de medidas de massa do músculo tibial cranial e número de fibras nervosas do nervo peroneal. Não encontraram diferença estatística entre as três formas de neurografia, todas mostraram resultados inferiores ao observado no grupo controle.

Maciel et al. (2013) publicaram estudo sobre o efeito da estimulação elétrica no músculo tibial cranial após neurografia látero-terminal do nervo fibular em ratos. Compararam os grupos quanto à massa dos animais; a massa do músculo tibial cranial (o grupo com eletroestimulação apresentou resultado estatisticamente semelhante ao grupo controle); testes de avaliação da marcha através do índice funcional do nervo fibular (ao final da observação apenas o grupo submetido à eletroestimulação apresentou índices semelhantes ao encontrado no grupo controle); teste eletrofisiológico (não houve diferença entre os grupos controle e experimentais); teste de avaliação da força máxima (o grupo submetido à eletroestimulação apresentou resultado semelhante ao grupo controle e melhor que o grupo não submetido à eletroestimulação); análise morfológica e morfométrica do músculo tibial cranial (área, perímetro e diâmetro mínimo do corte transversal do músculo: todos os grupos foram superiores ao grupo desnervado e semelhantes entre si); análise morfológica dos nervos (área, número e diâmetro mínimo de fibras nervosas, área e espessura da bainha de mielina: apenas na comparação quanto à área da fibra nervosa os grupos experimentais foram estatisticamente semelhantes, nos outros o grupo que recebeu a estimulação elétrica foi superior, o grupo controle sempre foi superior aos demais). Os autores concluíram que a eletroestimulação foi eficiente na recuperação funcional do músculo e do nervo após a neurografia látero-terminal.

Nesse momento das pesquisas, embora relatos promissores ocorressem em estudos experimentais, em casos clínicos os resultados não eram tão promissores (Kayikçioğlu et al., 2000; Bertelli e Ghizoni, 2003).

Estudos clínicos

Atualmente muitos autores concordam que a indicação da neurorrafia látero-terminal se dá quando a neurorrafia término-terminal não for possível, seja pela distância entre os cotos, pelo dano ao coto proximal que não permita a neurorrafia ou pela remoção deste. Assim, as opções seriam o uso de um enxerto de nervo entre os cotos ou a neurorrafia látero-terminal (Zhao et al., 1997; Cederna et al., 2001).

Em 1993, Viterbo publicou técnica sobre cross-face usando neurorrafia látero-terminal, já com aplicação clínica.

Viterbo et al. (1994a), estudando a sequela de sensibilidade causada pelo uso do nervo sural em enxertos nervosos, relataram caso no qual o coto distal do nervo sural foi suturado na face lateral do nervo fibular superficial. Os autores demonstraram que a neurorrafia látero-terminal possibilitou o crescimento axonal do nervo doador para o interior do coto distal do nervo receptor, havendo recuperação de estruturas desnervadas e que não houve comprometimento do nervo doador ou das estruturas inervadas por ele.

Oğün et al. (2003) conseguiram bons resultados em três pacientes com grandes perdas do nervo mediano, com a interposição de enxerto nervoso e neurorrafia término-lateral. O retorno motor ocorreu em um caso e o sensitivo nos três. Os autores consideraram a neurorrafia término-lateral uma alternativa para casos extremos. Assim como Voche e Ouattara (2005), que realizaram neurorrafia término-lateral, com janela de epineuro em lesões nervosas da face palmar de dedos da mão observando recuperação sensitiva.

Pondaag & Gilbert (2008) realizaram neurorrafia término-lateral em lesões de plexo braquial por trauma obstétrico e concluíram que na maioria dos pacientes houve recuperação da função, embora limitada.

No entanto, em 2007, Beris et al. realizaram revisão na literatura até aquela data e publicaram as seguintes conclusões: embora muitas questões acerca da neurorrafia término-lateral permaneçam sem resposta, fica claro que esta técnica pode resultar em sucesso na regeneração de axônios e na reinervação; que a reinervação ocorre por brotamento de axônios vindos do nervo doador, induzidos por fatores neurotróficos; que a neurorrafia término-lateral pode promover recuperação funcional satisfatória para o nervo lesado, sem nenhum dano à função do nervo

receptor; que o número limitado de casos clínicos publicados mostrou que a neurografia término-lateral pode ser uma técnica viável na reparação de nervos periféricos em determinadas situações.

Uma revisão de literatura feita por Pannuci et al. (2007), concluiu que a indicação para a neurografia término-lateral permanece como segunda opção, após a término-terminal. No entanto, os autores concluíram também que existem vantagens frente ao uso de enxertos já que eles eliminam a morbidade associada ao nervo que doa o enxerto, proporcionam menos suturas e diminuem o tempo de reinervação por encurtar a distância de regeneração do axônio. Os autores concluíram nessa revisão que os resultados quanto à recuperação motora e sensitiva são variáveis e limitados e que normalmente vêm com pequena morbidade do nervo doador. Por fim, sugeriram mais estudos a respeito dos fatores neurotróficos para avanços em resultados clínicos.

Quanto ao tempo de observação na neurografia látero-terminal, Hare et al. (1992) avaliaram a recuperação funcional em diversas formas de lesões de nervos ciático, tibial e fibular por 52 semanas e concluíram que para as transecções desses nervos, seguida de neurografia término-terminal, o tempo de observação deve ser de 12 semanas para que se observe a recuperação funcional perto do ótimo e, portanto, a reinervação, e que mudança morfológicas observadas após este período provavelmente representem neuroregeneração inefetiva. O nervo fibular alcançou os melhores resultados quanto à recuperação funcional.

Estudos experimentais sobre a neurografia látero-terminais têm observado os animais por períodos de tempo que vão de três a seis meses (Zhang et al., 1998; Liu et al., 1999; Al-Qattan, 2000; Cederna et al.; 2001; Yu et al., 2010; Jaeger et al., 2011).

Em uma metanálise, avaliou-se 44 estudos sobre regeneração nervosa periférica usando células-tronco. Desses 44 artigos, 27 artigos usaram células tronco derivadas da medula óssea, sete artigos usaram células tronco derivadas do tecido adiposo e os demais artigos usaram células tronco de diversas origens. Os autores concluíram que houve confirmação da sobrevivência das células por pelo menos três meses depois de implantadas. O tempo de observação desses estudos foi de cinco semanas até um ano, a maioria dos estudos se prolongou de três a seis meses.

Portanto, não há na literatura um consenso sobre o tempo de seguimento em estudos envolvendo células-tronco (Hundepool et al., 2014).

Enxerto de nervos

Embora a sutura em lesões de nervos seja a técnica que traz os melhores resultados clínicos, os enxertos de nervos são, na maioria dos estudos, a opção quando o reparo primário não pode ser feito sem a utilização de tensão excessiva (Lundborg e Sweden, 2000; Braga-Silva et al., 2006; Chen et al., 2006; Siemionow e Sonmez, 2007; Piskin et al., 2008; Palhares et al., 2009; Jiao et al., 2009; Hundepool et al., 2014).

Os autores divergem quanto à dimensão de defeito a partir da qual o enxerto deve ser indicado. Hall (1997) indica enxerto de nervo em defeitos a partir de 20mm, baseado em estudo experimental, enquanto Somazz (1994) indica apenas para lesões acima de 30mm de distância entre os cotos proximais e distais. No entanto, são relatados resultados ruins para defeitos acima de 15mm, quando não se interpõe enxertos entre os cotos (Lundborg, 1982).

Neurotização

A neurotização, *lato sensu*, é sinônimo de reinervação de um músculo ou de um território sensitivo. A neurotização pode ser ao acaso, músculo-muscular, neural, neuromuscular ou músculo-neuro-muscular (Giordani et al., 2009; Urbanchek et al., 2004).

A reinervação ao acaso se dá quando o músculo em processo de degeneração encontra um nervo íntegro e dele emergem fibras nervosas que são atraídas pelo músculo paralisado. Já a neurotização músculo-muscular ocorre de forma espontânea, através do crescimento axonal de nervos de outro músculo sadio em contato com o músculo desnervado.

A neurotização pode ser feita pela aproximação do coto proximal do nervo doador com o nervo lesado, diretamente ou por meio de um enxerto. Existe a possibilidade de não se seccionar o nervo doador, e o coto do nervo lesado ser implantado de forma término-lateral ao nervo doador, é a neurotização neural.

Na neurotização neuromuscular, o coto proximal de um nervo sadio é implantado na intimidade de um músculo desnervado, usando um enxerto de nervo

ou não. Existe ainda a neurotização músculo-neuro-muscular, na qual um enxerto de nervo comunica um músculo “sadio” com um músculo que está paralisado.

Na neurotização, um nervo pode ser implantado em um músculo, mesmo em uma zona aneural, pois a sensibilidade à acetilcolina está preservada em todo o músculo. Em um músculo normalmente inervado essa sensibilidade está confinada nas placas motoras (Brunelli et al., 1990).

Têm sido relatados casos clínicos de sucesso que encorajam o uso das neurotizações diretas para recuperação de paralisias periféricas (Brunelli e Brunelli, 1993; Mackinnon et al., 1993).

Swanson et al. (2008), comparando a neurotização com a neurorrafia término-terminal em ratos, demonstraram que a neurotização é capaz de reinervar (de novo) músculos cronicamente desnervados. Os resultados obtidos não permitiram constatar a hipótese dos autores que era a de superioridade da neurotização à neurorrafia quanto à recuperação funcional em músculos cronicamente desnervados. No entanto, quanto mais prolongada a desnervação, menor a diferença entre os resultados das duas técnicas, sugerindo que a neurotização possa ser uma boa alternativa cirúrgica nas desnervações prolongadas.

Vasconcelos et al. (2007) apresentaram estudo funcional em 20 casos de paralisia do plexo braquial acometendo as raízes C5, C6 e C7 tratadas pela neurotização dos fascículos do nervo músculo-cutâneo que inervam o músculo bíceps braquial por fascículos do nervo ulnar para a recuperação da flexão do cotovelo (técnica de Oberlin), confirmando tal técnica como de escolha para o tratamento cirúrgico das paralisias altas do plexo braquial.

Verkis et al. (2010) relataram o tratamento de 43 pacientes com lesão de plexo braquial envolvendo as raízes C5 e C6. A reconstrução da função do ombro foi feita com a neurotização do nervo supraescapular em 41 pacientes e a neurotização do nervo axilar em 25 pacientes. Os autores concluíram que a reanimação do ombro deve ser prioridade nas lesões de plexo braquial e que a neurotização do nervo supraescapular e a do nervo axilar, se possível, oferecem os melhores resultados.

Terzis e Karypidis (2010) apresentaram revisão de 95 casos de pacientes portadores de paralisia facial, submetidos a procedimentos dinâmicos para a restauração do “piscar”. Os pacientes foram divididos em dois grupos. Nos 75 pacientes do grupo A foram realizados procedimentos de transferência de nervos, incluindo enxertos transfaciais e neurotização direta do músculo orbicular. No grupo

B, vinte pacientes foram submetidos à substituição do esfíncter orbicular, incluindo procedimentos usando o músculo frontal pediculado, transferência do músculo temporal, interposição do músculo platisma, occipital, grácil, extensor curto dos dedos ou do adutor longo microcirúrgicos. O tempo de desnervação variou de sete meses a 42,12 anos. A melhora no “piscar” foi notada em todos os pacientes. Os resultados foram melhores no grupo A, que incluía neurotização direta do músculo orbicular.

Condutores e tubos na regeneração nervosa

Fullerton (1915) atribui a si a primeira descrição do uso de veias para tubularizar suturas de nervos periféricos, desenvolvida durante sua experiência em cuidar de ferimentos na primeira guerra, que acontecia naquele momento. O autor descreve o método no qual protege a sutura dos cotos de um nervo lesado com um segmento de veia, no intuito de fornecer um meio asséptico, permitir o afrontamento dos cotos, orientar o crescimento do nervo e impedir a invasão de tecido cicatricial. Segundo Lundborg e Sweden (2000), o primeiro experimento usando tubos como ponte entre dois cotos nervosos foi em 1979.

Em 1982, Lundborg, estudando a interposição de tubos condutores de silicone em defeitos de 6 a 15mm, encontraram bons resultados para os defeitos de 6 mm, mas não observaram regeneração para defeitos de 15mm. A ideia era favorecer o acúmulo de fatores neurotróficos dentro de um espaço limitado contendo os cotos seccionados. A implantação do tubo proporcionaria a regeneração do nervo, com resultados melhores quanto menor fosse o defeito. Para defeitos de 10 a 15mm a regeneração é normalmente nenhuma ou muito pobre. O tubo é rapidamente invadido por fibrina, que por sua vez é invadida por capilares e células vindas de ambos os cotos, esta matriz serve para o crescimento do axônio proximal; fibronectina e laminina são encontradas precocemente, além de fatores neurotróficos. De forma geral, o tubo é usado como alternativa à sutura e ao uso de um enxerto de nervo, para aqueles defeitos menores que 5mm.

Alguns materiais sintéticos e biológicos têm sido explorados a fim de conduzir a regeneração nervosa, apenas conformando um tubo entre os cotos nervosos lesados, ou usando este tubo para abrigar enxertos de nervos e uma grande

quantidade de substâncias, células e tecidos, na esperança de que estes materiais possam promover a regeneração nervosa através deste tubo. Desvantagens no uso de material sintético têm sido reportadas, como a ocorrência de fibrose e compressão nervosa, assim tubos absorvíveis têm sido desenvolvidos (Piskin, 2008).

Tubos condutores absorvíveis entre cotos nervosos têm sido confeccionados com muitos materiais, como os tubos à base de celulose e cola de fibrina (Pan et al., 2006) ou à base de ácido glicólico e colágeno (Waiatayawinyu et al., 2007). Neste último estudo, os autores concluíram que condutores constituídos de colágeno têm resultados comparáveis ao enxerto autólogo de nervo, que por sua vez têm resultados superiores ao condutor de ácido glicólico.

Lopes et al. (2006) descrevem o uso de um tubo guia à base de colágeno absorvível para o reparo de um defeito de nervo ciático em ratos. A grande vantagem de um material absorvível é o fato de não ser necessária nova intervenção para a remoção deste tubo e os inconvenientes que esse procedimento possa causar.

Veias também têm sido usadas para a condução da reinervação periférica com bons resultados, alguns reportam bons resultados para defeitos menores que 30mm (Chiu, 1999), outros têm obtido bons resultados para defeitos maiores que 30mm (Tang, 1995).

Waitayawinyu et al. (2007) removeram um segmento de 10mm do nervo ciático de 45 ratos Sprague-Dawley. Foram utilizadas três formas de reconstrução do defeito do nervo: um condutor de colágeno tipo I, um condutor de ácido poli glicólico (PGA), e na terceira forma os segmentos excisados foram reenxertados de forma autóloga. As pernas contralaterais foram usadas como controles não operados. Após 15 semanas, a regeneração do nervo foi medida pela capacidade de contração do músculo alvo, contagem de axônios, peso e histologia dos músculos-alvo. Diferenças estatisticamente significantes na força de contração muscular isométrica, contagem de axônios e pesos musculares foram encontrados entre o grupo com condutor de colágeno tipo I em relação ao grupo que usou condutor de PGA. Os axônios eram menos organizados e menos densos nos condutores de PGA quando comparados a reconstrução de nervos com o colágeno tipo I e com enxertos de nervos. O condutor de colágeno tipo I e autoenxertos produziram resultados

comparáveis, que foram significativamente melhor do que os resultados do grupo que usou PGA.

Além das indicações iniciais descritas acima, os tubos também se tornaram mecanismos para a concentração de fatores neurotróficos a serem estudados na regeneração de nervos periféricos.

1.4 Fatores Neurotróficos

Segundo Johnson et al. (2008), fatores neurotróficos são uma família de polipeptídeos necessários para a sobrevivência de uma população neuronal determinada, estão relacionados com o desenvolvimento, manutenção e regeneração destas células. Em estados normais, estes fatores são principalmente sintetizados pelo tecido-alvo e usados para a viabilidade do corpo celular da célula nervosa. Após uma lesão nervosa, estes fatores são sintetizados por células não neuronais (células de Schwann e fibroblastos) no tronco nervoso e agem no suporte do crescimento do axônio. Estes fatores podem ser classificados em três grandes grupos.

O primeiro é o das neurotrofinas, que incluem: fator de crescimento de nervo (NGF), fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), neurotrofina 3 (NT-3), neurotrofina 3/4 (NT3/4) e neurotrofina 6 (NT-6). O segundo é o das neuroquinas, que englobam: fator inibidor de leucemia (LIF) e fator neurotrófico ciliar (CNTFs). E o terceiro, é a superfamília de fator de crescimento transformador β (TGF- β : TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3) e fator neurotrófico derivado de células da glia (GDNF). Neste estudo, as funções de cada um foram relacionadas à prevenção da degeneração após uma lesão ou promovendo a regeneração.

Lundborg et al. (1986) realizaram experimento em defeito de nervo periférico em ratos, colocando um tubo de silicone em Y no coto proximal, um dos braços do Y foi preenchido com enxerto de nervo e o outro com enxerto de tendão. Os pesquisadores observaram que houve migração de axônios apenas para o braço com enxerto de nervo. Este estudo aponta para a influência do meio no crescimento do axônio, neste experimento os autores sugeriram a produção de fatores neurotróficos pelas células de Schwann do tecido nervoso.

Matsumoto et al. (1999) demonstraram reinervação em modelo experimental com neurorrafia término-lateral, sem lesão do nervo doador, usando um tubo de silicone em Y. Demonstraram, principalmente, que as células de Schwann presentes no segmento distal produziram uma variedade de fatores humorais que interferiram no brotamento axonal. Alguns destes fatores que haviam sido produzidos pelas células de Schwann migraram para o epineuro e foram transplantados por difusão para o perineuro. Assim eles teriam provocado o brotamento de axônios a partir do nodo de Ranvier mais próximo da lesão nervosa periférica. Segundo os autores, o passo crucial para o brotamento foi a invasão das células de Schwann para o epineuro do nervo doador.

Lundborg e Sweden (2000), em artigo de revisão, demonstraram que a morte de células no gânglio da raiz dorsal vista após a transecção de um nervo periférico podia ser substancialmente diminuída, em número de células, através da aplicação de fator de crescimento de nervo no local da lesão. Os autores também demonstraram que, do ponto de vista clínico, estes fatores neurotróficos teriam enorme importância na evolução das lesões de nervos periféricos, embora não soubessem ainda qual seria a melhor via, dose ou mecanismo de ação destes fatores.

Após uma lesão nervosa, sabe-se que, nos estágios iniciais, uma grande quantidade de fatores relacionados à regeneração nervosa infiltra a área da lesão, vinda dos dois cotos e formando um fluido composto de plasma, fluido intraneural, axoplasma e outros componentes celulares. Uma grande quantidade de fatores ativadores como o fator de crescimento de nervos (nerve Growth factor - NGF), o fator neurotrófico ciliar (Ciliary neurotrophic factor – CNTF), o fator de crescimento de fibroblasto (Fibroblastic growth factor – FGF) e o fator neurotrófico derivado do cérebro, entre outros, podem ser extraídos deste fluido, desempenhando papel de indução e nutrição da regeneração das fibras nervosas. Talvez o entendimento da influência deste microambiente na diferenciação das células-tronco em células de Schwann possa permitir o uso destes agentes indutores como estímulo para a diferenciação (Lundborg e Sweden, 2000; Chen et al. 2006).

Segundo Lago et al. (2009), após a lesão de um nervo periférico, o sistema nervoso adulto responde aumentando a disponibilidade de fatores neurotróficos e estimulando o crescimento axonal. A adição exógena destes fatores neurotróficos pode aumentar a resposta regenerativa e prevenir a perda de neurônios,

especialmente quando os axônios não têm como manter a continuidade ou contato. A partir disso, tem-se sugerido que uma combinação de fatores neurotróficos possa potencializar a regeneração nervosa, mais do que quando um fator é usado isoladamente.

As células de Schwann desempenham papel importante durante a degeneração walleriana, produzindo e secretando uma variedade de fatores neurotróficos além de secretar componentes da matriz extracelular e lamina basal por onde os axônios em regeneração caminham em direção ao coto distal. Uma das razões para a falha na regeneração nervosa que cronificou é a inabilidade da célula de Schwann de sustentar o trofismo e a interação com os axônios em crescimento.

Segundo Chen et al. (2007), as células-tronco transplantadas para um tecido em regeneração podem ter a habilidade de se diferenciar e se integrar ao tecido local e agir como uma célula-tronco progenitora ou induzir atividade endógena regenerativa, evocando a produção de fatores tróficos e ou substâncias de suporte. Entre estes fatores, o fator neurotrófico e as proteínas da matriz extracelular têm um papel importante na sobrevivência e na proliferação de axônios e células de Schwann.

Também em 2007, Lykissas et al., avaliaram o efeito da eritropoetina administrada sistemicamente na regeneração nervosa periférica através da neurorrafia término-lateral. Sabe-se que a eritropoetina é uma glicoproteína que exerce efeito neuroprotetor, efeito esse multifuncional, com ação direta e indireta sobre os nervos. Além disso, ela protege da hipóxia e diminui a reação inflamatória local, além de efeito antiapoptótico por mecanismo não esclarecido. Os autores concluíram que a eritropoetina estimulou a regeneração nervosa nas primeiras semanas apenas e que estudos acerca da via de administração e dose precisariam ser esclarecidos, a fim de promover a manutenção do efeito.

Piskin et al. (2008) avaliaram o efeito de regeneração do gel de plaquetas interposto entre cotos seccionados de nervo ciático em ratos. O defeito entre os cotos foi de um centímetro. Seccionou-se um centímetro do nervo ciático e a reconstrução microcirúrgica foi feita usando-se um tubo de silicone interposto entre os cotos. O tubo de silicone foi preenchido com o gel de plaquetas em um dos grupos experimentais. O intuito foi testar os possíveis efeitos regenerativos a partir dos fatores de crescimento existentes em grânulos das plaquetas: fator de crescimento derivado de plaquetas, Interleucinas, fator angiogênico derivado de plaquetas, fator

de crescimento endotelial derivado de plaquetas, fator de plaquetas quatro e fator transformador de plaquetas. Os autores concluíram que o gel de plaquetas não ofereceu vantagens quanto à regeneração nervosa.

Chunzhen et al. (2008), em experimento de secção de nervo ciático em ratos, usaram cola de fibrina associada ao fator de crescimento de nervo e encontraram melhores resultados eletrofisiológicos, morfométricos e funcionais quando empregaram a cola de fibrina e o fator de crescimento comparados aos grupos que empregaram apenas um ou nenhum deles.

Segundo Lykissas et al. (2007), vários fatores de crescimento têm promovido a regeneração de nervos e têm sido bem documentados em diferentes modelos de lesão nervosa periférica e central. Entretanto, os fatores que estimulam a reinervação colateral estão relacionados em uma pequena lista de referências na literatura e os autores citam apenas dois estudos: Caroni and Gramdes (1990) e Liuzzi e Tedeschi (1991), nenhum deles relacionado a células-tronco.

Os fatores de crescimento da cola de fibrina foram estudados por Nunes et al., (2012) que concluíram que o reparo nervoso término-lateral mostrou o mesmo padrão de recuperação, independentemente do tipo de reparo utilizado, evidenciando que a adição de fator de crescimento nervoso na cola de fibrina não foi suficiente para a potencialização dos resultados.

1.5 Engenharia de tecidos e células-tronco

Segundo Piskins et al. (2008), embora a despeito da contínua introdução de novas técnicas microcirúrgicas baseadas em estudos científicos, o reparo de nervos periféricos é ainda uma das tarefas mais desafiadoras na microcirurgia, dado que a resposta funcional é raramente satisfatória. E para Mackinnon (1989) é improvável que ocorram melhores resultados clínicos através de refinamentos de técnica da microcirurgia apenas. Desde então se têm visto inúmeros estudos associando fatores externos na complementação do tratamento cirúrgico.

Com a emergência da engenharia de tecidos têm-se estudado a implantação de nervos artificiais para a reparação de defeitos em nervos periféricos. Como as células de Schwann são as células funcionais e estruturais primárias que desempenham papel crucial no processo de regeneração de nervo periférico, elas

se tornaram as células mais importantes e comumente usadas na engenharia de tecidos visando à regeneração de nervos periféricos (Chen et al., 2006; Braga-Silva et al. 2006; Arino et al., 2008).

Células-tronco

Logo após a fecundação surge uma célula ovo totipotente, mas muito precocemente na fase de embrião as células vão se multiplicando e adquirindo características especializadas e assim restringindo a capacidade de diferenciação, surgem três folhetos germinativos de onde derivam os tecidos que formarão o ser humano. Na maioria dos tecidos existem células de reserva que podem multiplicar-se e diferenciar-se naquele tecido a que pertencem e ainda manter uma reserva de células indiferenciadas (células-tronco), elas mantêm a integridade do tecido a que pertencem e reparam este tecido quando lesado (Zago, 2006).

Basicamente, as células-tronco apresentam três características: são indiferenciadas e não especializadas, podem multiplicar-se por longos períodos, mantendo-se indiferenciadas e são capazes de diferenciar-se em células especializadas de um tecido específico. As células-tronco podem ser **totipotentes** (presentes no zigoto) podendo se diferenciar em qualquer tecido humano, incluindo placenta e membranas embrionárias; podem ser **pluripotentes** (presentes no blastocisto) quando têm a capacidade de se diferenciar em células dos três folhetos germinativos, ectoderma, mesoderma e endoderma; **multipotentes** quando podem se diferenciar em vários tecidos de um mesmo folheto germinativo; **oligopotentes** quando se diferenciam em poucas células de um mesmo folheto germinativo e **unipotentes** quando podem se diferenciar em apenas um único tipo de células de um mesmo folheto embrionário. As células unipotentes diferenciam-se apenas em células no tecido de origem.

Hoje se acredita que praticamente todos os tecidos têm células-tronco, como a pele, mucosa intestinal, epitélio olfativo, cérebro, fígado, gordura, córnea, retina, polpa dentária, pulmões, músculos esqueléticos e cardíacos. Essas células-tronco são acionadas quando há uma lesão tecidual ou remodelação deste tecido. Algumas são muito ativas como as do sangue e outras muito menos como as cerebrais. Apesar disso, a presença de células-tronco em um tecido não garante que este

tecido seja reparado frente a um dano (Korbling e Estrov, 2003; Martins e Siqueira, 2005; Oliveira et al., 2006; Zago, 2006; Yarak e Okamoto, 2010).

Células-tronco embrionárias e adultas

Segundo Oliveira et al. (2006), quando se considera somente células totipotentes, as células-tronco embrionárias são as únicas a apresentar tal característica.

Embora seja fonte de esperança e de cura de diversas doenças, a utilização de células-tronco embrionárias humanas é assunto que suscita enorme polêmica, dificultando a condução de estudos, principalmente pelas questões bioéticas e religiosas, pois a obtenção destas células requer a destruição de um embrião de cinco dias, constituído pelo aglomerado de 100 a 200 células (Martins e Siqueira, 2005; Oliveira et al. 2006).

Além das células-tronco embrionárias, aquelas advindas do embrião, existem as células-tronco adultas, presentes em todos os seres humanos, na pele, no intestino, na medula óssea, no fígado, no pâncreas, no músculo esquelético, no tecido adiposo, no tecido nervoso e no sangue do cordão umbilical (Martins e Siqueira, 2005; Oliveira et al., 2006).

Segundo Martins e Siqueira (2005), não seria possível garantir que a capacidade de diferenciação das células-tronco adultas seja comparável a das células-tronco embrionárias. As células-tronco adultas ou somáticas são oligopotentes, embora algumas pesquisas apontem à possibilidade de algumas células-tronco adultas provenientes da medula óssea possuírem a capacidade de transdiferenciação (processo no qual uma célula de uma linhagem particular é convertida em uma célula de outra linhagem).

Sabe-se hoje que a incompatibilidade de células-tronco embrionárias é menor que a encontrada nas células-tronco adultas. Sabe-se também que mecanismos de engenharia genética podem diminuir a incompatibilidade, como a técnica de clonagem terapêutica, na qual se insere o núcleo de uma célula somática do paciente em um óvulo doador e este é estimulado para a divisão celular e as células no novo blastocisto seriam usadas pelo paciente (Martins e Siqueira, 2005; Oliveira et al., 2006).

Como as células-tronco embrionárias ainda permanecem fonte pouco ou não acessível para estudos, e principalmente, para terapêutica, a atenção se volta para o uso de células-tronco adultas autólogas, que têm a vantagem de ser obtidas por método pouco invasivo, são autólogas e possuem características promissoras para a maioria dos casos de lesões nervosas (Walsh e Midha, 2009).

As células-tronco adultas retiradas da medula óssea são de especial interesse pelas propriedades que estas células têm de circular no sangue periférico e se dirigirem para tecidos lesados tanto no contexto das doenças hematológicas quanto das não hematológicas. Além disso, destaca-se a capacidade de diferenciarem-se em células neurais, cardiomiócitos, hepatócitos e outras (Korbling & Estrov, 2003).

Segundo revisão feita por Chen et al. (2007), as células-tronco derivadas da medula óssea expressam potencial de diferenciação em osteoblastos, cartilagem, osso, células musculares, endotélio, células do músculo cardíaco, hepatócitos e células da ectoderme in vitro e in vivo. Em estudo próprio, os autores conseguiram a diferenciação de células mesenquimais removidas da medula óssea em células tipo fibroblastos que foram usadas na regeneração nervosa periférica trazendo vantagens sobre o grupo controle.

Portanto controvérsias e restrições sobre o uso de células-tronco embrionárias associadas ao potencial de tumorigenicidade e dúvidas sobre a imunocompatibilidade têm restringido o uso das células-tronco embrionárias (Salibian et al., 2013).

Células-tronco mesenquimais

Em 1966, Alexandre Friedenstein identificou as células formadoras de colônias fibroblásticas, hoje denominadas células-tronco mesenquimais (CTMs). O autor descobriu que na medula óssea as células-tronco mesenquimais constituem uma pequena população celular, de células-tronco multipotenciais, cerca de 0,001 a 0,01% de todas as células nucleadas medulares.

Trata-se de um conjunto de células-tronco distintas das células-tronco hematopoiéticas e das células-tronco endoteliais. Elas podem ser isoladas, expandidas e induzidas a se diferenciar em múltiplas linhagens em condições de cultura específicas, o grande interesse nessas células se deve ao seu potencial de

uso na regeneração de tecidos lesados com promissores estudos no tratamento da osteogênese imperfeita, doenças cardíacas e erros inatos do metabolismo (Covas, 2006).

As células-tronco mesenquimais são um tipo especial de células-tronco adultas ou somáticas com características especiais: a) são de fácil obtenção, b) podem ser obtidas do próprio paciente, c) podem ser obtidas de número de células adequado para transplante, devido à alta capacidade de proliferação celular *in vitro*, d) terem capacidade multipotente de diferenciação celular, e) serem de fácil manipulação no laboratório, f) serem pouco imunogênicas e g) possuírem habilidade de integração com o tecido circunjacente (Yarak e Okamoto, 2010).

Embora as células-tronco mesenquimais da medula óssea sejam multipotentes e assim restritas à linhagem a que pertencem, existe a possibilidade de reprogramação dessas células-tronco para que possam se tornar pluripotentes como através da introdução de fatores exógenos de transcrição por vetores virais ou através da manipulação “*ex vivo*” dessas células. Esses processos nos levam a preocupações a respeito da estabilidade dessas células bem como da possibilidade de aberrações cromossômicas o que impede seu uso nas pesquisas com humanos atualmente (Salibian et al., 2013).

O isolamento destas células inicialmente se faz pela separação das células mononucleares seguida pelo plaqueteamento destas células. Em cultura, as células-tronco mesenquimais apresentam uma morfologia fibroblastóide, são aderentes à placa de cultura e são capazes de se propagar por mais de 15 passagens. A confluência é atingida em cerca de 10 a 15 dias de cultura. As células não aderentes são excluídas, resultando em cultura homogênea (Covas, 2006).

A característica fundamental das CTMs é a capacidade de se diferenciarem em osso, cartilagem e gordura. A diferenciação neural das CTMs já foi demonstrada assim com a diferenciação em células vasculares e miócitos, além de células com fenótipo endotelial, cardiomiócitos e células musculares lisas em condições específicas. As células-tronco mesenquimais foram encontradas no sangue do cordão umbilical, da veia safena, na parede de artérias, no fígado e no pâncreas fetais, na placenta, no tecido adiposo e na polpa dentária (Covas, 2006). Já, as células-tronco derivadas do tecido adiposo foram identificadas como células-tronco mesenquimais da gordura por Zuk et al. (2001), e desde então têm sido fonte de muito interesse na medicina regenerativa e engenharia de tecido.

Existem muitos termos para células-tronco derivadas do tecido adiposo como pré-adipócitos, células estromais derivadas do tecido adiposo, células processadas do lipoaspirado, células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo e células-tronco adultas derivadas do tecido adiposo (Tsuji et al., 2014).

A caracterização das células-tronco mesenquimais pode ser feita baseando-se na sua capacidade de se diferenciar em tecido ósseo, cartilaginoso e adiposo e também por meio da caracterização através de diversos marcadores imunofenotípicos como CD49b, CD49c, CD58, CD54, CD102, CD50, CD106, CD166, CD44, CD13, CD71, CD90, CD105, CD73, CD123, CD127, CD120a e CD120b (com expressão positiva) e os marcadores CD49d, CD11a, CD62E, CD62P, CD62L, CD31, CD80, CD86, CD34, CD14, CD45 e CD25 (com expressão negativa). Nenhum desses anticorpos é específico para células-tronco mesenquimais. No entanto, embora não existam anticorpos exclusivos para as CTMs, a análise com um conjunto de anticorpos mais expressos nestas células permite determinar um perfil imunofenotípico das CTMs (Gratama et al, 1998; Covas, 2006).

Um comitê internacional propôs em 2006 critérios mínimos para a caracterização das células-tronco mesenquimais dado o grande interesse no potencial regenerativo dessas células e o grande número de estudos não padronizados usando essas células. O “Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee of the International Society for Cellular Therapy” propôs critérios mínimos para a definição de células-tronco mesenquimais humanas.

Primeiro as células-tronco mesenquimais devem ser aderentes ao plástico quando mantidas em condições padrão para cultura. Segundo, devem expressar os antígenos CD105, CD73 e CD90 e não devem expressar os antígenos CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79 alpha ou CD19 e moléculas de superfície HLA-DR. Terceiro devem ter a capacidade de se diferenciar em osteoblastos, adipócitos e condrócitos quando “in vitro”. Os autores ressaltam que esses critérios provavelmente devam sofrer modificações com os novos conhecimentos, mas podem auxiliar na troca de informações entre os diversos pesquisadores quanto ao uso de células-tronco mesenquimais, permitindo a comparação dos diversos resultados. Outra opção seria a demonstração da expressão gênica das células (Dominici et al., 2006).

Yarak e Okamoto (2010) também destacam a importância da caracterização das células-tronco por meio da citometria de fluxo e listam os seguintes marcadores positivos para a identificação dessas células: CD90, CD10, CD13, CD29, CD44,

CD49, CD54, CD55, CD59, CD73, CD90, CD105, CD106, CD146, CD166, HLA1, fibronectina, endomucina, asma, vimentina, colágeno-1. Como expressão negativa: CD11b, CD14, CD19, CD31, CD34, CD45, CD79 ALFA, CD80, CD117, CD133, CD144, HLA-DR, c-Kit, MyD88, STRO-1, LIN, HLAI. No entanto, em revisão sobre o assunto, concluem que é necessário o desenvolvimento do conhecimento sobre os mecanismos que regulam a biologia das células-tronco mesenquimais derivadas da gordura para que se possa aperfeiçoar e padronizar as técnicas laboratoriais de isolamento, caracterização e manipulação dessas células, para que ao final possa apoiar terapia de maior eficiência.

As células-tronco mesenquimais removidas da medula óssea e da gordura têm sido fonte dos estudos mais atuais. Karpov et al. (2013) compararam as células-tronco mesenquimais removidas da gordura e da medula óssea implantadas em uma área de isquemia aguda do miocárdio, concluindo que as células-tronco removidas da medula óssea melhoraram a função do ventrículo esquerdo e reduziram o tamanho da lesão cardíaca cicatricial após um infarto agudo do miocárdio.

Tapp et al., 2008 concluíram, em outro estudo experimental, que as células-tronco mesenquimais removidas do tecido adiposo têm potencial na terapia para degeneração discal da coluna vertebral.

1.6 Células-tronco na regeneração de nervos

A utilização de células-tronco nas lesões traumáticas de nervos tem como objetivo substituir ou regenerar um tipo de célula ou tecido que foi lesado ou perdido, ou ainda usar uma linhagem específica de células-tronco indiferenciada que produza fatores neurotróficos, tornando a regeneração mais eficiente.

No entanto, algumas importantes questões como: qual o melhor tipo de células-tronco a ser utilizado, por quanto tempo os efeitos duram, qual o risco de uma célula-tronco utilizada de forma terapêutica originar um tumor, se é necessária a repetição da oferta dessas células no mesmo paciente e qual a melhor forma de depositar ou garantir a permanência destas células no local da lesão ainda não estão respondidas.

Para o uso terapêutico das células-tronco em lesões nervosas, é preciso que as células sejam oferecidas de forma eficiente à área receptora, diferenciando-se de forma adequada, que sobrevivam, e, no caso de regeneração de neurônios, que promovam o crescimento de axônios.

Segundo Martins & Siqueira (2005), quanto à forma de incorporação das células-tronco pelo nervo lesado:

a) células-tronco locais poderiam ser induzidas à diferenciação, embora haja pouca evidência da existência de células-tronco em nervos humanos,

b) células-tronco adultas provenientes da medula que seriam estimuladas a migrar para o local da lesão. Nesse caso, a enorme vantagem seria a não manipulação do local afetado. Não há ainda estudos, nem mesmo experimentais que confirmem esta possibilidade para lesões em nervos.

c) as células-tronco poderiam ser oferecidas diretamente na área lesada. Esta oferta poderia ser por via líquórica, sanguínea ou pela deposição direta de células-tronco no local do nervo lesado, incorporação no interior de condutores e a adição dessas células à cola biológica.

Segundo Martins e Siqueira (2005), há subtipos de células-tronco e a escolha do melhor tipo de célula-tronco para diferenciar-se em neurônio ou células produtoras de mielina ainda é uma fase não vencida das pesquisas.

As células-tronco derivadas de medula óssea têm sido fonte de pesquisa da maioria dos estudos que visam à regeneração em lesões nervosas (Martins e Siqueira, 2005; Braga-Silva et al., 2006; Lopes et al., 2006; Chen et al., 2006; Chen et al., 2007; Colomé et al., 2008; Walsh e Midha, 2009).

Através de modelo experimental com avulsão de raízes dorsais em ratos, Ohta et al. (2004) demonstraram ser possível a oferta de células-tronco neurais no líquido (quarto ventrículo) e sua integração na área da lesão de raízes dorsais. Os pesquisadores demonstraram que houve efeito benéfico na regeneração nervosa através da indução de continuidade de células de Schwann e astrócitos na zona de transição da lesão. Este estudo abre uma enorme perspectiva para pacientes com lesões graves, como as de plexo braquial. A infusão sanguínea a partir de arteriografia seletiva é também um meio que vem sendo estudado, inclusive em pacientes humanos portadores de lesões medulares irreversíveis, a dificuldade muitas vezes é a cateterização de vasos tão finos.

Segundo Martins e Siqueira, (2005) o crescimento de axônios de células-tronco embrionárias diferenciadas em neurônios foi possível apenas *in vitro*, em experimentos há inibição da regeneração axonal por ação de inibidores da mielina a partir do sistema nervoso central. Talvez o próximo passo seja diminuir a inibição do crescimento axonal.

Pan et al. (2006) avaliaram o potencial de células-tronco mesenquimais do líquido amniótico na regeneração de nervos periféricos de ratos. Células tronco mesenquimais derivadas do líquido amniótico foram usadas para promover a regeneração de defeitos de 5 mm de nervos ciáticos em ratos. Foram usadas na proporção de 10^5 células/ml, injetou-se 50 μ l em 100 μ l de cola de fibrina dentro de tubo de celulose. Concluíram que a influência foi positiva, que houve vantagens no crescimento do nervo lesado através do defeito realizado no experimento. No entanto, segundo os autores, o mecanismo pode ter sido por efeito neurotrófico ou por interação das células implantadas com as células de Schwann.

No Brasil, Lopes et al. (2006), estudaram a influência de células-tronco removidas da medula óssea na regeneração nervosa periférica em ratos, através do uso de um tubo de colágeno absorvível preenchido com células do estroma da medula óssea. Usaram células tronco mesenquimais derivadas da medula óssea cultivadas, isoladas e implantadas na proporção de 1×10^5 células por animal, colocadas nos tubos de colágeno. Os autores constataram que a melhora funcional foi mais rápida e que o número de fibras mielinizadas e a área de mielina nestas fibras foram significativamente maiores no grupo que recebeu as células do estroma da medula óssea, quando comparadas ao grupo que não as recebeu.

Braga-Silva et al. (2006) avaliaram o efeito do uso de células-tronco da medula óssea e do plasma rico em plaquetas na regeneração de nervos periféricos em ratos, seccionando o nervo ciático e removendo 10 mm do nervo. A reconstituição do nervo foi feita por meio de um tubo de silicone. No primeiro grupo, o tubo de silicone estava vazio; no segundo grupo o tubo foi preenchido com células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea, não cultivadas, isoladas na proporção de 10^7 células/ml/animal e implantadas em tubo de silicone que se interpôs no defeito do nervo ciático; no terceiro grupo havia apenas plasma rico em plaquetas no tubo de silicone; no quarto grupo o tubo de silicone foi preenchido com as células-tronco mesenquimais da medula óssea, na mesma proporção, suspensas em plasma rico em plaquetas e em um quinto grupo o segmento do nervo ciático

ressecado foi usado e reimplantado. Após seis semanas, os resultados sugeriram que as células-troncos, provenientes da medula óssea, injetadas dentro do tubo de silicone, induziram a proliferação e diferenciação de células de Schwann.

O grupo onde as células tronco foram implantadas sem o plasma rico em plaquetas apresentaram melhores scores quanto ao teste da marcha, promovendo uma regeneração mais rápida e mais abundante, com a formação de maior número de fibras mielinizadas, permitindo assim melhor recuperação funcional quando comparado aos demais grupos estudados. Os autores sugerem que o plasma rico em plaquetas possa ter inibido o desenvolvimento das células tronco.

Chen et al. (2006) estudaram as células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea, cultivadas, isoladas na proporção de 2×10^7 células/ml, com a implantação de 1×10^5 células por tubos de silicone, em cada rato, em defeitos de nervo periférico. Conseguiram confirmar a transformação de células do estroma da medula óssea de ratos em células de Schwann após quatro semanas (as células que foram alocadas dentro de um tubo de silicone entre os cotos do nervo ciático, exibiram características imunoistoquímicas de células de Schwann – expressaram o marcador para a proteína S100). Os autores defendem o modelo apresentado que usou um tubo de silicone envolvendo a união dos cotos nervosos seccionados por fornecer um meio limitado para a diferenciação, aumentando a eficiência da diferenciação.

Chen et al. (2007) investigaram a produção e contribuição de fatores neurotróficos para defeitos de 15mm em nervos ciáticos de ratos. Usaram células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea, cultivadas, implantando cerca de 1×10^6 células por tubos de silicone para corrigir defeitos de 15mm do nervo ciático em cada rato. Concluíram que a inclusão destas células: a) promoveu melhora quanto à função da marcha, b) proporcionou menor perda muscular, c) permitiu maior número de axônios regenerados, incluídos no tubo.

Chen et al. (2007) concluíram também que o processo de regeneração foi acompanhado de elevada expressão de fatores neurotróficos nas fases iniciais e tardias e que fica evidenciada a associação da produção de fatores neurotróficos e o potencial de promoção de regeneração das células-tronco derivadas do estroma da medula óssea.

Ainda segundo os autores, o mecanismo molecular pelo qual células mesenquimais removidas da medula óssea têm efeito promotor na regeneração

nervosa periférica permanece obscuro e a diferenciação destas células em células de Schwann é uma grande possibilidade, levando em consideração que os axônios em regeneração crescem em direção ao coto distal em íntimo contato com células de Schwann. Por outro lado, estudos semelhantes de Cuevas et al. (2002) demonstraram que apenas uma pequena porcentagem (5%) de células-tronco provenientes da medula óssea se diferenciou em células de Schwann.

Terapias usando células de Schwann têm se mostrado efetivas e promissoras no tratamento de lesões nervosas traumáticas e degenerativas do sistema nervoso central bem como nas lesões nervosas periféricas. No entanto, o uso de células de Schwann demandaria o uso de um nervo periférico e tempo para que essas células pudessem ser cultivadas e reimplantadas. Os autores usaram células-tronco da medula óssea humana que foram coletadas, manipuladas, expandidas, submetidas à diferenciação para células tipo Schwann e reimplantadas na proporção de 1 a 2×10^7 células/ml em tubo de silicone de 10mm em defeitos de nervo ciático em ratos. Os autores mostraram seu benefício na regeneração nervosa periférica que foi superior ao uso de células-tronco da medula apenas. Embora os autores não tenham usado vetores virais para a transdiferenciação mantiverem o receio de teratogenicidade no seguimento de pacientes que possam fazer uso dessa terapia (Shimizu et al., 2007).

Colomé et al. (2008) realizaram importante estudo em coelhos. Analisaram a lesão de nervo periférico, após rafia e tubulização com silicone e da implantação de células-tronco autólogas removidas da medula óssea. Usaram células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea, não cultivadas, com a implantação de 1×10^6 células por tubos de silicone em defeitos de 5mm do nervo tibial em cada coelho do grupo experimental. O grupo controle teve o tubo de silicone preenchido com solução salina 0,9%. Em todos os animais observou-se a formação de tecido de regeneração servindo de ponte entre as extremidades nervosas. Nos dois grupos notou-se a presença de reação granulomatosa (macrófagos, células epitelióides e células gigantes).

Notou-se a presença de eosinófilos em menor proporção no grupo tratamento, que foi atribuída à maior velocidade de resolução do processo, sem diferença estatística. Macrófagos carregados de hemossiderina foram encontrados em todas as lâminas sem diferença entre os grupos. Notou-se também a expansão do epineuro por edema ou deposição de colágeno, juntamente com numerosas

câmaras de digestão, indicando degeneração walleriana mais abundante nas porções distais. A regeneração nervosa foi avaliada de forma qualitativa e foram identificadas fibras regeneradas de orientação longitudinal e mielina fina, o que é indicativo de evolução do processo em ambos os grupos de estudo. Observou-se também um número variável de neofascículos com fibras desviadas por vasos neoformados de parede fina e luz ampla independente do grupo estudado. Assim, observou-se regeneração das fibras seccionadas envolvidas com bainhas de mielina finas nos dois grupos. No entanto, o grupo estudado com células-tronco mostrou vantagens: menor degeneração walleriana e processo regenerativo mais rápido.

Arino et al. (2008) realizaram experimento em defeitos de 10mm e 15mm de nervo ciático de ratos que foram reconstruídos com enxerto de tendão autólogo associado ou não a inclusão de células de Schwann removidas da porção de nervo que originou o defeito no animal. Estas células foram cultivadas e depois implantadas no tendão removido da cauda do animal. Verificaram que embora tenha havido uma mielinização estatisticamente maior no grupo cuja reconstrução foi associada às células de Schwann nas primeiras seis semanas, após 12 semanas não houve diferença estatística entre os grupos quanto à força motora e avaliação histológica, portanto quanto à reinervação.

Em modelo experimental de amputação de nervo periférico, Lago et al. (2009) verificaram que o transplante de células de Schwann estimulou o crescimento do axônio e ou manteve a sobrevida das ramificações de axônio.

Segundo Walsh e Midha (2009), quando células-tronco mesenquimais da medula óssea são removidas e cultivadas em meio específico, têm a capacidade de se transdiferenciar em uma célula aderente tipo Schwann. Estas células têm sido usadas em associação com tubos de material artificial como o silicone e em associação com enxertos acelulares para a regeneração nervosa, com bons resultados comprovados por métodos eletrofisiológicos, morfométricos e funcionais. Embora a capacidade dessas células de produzir mielina funcionante in vivo tenha sido questionada, alguns autores têm provado que elas são, no mínimo, capazes de mielinizar células cultivadas in vitro, despertando definitivamente a atenção para seu potencial terapêutico.

Sabe-se que no estroma da medula óssea há células-tronco que podem se diferenciar em algumas linhagens de células como osteoblastos, condrócitos e adipócitos, em condições experimentais específicas. Mais recentemente foram

demonstradas características de transdiferenciação destas células em astrócitos, oligodendrócitos, micróglia e neurônios, in vivo e in vitro. E estudos experimentais têm usado células derivadas do estroma da medula óssea na regeneração de nervos periféricos demonstrando a regeneração e remielinização das fibras lesadas, com benefício constatado (Walsh e Midha, 2009).

Ainda segundo a revisão de Walsh e Midha (2009), as células-tronco provenientes de tecido adiposo têm sido identificadas como uma fonte de células-tronco multipotentes com perfil fenotípico comparável àquele das células-tronco do estroma da medula óssea. Parece que se diferenciam em uma célula de fenótipo de Schwann mielinizante, in vitro, quando dadas as mesmas condições de meio apropriado que promovem a transdiferenciação das células-tronco de medula óssea. Estudos posteriores serão necessários para determinar se elas podem também transmitir estas vantagens para o nervo periférico lesado.

Os artigos relacionados nestas conclusões mostram confirmações “IN VITRO”, nenhum estudo experimental. Os autores ainda citam e descrevem uma série de estudos com células-tronco provenientes de células dos folículos da pele; com comprovação de seu potencial de diferenciação em células de Schwann e mielinização in vitro e in vivo, comprovando melhora funcional motora, eletrofisiológica e morfométrica em defeitos de nervos periférico de modelos experimentais em ratos.

Inúmeras tentativas de implementar a regeneração de nervos periféricos têm sido procuradas. Bons resultados têm sido relatados com o uso de células-tronco retiradas da medula óssea, células de Schwann removidas de outros nervos e até células do trato olfatório (Radtke et al., 2009).

Para Yarak e Okamoto (2010) a grande vantagem das células-tronco mesenquimais do tecido adiposo sobre as mesmas células da medula óssea está no fácil método de obtenção da fonte tecidual e por estar disponível em grande quantidade. Relatam também que as células-tronco mesenquimais da gordura apresentam maior frequência que as encontradas na medula óssea e que a taxa de proliferação é maior nas células-tronco mesenquimais de origem gordurosa.

Em estudo de Erba et al., (2010), os resultados sugerem que qualquer efeito regenerativo das células-tronco derivadas de tecido adiposo é mais provável ser mediado por um impulso inicial lançado por fatores de crescimento e/ou um efeito indireto na atividade endógena de células de Schwann. Estudos futuros na

engenharia de tecidos precisam melhorar o potencial neuroregenerativo das células-tronco derivadas de tecido adiposo quanto à sobrevivência dessas células a longo prazo em condutores (tubos) de nervo, pois nesse estudo os autores constataram que as células-tronco haviam diminuído muito em número após 14 dias de implantadas em condutores colocados nos defeitos de nervos.

Summa et al. (2010) publicaram estudo sobre o uso de um condutor de nervo fabricado com cola de fibrina em um defeito do nervo ciático de 10mm. O condutor de cola de fibrina, portanto biodegradável e absorvível, foi preenchido com células de Schwann ou com células-tronco diferenciadas em células de Schwann. Segundo os autores, as células de Schwann seriam o melhor tipo de células a preencher um condutor por produzir moléculas de adesão, fatores de crescimento e por ser produtora da membrana basal que suporta e orienta o crescimento dos axônios. No entanto, a aquisição de células de Schwann sacrificaria um nervo e sua cultura demandaria tempo.

Os autores preencheram os condutores com três diferentes tipos de células: com células de Schwann, com células-tronco derivadas da medula diferenciadas em células tipo Schwann por meio de cultura e fatores indutores e por células-tronco derivadas da gordura (mesenquimais) diferenciadas em células tipo Schwann. Os melhores resultados foram obtidos com o uso de células de Schwann cultivadas, as células-tronco derivadas da gordura e da medula previamente diferenciadas em células tipo Schwann também influenciaram positivamente na regeneração nervosa sem diferença entre si. Considerando que 2% da gordura lipoaspirada contêm células-tronco mesenquimais, os autores ressaltam a facilidade da coleta e abundância dessas células, concluem que estudos futuros serão necessários para confirmar os efeitos positivos das células-tronco derivadas da gordura na regeneração nervosa periférica e sua similaridade de efeito com as células-tronco derivadas da medula óssea.

Frattini et al. (2012) realizaram estudo experimental em que o nervo ciático de ratos foi seccionado e os cotos do nervo foram colocadas em um tubo de policaprolactone biodegradável deixando um intervalo de 3mm entre elas. Em um dos grupos o tubo foi preenchido com células-tronco mesenquimais (MSCs) obtidas a partir animais que expressavam a proteína verde fluorescente (grupo tratado com células-tronco) ou apenas com um meio de cultura (grupo sem células-tronco). A função motora foi analisada de acordo com o índice funcional do ciático (IFC). Após

seis semanas, os animais foram sacrificados, e o nervo ciático regenerado, o gânglio da raiz dorsal (DRG), a medula espinal e o músculo gastrocnêmio foram coletados e processados para análise quantitativa que mostrou um aumento significativo no número de fibras mielinizadas no grupo que recebeu as células-tronco.

O número de neurônios no DRG foi significativamente maior no grupo tratado com células-tronco, não houve diferença no número de neurônios motores na medula espinal. Foram encontrados valores mais elevados de expressão fatores tróficos em grupos tratados com MSCs, especialmente fator de crescimento de nervo. O índice funcional do ciático (IFC) revelou uma melhora significativa no grupo tratado com MSCs. O músculo gastrocnêmio mostrou um aumento no peso e nos níveis de enzima creatina-fosfoquinase, sugerindo uma melhora da reinervação em animais que receberam as MSCs. A imunoistoquímica documentou que algumas células transplantadas assumiram um fenótipo de células de Schwann, como evidenciado pela sua expressão da proteína S-100, um marcador de células de Schwann. Portanto os autores concluíram que o grupo que recebeu células-tronco apresentou bons resultados e é uma terapia apropriada na regeneração nervosa periférica em ratos.

Rosa Júnior (2013) realizou estudo experimental em ratos sobre o reparo de nervo periférico utilizando a veia jugular como tubo associado à cultura de Células-tronco extraídas de tecido adiposo. O autor usou células-tronco mesenquimais de tecido adiposo, cultivadas e injetadas em tubo de veia na concentração de 5×10^6 por animal. O grupo que usou células-tronco associadas ao plasma rico em plaquetas apresentou benefícios na regeneração do nervo fibular comum e do músculo tibial cranial, atingindo semelhança com o grupo controle quanto à massa do músculo tibial cranial, área da bainha de mielina, espessura da bainha de mielina e latência, obteve semelhança com o grupo que usou apenas plasma rico em plaquetas nas comparações quanto à massa do músculo tibial cranial, amplitude e latência.

Cartarozzi et al. (2015) investigaram a eficácia de células-tronco mesenquimais removidas da medula óssea na regeneração de nervos periféricos em ratos adultos femininos Lewis. Os autores realizaram a transecção unilateral no nervo ciático seguida de reparação de três formas: um tubo de policaprolactona vazio, ou o mesmo tubo preenchido com selante de fibrina ou o mesmo tubo contendo o selante de fibrina associado às células-tronco mesenquimais da medula óssea, 3×10^5 células por animal. Sessenta dias após a lesão, estudou-se os nervos

regenerados por imunoistoquímica, morfologia dos nervos e teste funcional. Os resultados mostram que as células-tronco mesenquimais no selante de fibrina associadas ao tubo de policaprolactona melhoraram o processo de regeneração do nervo, modulando positivamente a reatividade das Células de Schwann

Quanto ao número de células tronco usadas nos experimentos em uma revisão de 14 estudos que usaram diversas fontes de células tronco na regeneração nervosa periférica os autores encontraram estudos usando de 4×10^3 a 2×10^7 células. Relatam que há sempre pouca explicação sobre a quantidade de células usadas, relatam um estudo onde a concentração de 80×10^6 foi benéfica para a regeneração nervosa periférica naquele dado experimento, concentrações menores foram inexpressivas e concentrações maiores mostraram resultados piores quanto à regeneração nervosa. Os autores discutem que talvez uma concentração maior gere competição entre as células transplantadas quanto ao espaço e recursos de sobrevivência no local onde foram implantadas. Assim estratégias devem levar em conta o número e também devem proporcionar às células um meio ideal de sobrevivência e integração ao meio onde devem favorecer a regeneração nervosa. (Walsh e Midha, 2009).

Segundo Walsh e Midha (2009), embora muitos estudos tenham se preocupado em comprovar o potencial de regeneração em nervos periféricos de diversas células-tronco de diferentes fontes, poucos estudos têm se interessado em compará-las. Outras preocupações são o número de células-tronco ideal a ser ofertado no local da lesão, se as células-tronco precisam adotar o fenótipo das células de Schwann para exercer função na reparação de nervos periféricos, qual o melhor método de colocar estas células no local da lesão e a extensão da sobrevivência das células, necessárias para evocar efeito terapêutico.

1.7 Estudos recentes e justificativa:

Em estudo recente sobre medicina regenerativa usando células-tronco em cirurgia plástica, Salibian et al. (2013) constataram usos muito interessantes de células-tronco derivadas principalmente da gordura, pela sua fácil aquisição e manipulação. O estudo demonstra o uso dessas células em defeitos ósseos, lesões por radioterapia e isquemia de membros inferiores com excelentes resultados. Alguns procedimentos estéticos como o aumento de mamas e rejuvenescimento da face também têm sido claramente demonstrados com o uso de células-tronco. Mínimas complicações têm sido relatadas. Relatam que as células-tronco derivadas da gordura têm a capacidade de repor as células tipo Schwann hospedeiras e podem permitir a regeneração nervosa quando se diferenciam em células-tronco de uma linhagem neuronal, são de acessibilidade maior que as células-tronco derivadas da medula óssea e tem capacidade comparável a essas células na capacidade de promover a regeneração nervosa periférica. No entanto os autores atentam para o fato de que pouco ainda se sabe sobre os mecanismos de ação por trás dos benefícios terapêuticos, sobre a sobrevivência e controle de proliferação dessas células no local de implantação e sua apropriada integração no meio local. A maioria dos relatos ainda é isolada e com pequeno grupo de indivíduos.

Em estudo de metanálise sobre o uso de células-tronco na regeneração nervosa periférica onde foram incluídos estudos com defeitos críticos cuja reconstrução foi feita com substituto do nervo ou substitutos (como tubos) acrescidos por células-tronco, os autores encontraram resultados que confirmaram a contribuição das células-tronco na regeneração nervosa periférica. O efeito da regeneração foi medido e confirmado, sobretudo por três formas de avaliação que os autores consideraram confiáveis e reprodutíveis: “Walking Track”, testes eletrofisiológicos e medidas da massa do músculo acometido pelo nervo lesado (Hundepool et al., 2014).

As células-tronco derivadas do tecido adiposo têm implicações relevantes na regeneração de tecidos, por conta de seu alto rendimento celular no tecido adiposo, entre outros fatores, pela habilidade de se diferenciar em diversas linhagens e de secretar diversas citocinas e de seu efeito imunomodulatório. Um grande número de estudos clínicos tem sido conduzido, muitos deles ainda em andamento, entretanto poucos estudos clínicos de fase três foram publicados. As células-tronco derivadas

da gordura são uma fonte celular promissora para a medicina regenerativa e mais estudos são necessários para garantir sua segurança e a eficácia de engenharia de tecido usando essas células (Tsuji et al., 2014).

Considerando a literatura atual, que trata as células-tronco como coadjuvantes importantes e promissoras na regeneração nervosa periférica, mas que ainda suscita diversas questões; considerando que as células-tronco removidas da gordura são a maior fonte de células-tronco e de mais fácil acesso no corpo humano; considerando a neurografia látero-terminal uma importante técnica no tratamento de lesão nervosa periférica, sobretudo em casos críticos, mas que ainda demanda aprimoramento, decidiu-se estudar o efeito de células-tronco provenientes do tecido adiposo na reinervação periférica através de neurografia látero-terminal.

2 Objetivo

Avaliar a influência de células-tronco mesenquimais do tecido adiposo na regeneração e reinervação periférica associada à neurorrafia látero-terminal.

3 Método

O Projeto foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa da UNESP/Botucatu de acordo com os Princípios Éticos adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Foram usados 140 ratos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Wistar, adultos, machos, provenientes do Biotério da UNIPEX (Unidade de Pesquisa Experimental) do Campus da UNESP em Botucatu, com massa média inicial de 265,28g a 276,95g, portanto animais com oito semanas de vida (<http://www.bioterio.fm.usp.br>).

Os 140 animais foram divididos entre os sete grupos, com vinte animais em cada grupo e operados de forma aleatória por um único pesquisador. As cirurgias foram realizadas no laboratório de cirurgia experimental da UNESP.

Os animais foram pesados e anestesiados com ketamina (0,3ml/kg, intramuscular) e xilazina (0,2ml/kg, intramuscular). Depois de anestesiado os animais foram colocados em decúbito ventral e foi feita antissepsia com PVPI (polivinilpirrolidona iodo). Em todos os ratos foi feita uma incisão longitudinal, de 3cm no membro posterior direito, o músculo bíceps femoral foi dividida e os nervos ciático, sural, fibular comum e tibial identificados. Em cada grupo após o procedimento adequado a cada um, os planos foram aproximados e a incisão suturada com fio monofilamentado de náilon 4.0.

3.1 Organização dos grupos

Grupo 1 (G1) - controle de normalidade. Os nervos foram apenas identificados.

Nos grupos de 2 a 7 o nervo fibular comum direito foi seccionado a cerca de um cm de sua origem do nervo ciático. O músculo bíceps femoral foi transfixado com pinça hemostática tipo Halsted de forma romba e o coto proximal do nervo fibular comum levado até a sua superfície e fixado com um ponto de fio monofilamentado de náilon 4.0.

Grupo 2 (G2) - grupo controle de desnervação. O coto distal foi invertido cerca de 180° e inserido em musculatura adjacente e fixado com náilon 4.0.

Nos grupos de 3 a 7 o coto distal do nervo fibular comum foi suturado na face lateral intacta do nervo tibial, sem abertura de janela epineural com auxílio de microscópio DL Vasconcelos (dez aumentos) usando quatro pontos de náilon 10.0. As variações de cada grupo são descritas abaixo.

Grupo 3 - neurorrafia látero-terminal. Apenas neurorrafia.

Grupo 4 - neurorrafia e fáscia. Uma fáscia muscular de 1cm² foi removida da musculatura superficial aos músculos bíceps femoral e semitendinoso, subjacente à incisão no membro posterior direito usado para a cirurgia de neurorrafia. Essa fáscia envolveu como um envelope toda a neurorrafia.

Grupo 5 - neurorrafia, fáscia e gel de plaquetas. A neurorrafia foi envolvida por gel de plaquetas e pela fáscia.

Grupo 6 - neurorrafia e gel de plaquetas. A neurorrafia foi envolta por gel de plaquetas, sem o uso da fáscia como no grupo anterior.

Grupo 7 - neurorrafia, fáscia, gel de plaquetas e células-tronco, previamente manipuladas. A neurorrafia foi envolvida por gel de plaquetas contendo células-tronco removidas da gordura do próprio animal e pela fáscia.

Quadro 1 - Grupos de 1 a 7 e suas variações.

Grupos	Variações
G1	Controle de normalidade .
G2	Controle de desnervação .
G3	Neurorrafia látero-terminal .
G4	Fáscia removida do animal envolve a neurorrafia látero-terminal.
G5	Gel de plaquetas e fáscia envolvem a neurorrafia látero-terminal.
G6	Gel de plaquetas envolve a neurorrafia látero-terminal, sem a fáscia.
G7	Gel de plaquetas contendo células-tronco e a fáscia envolvem a neurorrafia látero-terminal.

Após as cirurgias, os animais foram mantidos em caixas apropriadas, recebendo água e ração “*ad libitum*”, sem restrições na movimentação, respeitando-se ciclos de 12 horas de luz, em temperatura média de 24°C (±0,5), no Biotério da Unidade de Pesquisa Experimental (UNIPLEX) da Faculdade de Medicina da UNESP/ Botucatu.

Esquemas mostrando aspectos das cirurgias em cada grupo:

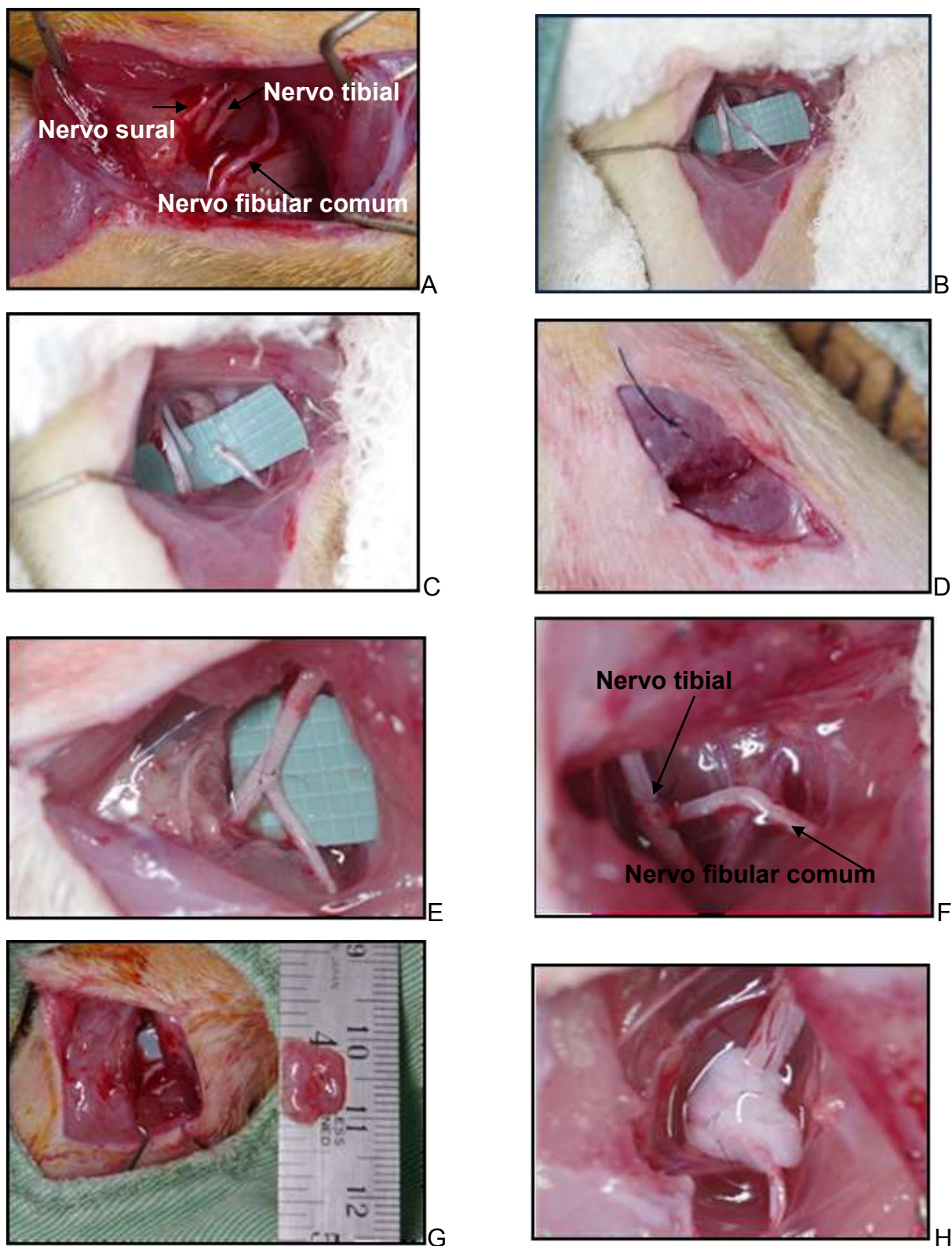


Figura 1 – A e B (grupo 1), A: nervos tibial e fibular comum identificados, B: nervos dissecados. C e D (grupo 2), C: secção do nervo fibular comum, D: inversão e fixação do coto proximal na superfície do músculo bíceps femoral. E e F (grupo 3), E: neurorrafia látero-terminal, F: neurorrafia sem tensão, outro exemplo. G e H (grupo 4), G: fáscia removida, H: fáscia envolvendo a neurorrafia látero-terminal.

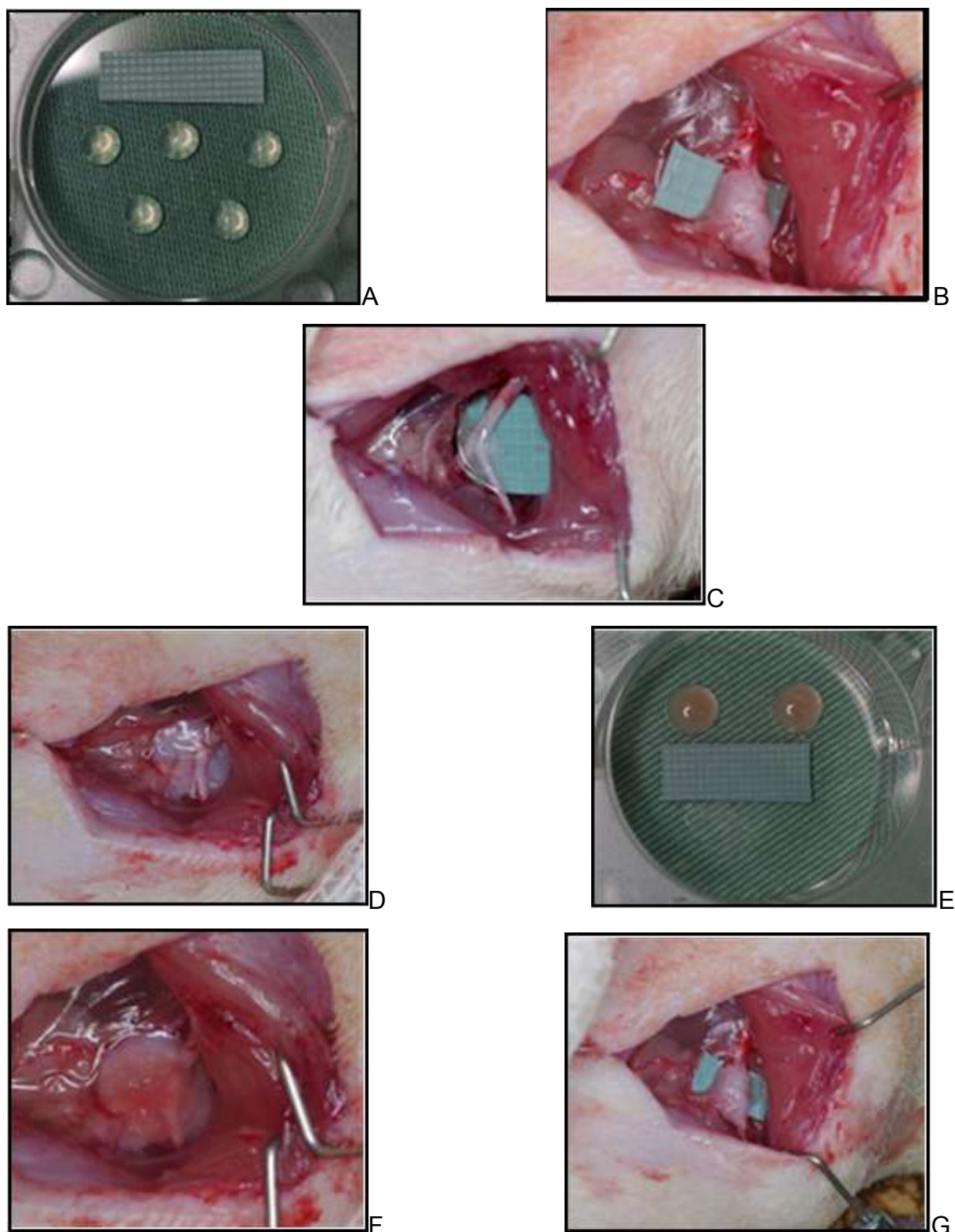


Figura 2 – A e B (grupo 5), A: gel de plaquetas preparado em moedas ou gotas. B: aspecto de neurorrafia látero-terminal no grupo 5, com o gel e recoberto pela fáscia. C (grupo 6): gel de plaquetas sobre a neurorrafia, sem fáscia. D, E, F e G (grupo 7), D: fáscia sob a neurorrafia, E: gel de plaqueta contendo células-tronco, F: gel de plaquetas contendo células-tronco sobre a neurorrafia, G: aspecto da neurorrafia envolta pela fáscia e gel de plaquetas contendo células-tronco.

3.2 Obtenção das Células-tronco mesenquimais (CTMs) e gel de plaquetas

Os animais do grupo 7 foram submetidos à anestesia com ketamina (0,3ml/kg, intramuscular) e xilasina (0,2ml/kg, intramuscular), fez-se uma incisão de 1cm na região inguino crural esquerda retirando-se um bloco de gordura com massa aproximada de 1g. A incisão foi fechada com fio monofilamentado de náilon 4-0.

O tecido foi assepticamente transferido para um recipiente contendo solução tampão fosfato e foi levado para o Laboratório de Biologia Molecular e Engenharia Celular, onde foi processado.

Na câmara de fluxo laminar em condições assépticas, o tecido foi lavado em solução tampão fosfato até a eliminação do conteúdo sanguíneo visível.

O tecido foi submetido à digestão enzimática por aproximadamente 12 horas, a 37°C, em solução contendo: 2ml por grama de tecido de meio de Dubelcco, 2mg/ml de collagenase tipo A, 20mg/ml de albumina sérica bovina e 124 microgramas/ml de penicilina. Decorrido o tempo de digestão, esta foi interrompida por adição de volume igual a 10% do total do soro fetal bovino, previamente inativado por aquecimento em banho-maria a 56°C, durante 20 minutos. A suspensão de células foi centrifugada por 5 minutos. O sobrenadante contendo a fração adipocitária foi desprezado e o precipitado, contendo a fração estroma-vascular, rico em células-tronco mesenquimais, foi resuspensa em DMEM contendo 10% de soro fetal bovino. As células mononucleares presentes foram contadas sob microscópio de luz invertida com auxílio de câmara de ThomaNeubauer pelo método de exclusão de células não viáveis coradas impregnadas pelo corante azul de tripano. As células foram microencapsuladas em gel de plaquetas de fibrina na proporção de 100.000 células por amostra e colocadas na neurorrafia de cada animal do grupo 7. Essa foi a média de células encontradas nas amostras e que poderia ser usada em todos os animais como padrão.

Piloto: no início do projeto, treze animais foram submetidos à retirada de fragmento da gordura inguinal direita para que esse processo acima descrito pudesse ser estabelecido. Uma amostra de cada um desses animais foi estocada. Durante a realização da citometria de fluxo, que será descrita adiante, essas células também foram usadas para identificação e caracterização das células-tronco mesenquimais.

Obtenção do gel de plaquetas

No laboratório de cirurgia experimental colheu-se o sangue de 10 ratos Wistar. Os animais foram inicialmente anestesiados com ketamina (0,3ml/kg, intramuscular) e xilazina (0,2ml/kg, intramuscular), e uma punção cardíaca permitiu a coleta de 9ml de sangue de cada animal. O sangue foi armazenado em um tubo com solução anticoagulante citrato-destrose (solução A), na proporção 1:10 (1ml de citrato + 9 ml de sangue volume: volume), como indicado por Everts et al. (2006).

Os tubos foram encaminhados ao Laboratório de Engenharia Celular, e em fluxo laminar todo o conteúdo foi separado em dois tubos de 50ml. Neste momento uma alíquota foi retirada de cada tubo para a dosagem de plaquetas (medida de plaquetas pré-centrifugação). O volume total de 100ml foi separado em tubos de 15ml, na medida de 10ml por tubo, para que fossem realizadas as centrifugações e obtenção do plasma rico em plaquetas (PRP).

A primeira centrifugação foi feita a 2400 rotações por minuto durante 10 minutos, após a qual se coletou o sobrenadante. O sobrenadante foi submetido a uma segunda centrifugação a 3600 rotações por minuto durante 15 minutos. A metade do volume do sobrenadante final foi descartado e a metade restante foi coletada junto com o pellet de plaquetas. Após estes procedimentos uma nova alíquota foi retirada para que se obtivesse a contagem de plaquetas pós-centrifugação (PRP). Todo o material foi congelado a -80°C para que fosse descongelado no momento de uso, ou seja, no momento de se produzir o gel de plaquetas, que foi usado imediatamente **Okuda et al. (2003)**. Todas as contagens de plaquetas foram realizadas por método automatizado no aparelho ABX Horiba™ Micros®.

Microencapsulação das CTMs em gel de plaquetas

As células foram microencapsuladas em gel de plaquetas na proporção de 100.000 células por amostra, adicionando-se PRP líquido sobre o botão de células, seguido de pipetagem para distribuição homogênea das células e adicionando-se gluconato de cálcio (40mM) e trombina (50U/cc). O coágulo se formou instantaneamente e, desta forma, uma amostra microencapsulada foi aplicada na neurorrafia de cada animal do grupo 7.

Viabilidade Celular

Para utilização das células-tronco obtidas, foi feita a avaliação da estimativa da viabilidade celular pela coloração do azul de tripano a 0,3%.

As células viáveis excluem o corante devido à integridade de sua membrana plasmática, aparecendo claras e brilhantes em microscopia óptica. As células mortas incorporam o corante em virtude da fragmentação/desnaturação de sua membrana plasmática, tornando-se maiores e escuras. O resultado é expresso em porcentagem de células viáveis segundo a fórmula:

$$\% \text{ Viabilidade celular} = \frac{\text{número de células vivas} \times 100}{\text{Número de células vivas} + \text{número de células mortas}}$$

Citometria de fluxo

A citometria de fluxo foi realizada no laboratório de Hematologia da UNESP/Botucatu, no aparelho BDFACSCalibur. Uma amostra das células implantadas em cada animal do grupo 7 e as treze amostras usadas no projeto piloto foram congelada para que fosse realizada a citometria de fluxo e, portanto, a caracterização das células-tronco mesenquimais.

As células passaram, uma a uma, por um sensor eletrônico de emissão de luz, sendo possível mensurar vários parâmetros citológicos, como tamanho, granulosidade e expressão ou não de determinados antígenos.

Os anticorpos foram marcados com fluorocromo. O isotiocianato de fluoresceína é o fluorocromo mais utilizado no Laboratório de Citometria de Fluxo do Hemocentro de Botucatu e foi o fluorocromo eleito para os anticorpos adquiridos. A ligação desses anticorpos marcados acontece através de ligações covalentes com estruturas/ receptores da membrana da célula e são detectados pelo sensor eletrônico do aparelho. Nesta análise, ainda é possível detectar-se parâmetros intrínsecos importantes como, por exemplo, o tamanho celular, identificando a

presença de populações mistas e caracterizando estas populações quanto à variação de tamanho e volume.

As alíquotas de células foram incubadas com os anticorpos já descritos. As suspensões celulares foram ajustadas a uma concentração entre 5×10^5 a 5×10^6 células/ml. A leitura foi realizada em citômetro de fluxo provido de laser de argônio a 480nm, de 15mw. O programa de leitura foi otimizado para análise das amostras e o volume aspirado de cada amostra foi de 100µl com taxa de fluxo de 50µl/minuto. A interpretação utilizou dois histogramas abaixo relacionados:

Histograma 1 – dispersão de luz dianteira, FS (foreside scatter) X e logaritmo da dispersão lateral LSS (logarithm side scatter), 64 x 64 canais, no qual a população a ser estudada é graficamente delimitada por um bitmap.

Histograma 2 – utiliza-se a contagem de células (count-eventos) X o logaritmo da fluorescência, LFL1 (logarithm fluorescence), 1024 x 1024 canais. As concentrações dos anticorpos foram preparadas segundo as recomendações dos respectivos fabricantes.

No quadro abaixo estão relacionados os marcadores de superfície usados para caracterizar as células-tronco mesenquimais usadas nesse estudo.

Quadro 2 - Padrão negativo e positivo dos diferentes marcadores de superfície usados na imunofenotipagem por citometria de fluxo das células-tronco mesenquimais obtidas.

Marcador		Descrição	Reconhecimento
P A D R Ã O N E G A T I V O	CD31	Mouse PE anti-rat BD Pharmigen™	PECAM-1 - <i>platelet endothelial cell adhesion molecule</i> . Muito expresso em células endoteliais e plaquetas, fracamente expresso em leucócitos.
	CD34	Rabbit FITC anti-rat Biorbyt™	Células-tronco hematopoiéticas e células endoteliais.
	CD40	FITC Hamster anti-rat BD Pharmigen™	Reconhece glicoproteína expressa em linfócito B e relaciona-se com estágios efetores da resposta imune mediada por células.
	CD44	RPE Mouse anti-rat AbD Serotec™	Linfócito T, B, macrófago e timócito.
	CD45	FITC Mouse anti-rat BD Pharmigen™	Panleucocitário, (<i>Leukocyte Common Antigen</i>), expresso em todas as células hematopoiéticas, exceto eritrócito.
	CD11b	Biotin Mouse anti-rat BD Pharmigen™	Reconhece a subunidade da Mac-1 expressa em neutrófilos e células mielóides, mas não se expressa em linfócitos.
P A D R Ã O P O S I T I V O	CD71	FITC Mouse anti-rat BD Pharmigen™	Reconhece receptores de transferrina expresso em células em proliferação, incluindo células-tronco e em endotélio do cérebro.
	CD73	Purified Mouse anti-rat BD Pharmigen™	Ecto-5'-nucleotidase. Reconhece uma proteína de transdução de sinal ligada à membrana. Se expressa em fígado, rim, córtex da adrenal, baço, músculo, tecido nervoso, cardíaco e células-tronco.
	CD90	FITC Mouse anti-rat BD Pharmigen™	Reconhece moléculas Th1 expressas em Células-tronco mesenquimais e hematopoiéticas.
	CD105	PE Mouse anti-rat Life Technology™	Endoglin - Receptor de TGFβ sobre células-tronco
	CD106	Purified Mouse anti-rat PE - BD Pharmigen™	Reconhece molécula de adesão, transmembrana da parede do endotélio (V-CAM-1), células dendríticas, mas não se expressa em leucócitos.

Fonte: arquivo pessoal, Professora Elenice Deffune, Laboratório de Hematologia, UNESP, 2015.

O quadro 2 registra os dois padrões de positividade e negatividade esperados com o painel de anticorpos comerciais adquiridos para a realização da imunofenotipagem por citometria de fluxo. Como padrão negativo foram escolhidos os marcadores CD31, CD34, CD40, CD44, CD45 e CD11b. No entanto, alguns

desses marcadores poderão expressar positividade pela presença de células sanguíneas e de paredes de vasos, obtidas no momento da coleta do material. Os marcadores CD11b, CD31, CD40, CD45, CD71, CD73, CD90 e CD106 foram adquiridos da BD Pharmingen™. Outros três anticorpos foram adquiridos de fornecedores diferentes pela inexistência de marcadores de mesma origem. O anti-CD34 foi adquirido da Biorbyt™, o CD44 da AbD Serotec™, enquanto que o CD105 foi comprado da *Life Technology*™. Todos os anticorpos foram controlados por seus respectivos controles isotípicos.

Foi estabelecido um padrão de leitura conforme o percentual da porcentagem de imunofluorescência do marcador, após eliminar o percentual de autofluorescência encontrado nas células do controle (aquelas que não receberam anticorpos específicos), respeitando as orientações da International Clinical Cytometry Society e de Gratama et al. (1998) na sua publicação *Flow cytometric quantitation of immunofluorescence intensity: problems and perspectives*.

Quadro 3 - Padrão de reatividade das células linfomononucleares de rato frente a diferentes marcadores de superfície (CDs), pela técnica de citometria de fluxo.

Padrão do teste	Nível de Expressão dos Marcadores	Média da Intensidade de Fluorescência
POSITIVO	Alto	≥ 50%
	Médio	≥ 15 <50%
	Baixo	≥ 5 <15%
NEGATIVO	Muito baixo	< 5%

Fonte: adaptado de Gratama et al., 1998

Diferenciação Celular

Uma amostra das células-tronco mesenquimais foi cultivada no intuito de demonstrar a diferenciação dessas células nas linhagens adipogênica, osteogênica e condrogênica.

Osteogênica e adipogênica: foram usadas cerca de 2.000 a 5.000 células/cm², colocadas em placa de cultura de 6 poços. As células ficaram submersas em DMEM por 24 horas. Os meios indutores (StemPro) foram usados nas culturas celulares por 14 dias, sendo realizadas três trocas do meio por semana. A coloração osteogênica utiliza foi Alizarin Red, e a coloração adipogênica utiliza foi Oil Red.

Condrogênica: foram usadas cerca de 1.000.000 células/cm², colocadas em um tubo falcon de 15ml. Como os condrócitos necessitam de meio tridimensional, a diferenciação ocorreu em *pellet*. As células ficaram embebidas em DMEM durante 24 horas. O meio indutor (StemPro) foi usado durante 21 dias, sendo trocado três vezes por semana. A coloração usada foi o Azul de toluidina.

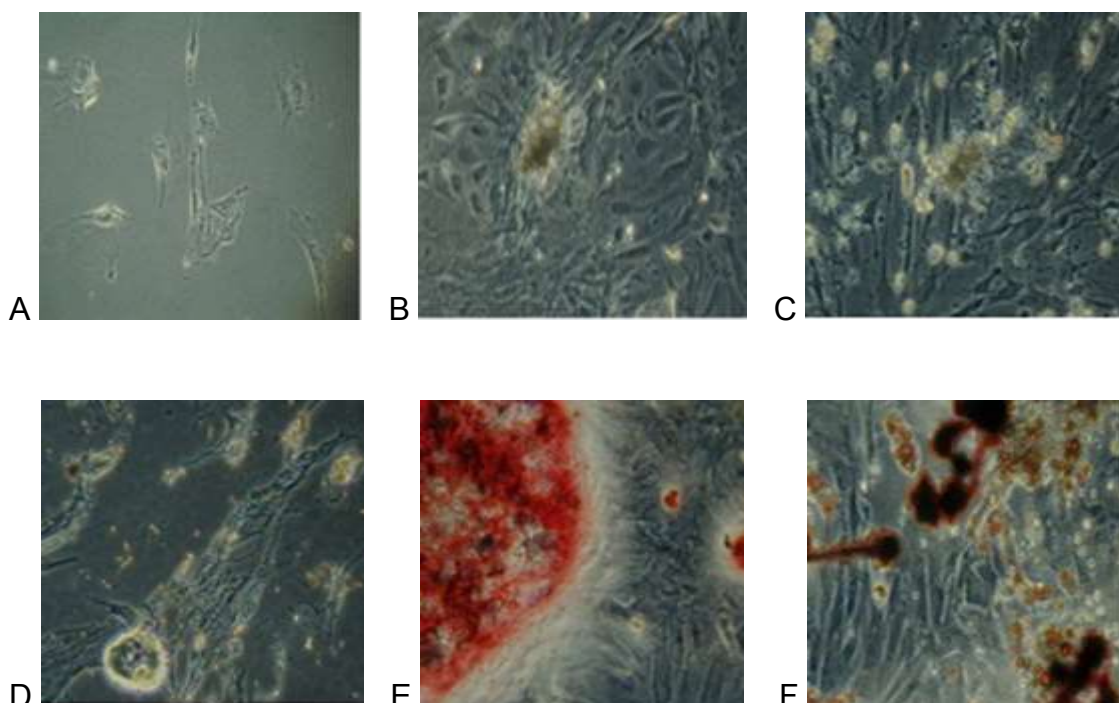


Figura 3 - A: Controle, 7 dias de cultura. B: CTMs com meio osteogênico, 7 dias de cultura. C: CTMs com meio adipogênico, 7 dias de cultura. D: Controle corado, 14 dias de cultura. E: Células osteogênicas coradas com Alizarin Red, 14 dias de cultura. F: Células adipogênicas coradas com Oil Red, 14 dias de cultura. Aumento de 20X.



3.3 Avaliações realizadas em cada animal

1. Massa inicial e final dos animais.
2. Massa dos músculos tibial cranial direito e esquerdo.
3. Perimetria dos membros posteriores direito e esquerdo.
4. Estudo eletrofisiológico do MTC.
5. Avaliação da marcha com 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias (*Walking Track*).
6. Avaliação automatizada da marcha com 180 dias (*CatWalk*).
7. Força de contração do músculo tibial cranial.
8. Histologia do músculo tibial cranial e do nervo fibular comum.

Após 180 dias de observação iniciou-se o processo de análise dos resultados. Para todas as medições optou-se por dois dígitos após a vírgula.

3.3.1 Massa dos animais no início e no final do experimento.

Os animais foram anestesiados e as massas foram aferidas em balança de precisão antes do experimento e na data do sacrifício.

3.3.2 Massa dos músculos tibial cranial direito e esquerdo

Os músculos foram removidos após todos os testes e após o sacrifício dos animais. Suas massas foram aferidas em balança de precisão e congeladas em nitrogênio líquido.

3.3.3 Perimetria dos membros posteriores direito e esquerdo

A perimetria do membro pélvico dos animais foi obtida com os animais acordados após serem acomodados em uma cápsula metálica com abertura posterior para a cauda e duas aberturas laterais para fixação dos membros posteriores, antes de serem anestesiados. Outra medida da perimetria foi feita, após

serem anestesiados, na mesma posição, fora da cápsula, pois os animais estavam anestesiados e não regiram com contratura muscular o que normalmente dificulta a medição da perimetria. As duas formas de se medir a perimetria do membro posterior do animal foram realizadas na região onde está o músculo tibial cranial direito afetado pela secção do nervo fibular comum. Os grupos foram comparados quanto à possível recuperação da massa muscular do músculo tibial cranial direito através da medição da perimetria do membro.

Um molde serviu para padronizar o posicionamento. Para este procedimento foi usado fio de algodão e paquímetro. O fio de algodão foi envolto no centro da perna do animal, entre as articulações com o fêmur e com o tarso. As extremidades do fio foram cortadas na região em que se cruzavam, sobrando, assim, exatamente o segmento de fio que envolveu a região de interesse. Esse fio foi embebido em gel e medido com o paquímetro.

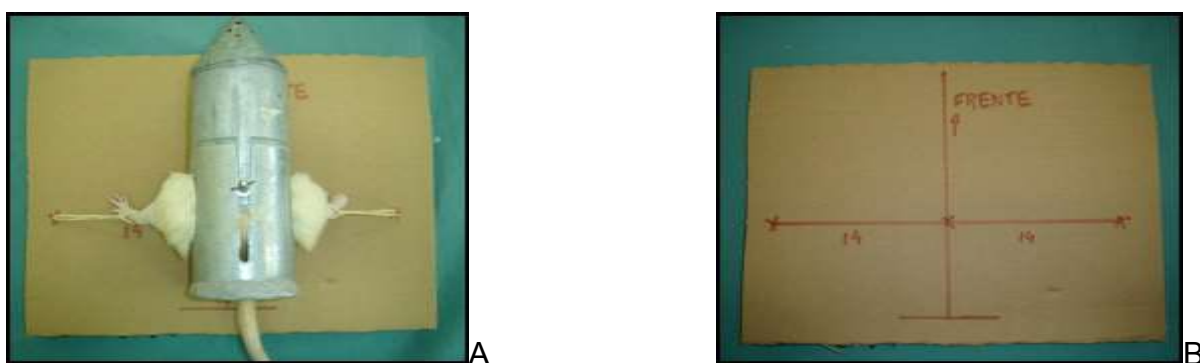


Figura 4 - A: posicionamento do animal na cápsula metálica. B: molde para posicionamento do animal.

3.3.4 Estudo eletrofisiológico dos músculo tibial cranial direito

Para esse estudo foi usado eletromiógrafo da marca Sapphire II 4ME. Após a anestesia, conforme descrito anteriormente, os animais foram imobilizados em decúbito ventral e foram feitas tosquia e antissepsia dos membros posteriores. A incisão no membro posterior direito expôs os nervos ciático, fibular comum e tibial, além do músculo tibial cranial.

No centro do músculo tibial cranial foi implantado o eletrodo ativo (preto), o eletrodo de referência (vermelho) foi implantado próximo ao tendão de inserção do músculo e o eletrodo cinza (dispersivo) introduzido em um local distante da região do teste, no tronco. O eletrodo de estimulação bipolar que deflagrou o impulso elétrico foi posicionado diretamente sobre o nervo ciático, de modo que a estimulação fosse feita proximal à neurorrafia, possibilitando a propagação dos impulsos elétricos através da neurorrafia.

Os eletrodos registraram em conjunto amplitude e latência do potencial de ação muscular em cada estímulo dado.

As medições foram realizadas em três momentos:

1. Primeiro momento: SEIS medidas (latência e amplitude) com o nervo tibial intacto.
2. Segundo momento: SEIS medidas após a secção do nervo tibial pós neurorrafia.
3. Terceiro momento: SEIS medidas após a secção do nervo sural.
4. O nervo fibular comum permaneceu intacto.

Para cada momento foi escolhida a medida de maior valor da amplitude (Maciel, 2012). Além disso, a frequência do estímulo foi de 1pps e duração de 100 μ s. A intensidade do estímulo foi fixada em 5,1 volts.

3.3.5 Avaliação da marcha pelo teste de “Walking Track”

O teste de avaliação da marcha, “*Walking Track*” foi realizado no 30°, 60°, 90°, 120°, 150° e com 180° dias. Para esse teste as patas traseiras de cada animal foram umedecidas em tinta nanquim preta e os animais andaram por um corredor de 78 X 9cm, sobre uma folha de papel branco onde ficaram impressas as marcas das patas. Estas marcas das pegadas foram analisadas através da distância do calcanhar aos dedos (PL); distância entre o primeiro e o quinto dedos (TS) e a distância entre o segundo e o quarto dedos (IT). Desta forma foram avaliados o índice funcional do nervo ciático (IFC), o índice funcional do nervo tibial (IFT) e o índice funcional do nervo fibular comum (IFFC) (De Medinacelli et al., 1982; Bain et al., 1989).

Foi usada a medida de 6mm (para as distâncias entre o primeiro e quinto dedo e para a distância entre o segundo e quarto dedo) para quando não fosse possível realizar a distância entre os dedos (De Medinacelli et al., 1982; Bain et al., 1989)

Equações usadas para os cálculos dos índices funcionais:

$$IFC = -38,3 \times \frac{(EPL - NPL)}{NPL} + 109,5 \times \frac{(ETS - NTS)}{NTS} + 13,3 \times \frac{(ETI - NIT)}{NIT} - 8,8$$

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

$$IFT = -37,2 \times \frac{(EPL - NPL)}{NPL} + 104,4 \times \frac{(ETS - NTS)}{NTS} + 45,6 \times \frac{(ETI - NIT)}{NIT} - 8,8$$

NPL (“Normal print length”): tamanho da pegada, do calcanhar aos dedos do pé normal.

EPL (“Experimental print length”): tamanho da pegada do pé experimental.

NTS (“Normal toe spread”): abertura total do pé normal ou a distância entre o primeiro e o quinto dedos.

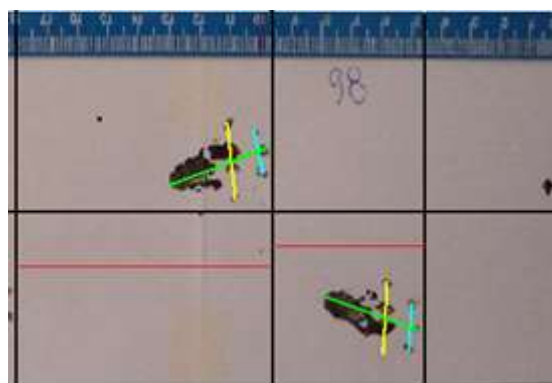
ETS (“Experimental toe spread”): abertura total do pé experimental.

NIT (“Normal intermediary toe spread”): abertura entre os dedos intermediários do pé normal ou distância entre o segundo e o quarto dedos.

EIT (“Experimental intermediary toe spread”): abertura entre os dedos intermediários do pé experimental.



A



B

Figura 5 - A: animal percorrendo o corredor. B: impressão deixada no papel.

3.3.6 Avaliação da marcha pelo teste de “CatWalk”

Através do CatWalk realizou-se o estudo das pegadas e marcha do animal, de forma estática e dinâmica, baseadas em duração, orientação e coordenação dos movimentos entre as patas. Trata-se de um sistema de análise automatizado da marcha, no qual os animais foram colocados para andar em uma plataforma de vidro iluminada, o contato da pata com a superfície do vidro resultou em uma imagem nítida e brilhante da pegada.

A plataforma de vidro foi monitorizada por uma câmara de vídeo colocada sob a plataforma e ligada a um computador equipado com um software de aquisição de vídeo e análise das pegadas.

Os critérios adotados para que uma caminhada fosse considerada adequada para o experimento foram:

1. Que a caminhada durasse ao menos 0,50 segundos.
2. Que a caminhada não excedesse 10 segundos em tempo.
3. Que o número mínimo de pegadas fosse de quatro, completas.
4. Pegadas incompletas nesse tempo e nesse percurso foram descartadas.
5. A variação na velocidade permitida foi de 60%.

Esses critérios são pré-estabelecidos no programa do “CatWalk” e podem ser mudados conforme a conveniência de cada experimento.

A intensidade do sinal depende da área da pata em contato com a plataforma e aumenta com a pressão aplicada pela pata.

Os parâmetros avaliados foram:

1. Índice funcional do tibial
2. Índice funcional do fibular
3. Índice funcional do ciático
4. Índice de regularidade
5. “Stand”, fase de apoio ou duração do contato da pata com o vidro
6. “Stand index” ou velocidade em que a pata perde o contato
7. Contato ou medida da área do contato máximo
8. Intensidade máxima do contato máximo
9. Área da pegada
10. Avaliações de intensidade
11. “Swing” ou balanço: duração de não contato com o vidro

12. “Swing speed” ou velocidade da pata durante o “swing”
13. “Stride length” ou distância entre pegadas da mesma pata
14. “Step cycle” ou tempo em segundos entre dois contatos da mesma pata
15. “Duty cycle”: expressa a fase de apoio, é uma porcentagem do “step cycle”
16. Base de suporte
17. Posição das pegadas

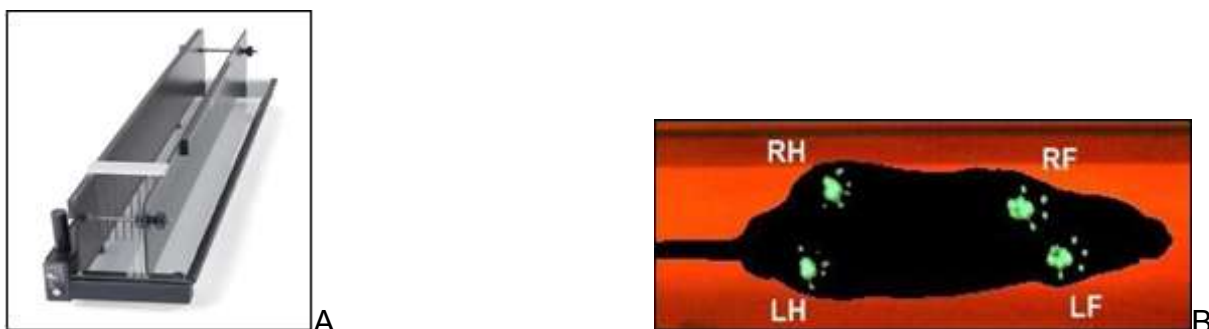


Figura 6 - A: corredor pelo qual o animal anda. B: imagem captada pela câmera abaixo do corredor.

3.3.7 Força máxima de contração do músculo tibial cranial

O tendão distal do músculo tibial cranial foi seccionado na sua inserção. Um fio de náilon 4.0 foi suturado nesse tendão e a outra extremidade foi amarrada a um pequeno gancho ligado a um transdutor de força FT03 (Grass Technologies). O comprimento do músculo foi mantido por um pré-tensionamento com carga de 0,18N e foi reajustado entre os testes. Este valor de pré-tensionamento foi determinado durante a calibração do dispositivo. Um estimulador elétrico Neurodyn de 10 canais da (Ibramed) foi posicionado diretamente no músculo exposto. O ensaio de contração muscular consistiu de três aplicações sequenciais de 1s. Um computador registrou os picos de força. A tensão muscular foi reajustada entre as medições.

O teste de contração tetânica foi realizado com 100mA e frequência de 100Hz. Esse estímulo foi o mesmo, no músculo tibial cranial direito e no nervo fibular comum direito em cada animal. A força máxima de contração do músculo tibial cranial direito foi medida através da estimulação direta sobre o músculo tibial cranial direito e também sobre o nervo fibular comum direito antes da neurraxia nos grupos de 3 a 7 e sobre o coto distal do nervo fibular comum no grupo 2.

3.3.8 Coleta das amostras e análise histológica e morfométrica

No **G1** foram coletadas a amostra do nervo fibular comum direito (**N1**) e os músculos tibiais cranial direito e esquerdo (**M**). No **G2** foram coletadas amostra do coto proximal (**N2**), amostra do nervo fibular comum distal à secção nervosa (**N1**) e os músculos tibiais craniais direito e esquerdo (**M**). De **G3 a G7** foram coletados o segmento do coto proximal (**N2**), amostra do nervo fibular comum distal à neurorrafia látero-terminal (**N1**), o segmento correspondente à neurorrafia (**N3**), assim como os músculos tibiais craniais direito e esquerdo (**M**). Após a coleta das peças, os animais receberam dose letal de pentobarbital sódico, via intraperitoneal. As meças N1 e N3 tinham cerca de 0,5cm, N2 tinha cerca de 0,5cm incluindo tecido conjuntivo adjacente.

Processamento das amostras dos músculos: os músculos tibiais craniais foram congelados em nitrogênio líquido e submetidos a secções transversais de 7µm em criostato Leica CM 1850. As secções foram feitas na região central do músculo, em sentido transversal. Foram feitos quatro cortes para a escolha do melhor, os cortes foram corados pela técnica de Hematoxilina-Eosina (HE).

Todas as lâminas foram escaneadas no scanner de Imagens Apério ScanScope, 2003, Leica Biosystems (versão V11.2.0.780) do Hospital AC Camargo em São Paulo. Após escaneadas, as lâminas (uma para cada animal) foram analisadas pelo programa do mesmo aparelho. Cinco campos foram escolhidos sob o aumento de 10 vezes, um em cada quadrante e um campo central, de cada corte histológico, todas as fibras desses campos foram analisadas. As imagens foram salvas e analisadas quanto às medidas de área e diâmetro mínimo das fibras musculares sob aumento de 20X.

Processamento das amostras de nervos: os fragmentos nervosos de N1 e N2 foram fixados em Karnovisk e preparados através do uso de historesinas no laboratório de patologia da UNIPEX (UNESP/Botucatu). O micrótomo fez secções transversais nos fragmentos N1 e longitudinais nos fragmentos de N2 com espessura de 0,5 micra.

Os fragmentos nervosos submetidos a cortes longitudinais (N2) foram corados com a coloração de prata de Bielschowsky. Os fragmentos nervosos submetidos a cortes transversais (N1), foram corados com azul de toluidina a 0,25%.

Todas as lâminas foram escaneadas pelo scanner de lâminas Pannoramic Viewer, 2012, 3DHISTECH Ltda. (versão 1.15.3) do laboratório de Patologia da UNESP. As lâminas foram analisadas pelo programa do mesmo equipamento.

Nas lâminas digitalizadas foi feita a contagem do número de fibras nervosas, medida de área das fibras nervosas, área do axônio e da bainha de mielina, diâmetro mínimo dos axônios e da fibra nervosa, espessura da bainha e razão G. Cinco campos foram analisados em cada lâmina, um em cada quadrante e um campo central, todas as fibras nervosas nesses campos foram analisadas, em um aumento de 400 vezes.

Os segmentos correspondentes a N3 foram fixados em formol 10% tamponado e encaminhados ao laboratório de histologia do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP onde foram emblocadas em parafina. Os cortes foram longitudinais de 0,3 micras.

Uma lâmina corada por hematoxilina e eosina (HE) foi feita do segmento N3 de cada animal dos grupos de 3 a 7 a fim de se observar o brotamento do nervo doador para o nervo receptor. Outras quatro lâminas foram destinadas ao estudo imunoistoquímico.

Estudo Imunoistoquímico

Cinco animais de cada grupo de 3 a 7 foram escolhidos aleatoriamente em cada grupo. Para cada um desses animais foram confeccionadas quatro lâminas, cujos cortes foram estendidos em lâminas siladas. Os anticorpos utilizados para o estudo imunoistoquímico foram: CD105 usado para avaliar a formação de rede de neovasos, CD34 para avaliar a vascularização existente, a proteína S100 para avaliar a presença de células de Schwann, CD90 usado para tentar identificar células-tronco mesenquimais. A técnica de imunoistoquímica foi automatizada.

Protocolo da Reação de Imunoistoquímica:

- 1) Desparafinização em xilol, passagem em etanol e hidratação.
- 2) Bloqueio da peroxidase endógena em água oxigenada 3% por 5 minutos.

- 3) Recuperação antigênica em citrato de sódio 0,21% (pH 6.0) em câmara de pressão (PASCAL - DAKO) por 3 minutos.
- 4) Incubação com o anticorpo primários (CD34 1:50 BIOR BYT ORB27549), (CD105 1:100 BIOR BYT ORB10285), (S100 1:100 NOVUS BIOLOGICAL NB100-91955), (CD90- HIS51 1:50 NOVUS BIOLOGICAL NBP200312) por 30 minutos.
- 5) Incubação com os anticorpos secundários (Conjugado Anti-Mouse/Anti-Rabbit) por 10 minutos e terciário utilizando-se o método de detecção por polímeros por 10 minutos (CELL MARQUE 954D).
- 6) Revelação com o cromógeno 3,3-diaminobenzidina por 5 minutos (CELL MARQUE 957D).
- 7) Contra-coloração com hematoxilina segundo Harris por 1 minuto.
- 8) desidratação em etanol, diafanização em xilol e montagem em resina sintética.

Quadro 4 - Especificações dos anticorpos utilizados:

AC	Clone	Diluição	Fabricante	Imunoexpressão
S100	Policlonal de Coelho	1:100	Novus Biologicals	Células de Schwann
CD34	ORB27549	1:50	Biorbyt	Endotélio Vascularização
CD90	HIS51	1:50	Novus Biologicals	Células-Tronco Mesenquimais
CD105	ORB10285	1:100	Biorbyt	Neovascularização

A leitura do Estudo Imunoistoquímico e lâminas coradas pela HE do segmento N3 foi realizada por dois pesquisadores simultaneamente: a pesquisadora principal e uma patologista (MACD), com microscópio binocular.

Escore de Leitura do Estudo Imunoistoquímico

Para leitura do estudo imunoistoquímico utilizou-se um escore da reação dos marcadores S100, CD34, CD90 e CD105. Para a intensidade a variação foi de 0 a 3. Para o resultado zero (0), não houve nenhuma reação. Para resultado um (1), a reação foi de fraca intensidade. Para dois (2), a reação foi de moderada intensidade. Para três (3) a reação foi de forte intensidade.

Quanto à extensão a variação foi de 0 a 3. Considerou-se zero (0) quando não houve reação. Resultado um (1) quando a extensão foi de até um terço da lâmina, resultado dois (2) quando a extensão foi de um a dois terços da lâmina e resultado três (3) se a extensão da reação foi vista acima de dois terços da lâmina.

Leitura das lâminas coradas em HE

Realizou-se avaliação morfológica semiquantitativa de 0 a 4 cruces para os elementos avaliados: vasos, hemorragia, edema e reação inflamatória. Em que zero (0) foi a ausência dos elementos avaliados, um (1) quantidade discreta, dois (2) quantidade moderada e três (3) grande quantidade e (4) quantidade intensa dos elementos avaliados.

Avaliou-se o tipo de células presentes na reação inflamatória. E na observação do granuloma o critério adotado foi presença ou ausência.

3.4 Análise estatística

Para a análise estatística, os grupos foram comparados pela análise de variância ANOVA e, quando essa análise detectou diferença significativa, foi aplicado o teste de Tukey para as comparações múltiplas entre as médias. Foi considerado significativo um $p < 0,05$.

Para a análise do número de células encontradas nas amostras dos segmentos do nervo fibular comum, colhidas após a neurografia, usou-se o ajuste de um modelo linear generalizado com distribuição binomial negativa (dados de contagem) seguido do teste de comparação múltipla de Wald devido à grande dispersão dos dados.

Para a análise de área de axônio, área da fibra nervosa, diâmetro mínimo da fibra nervosa, diâmetro mínimo do axônio e área da mielina, usou-se a análise com distribuição gama e o teste de Wald para comparação múltipla, o mesmo para latência, pois a distribuição foi assimétrica.

Para a análise da espessura da mielina na fibra nervosa, usou-se ANOVA e teste de Tukey, pois a distribuição foi simétrica.

Para a análise da razão G foi usado o teste de Kruskal-Wallis devido à falta de normalidade da distribuição, considerando-se $p < 0,05$.

As análises de perímetro, diâmetro mínimo e área da fibra muscular dos músculos tibiais craniais foram feitas através de ANOVA.

No segmento de nervos da neurografia (N3) em que se analisou edema, hemorragia e vasos em lâminas coradas pelo HE, e, para a análise dos resultados das lâminas estudadas através de imunoistoquímica foi utilizado o teste não paramétrico da Mediana, tomando-se $p < 0,05$ como significativo.

Para a análise do granuloma no segmento N3 usou-se teste de associação de Mantel-Haenszel, considerando-se $p < 0,05$.

4 Resultados

Durante o experimento sete animais morreram. No grupo 1, um dos animais foi perdido na anestesia. No grupo 2, dois animais morreram durante a anestesia. No grupo 3, dois animais morreram: um deles durante a perimetria, dentro da cápsula o outro durante o seguimento. No grupo 4, um animal morreu durante o seguimento. Nos grupos 5 e 6, nenhum animal foi perdido. No grupo 7, um animal morreu durante a anestesia.

4.1 Sobre as células-tronco retiradas da gordura inguinal

Tabela 1 - Peso da gordura removida da região inguinal, número de células e a viabilidade das células em cada amostra de animal do grupo 7.

Animal	Peso da gordura inguinal (g)	Células por amostra	Viabilidade Celular %
1	1,16	$4 \cdot 10^6$	90,90
2	1,42	$2,4 \cdot 10^6$	100
3	1,16	$2,8 \cdot 10^6$	93,33
4	1,1	$2,8 \cdot 10^6$	88,89
5	1,55	$4 \cdot 10^6$	90,90
6	1	$2,6 \cdot 10^6$	86,6
7	1,5	$2,8 \cdot 10^6$	82,35
8	1,5	$2 \cdot 10^6$	100
9	1,6	$2,4 \cdot 10^6$	92,4
10	1,3	$1,8 \cdot 10^6$	100
11	0,8	$2,8 \cdot 10^6$	87,50
12	1,1	$3,2 \cdot 10^6$	94,12
13	1,4	$1,8 \cdot 10^6$	100
14	1,3	$1,6 \cdot 10^6$	100
15	1,1	$3,4 \cdot 10^6$	89,47
16	1,1	$1,6 \cdot 10^6$	100
17	1,1	$1,6 \cdot 10^6$	88,88
18	1,3	$2,2 \cdot 10^6$	100
19	1,6	$1,4 \cdot 10^6$	100
20	1	$3,2 \cdot 10^6$	84,21
Média	1,23 g	$2,5 \cdot 10^6$	92,86%
Desvio padrão	0,23	0,78	6,16

Caracterização das células-tronco pela citometria de fluxo.

As células-tronco removidas da gordura inguinal dos 33 animais foram caracterizadas pela citometria de fluxo para determinação de seu fenótipo. O número de células é mostrado para cada um dos animais. Em vermelho foi calculada a média de eventos por amostra para a citometria.

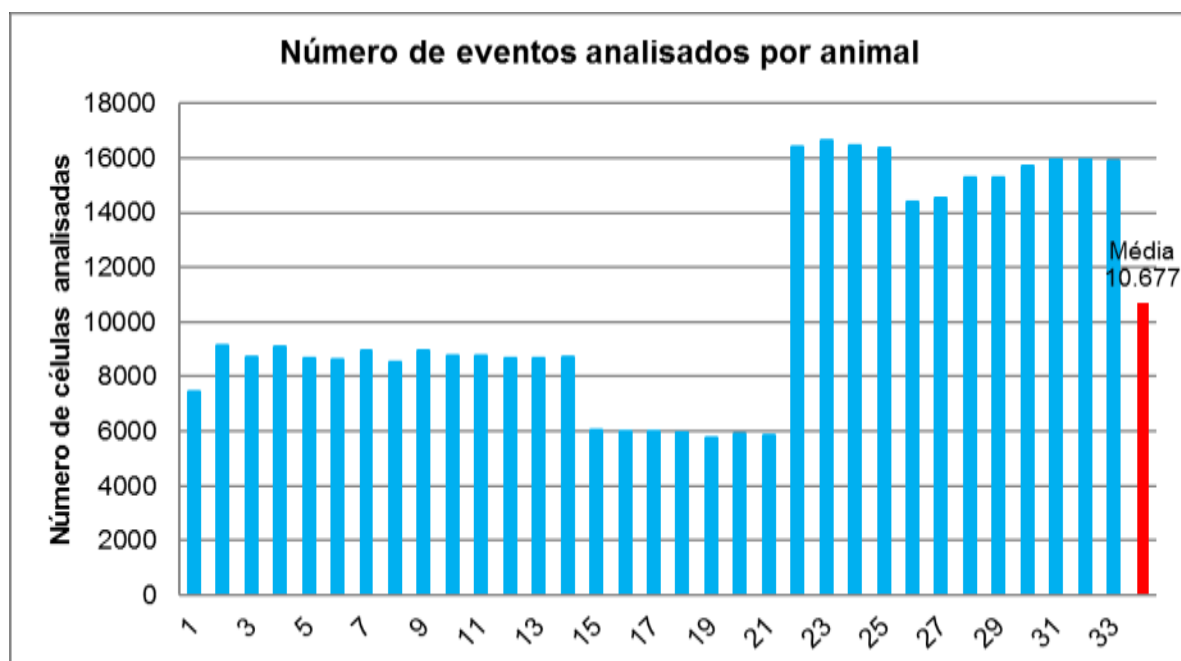


Figura 7 - Gráfico do número de eventos analisados, por citometria de fluxo, na técnica de imunofenotipagem.

Observa-se que as amostras, de cada animal, foram analisadas com um número médio de eventos (considerados células e partículas ou microagregados), de 10.677, dentro do padrão de excelência para a interpretação dos dados. A média de intensidade de fluorescência (controle negativo) das amostras foi de 0,93%. Este dado foi utilizado para normalizar os valores obtidos com cada marcador.

Os marcadores que caracterizaram as células-tronco estão na figura e quadro abaixo.

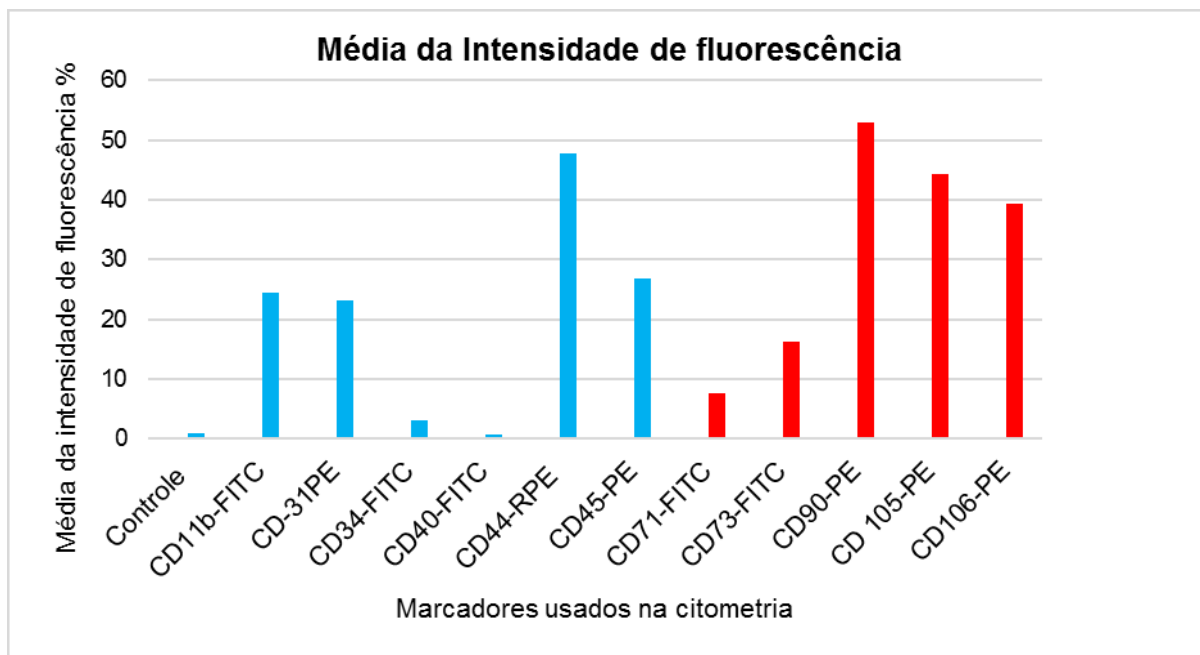


Figura 8 - Gráfico da média da intensidade de fluorescência (%), nas 33 amostras analisadas. Em azul os marcadores de padrão negativo e em vermelho os marcadores de padrão positivo.

Quadro 5 - Avaliação percentual da expressão dos diferentes marcadores utilizados, CD11b, CD31, CD34, CD40, CD44, CD45, CD71, CD73, CD90, CD105 e CD105 nas amostras de 33 animais estudados, segundo o nível de expressão destes marcadores.

Nível de Expressão dos Marcadores		Alto	Médio	Baixo	Negativo
	MIF (%)	≥ 50	≥15 e < 50	≥5 < 15	< 5
	CONTROLE	0	0	0	33(100%)
Padrão negativo	CD11b	2(6%)	26(78,7%)	5(15,15%)	0
	CD31	1(3%)	17(51,5%)	14(42,42%)	1(3%)
	CD34	0	0	2(6,06%)	31(93,93%)
	CD40	0	0	0	33(100%)
	CD44	17(51,51%)	16(46,48%)	0	0
	CD45	1(3,03%)	28(84,8%)	2(6,06%)	2 (6,06%)
Padrão positivo	CD71	0	1(3%)	24(72,72%)	8(24,24%)
	CD73	0	19(57,57%)	14(42,42%)	0
	CD90	13(39,39%)	20(60,60%)	0	0
	CD105	12(36,36%)	21(63,63%)	0	0
	CD106	8(24,24%)	24(72,72%)	1(3%)	0

MIF: % da média de imunofluorescência.

A seguir, serão apresentadas as tabelas com os diversos atributos.

Para demonstrar as comparações estatísticas em todos os resultados que serão mostrados foram usadas **letras maiúsculas e minúsculas**. Médias seguidas de **mesma letra minúscula** não diferiram significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5%, quando comparados os lados dentro do mesmo grupo. Médias seguidas de **mesma letra maiúscula** não diferiram significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5%, comparando os grupos entre si.

4.2 Massa dos animais no início e no final do experimento.

A Tabela abaixo mostra a média (g), desvio padrão, mediana, valor mínimo e máximo das massas dos animais no início e no final do experimento.

Tabela 2 - Massa dos animais (g) antes e após o experimento.

Grupos	Massa (g) dos animais antes		Massa (g) dos animais após	
	Média / dp	Mediana min/max	Média / dp	Mediana min/max
G1 Controle	276,95 ± 28,37 A	286,50 (189/309)	461,00 ± 50,21 B	439,38 (405/558)
G2 Desnervado	265,28 ± 34,00 A	281 (187/302)	464,80 ± 66,25 B	452,50 (351/643)
G3 Neurorrafia	279,90 ± 29,52 A	286 (183/309)	467,27 ± 72,99 B	470 (325/580)
G4 Fáscia	271,05 ± 26,14 A	269 (235/309)	490,18 ± 51,62 B	477 (413/590)
G5 Gel de plaquetas	279,25 ± 19,47	281,5 (239/304)	492,45 ± 43,27 B	480,5 (428/602)
G6 Gel e fáscia	273,95 ± 23,48 A	275,5 (229/312)	483,32 ± 53,33 B	479 (390/596)
G7 Célula-tronco	271,3 ± 17,98 A	272 (240/301)	495,55 ± 38,94 B	501,5 (428/587)

Massa antes do experimento: G1=G2=G3=G4=G5=G6=G7

Massa após o experimento: G1=G2=G3=G4=G5=G6=G7

ANOVA e teste de Tukey foram usados para essa comparação, admitindo-se $p < 0,05$.

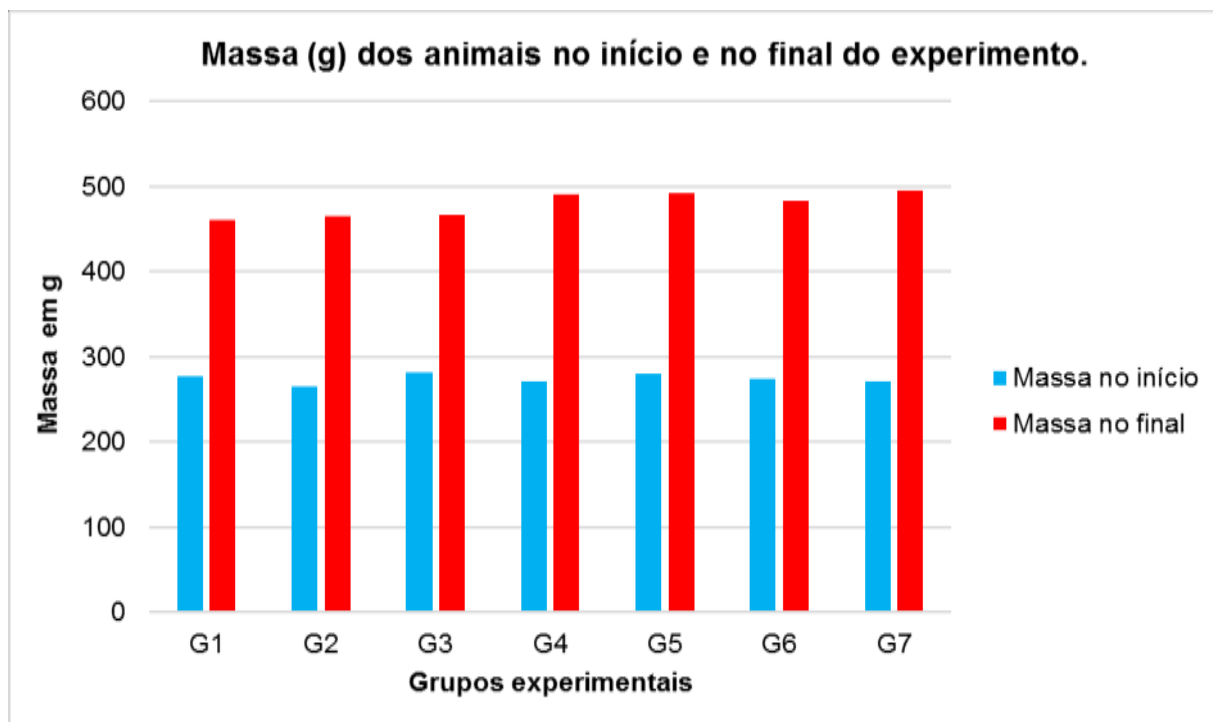


Figura 9 - Gráfico da massa (g) dos animais no início (em azul) e no final do experimento (em vermelho).

Os grupos de 1 a 7 não mostraram diferença estatística entre si quando comparados quanto à massa dos animais antes e após o experimento. A massa inicial dos animais variou de 183g a 312g, a massa final variou de 325g a 643g.

4.3 Massa dos músculos tibial cranial direito e esquerdo

A Tabela abaixo mostra a média (g), desvio padrão, mediana, valor mínimo e máximo das massas dos músculos tibiais craniais direitos (lado do experimento) e músculos tibiais craniais esquerdos (lado normal) ao final dos experimentos.

Tabela 3 - Massa (g) dos músculos tibiais craniais direito e esquerdo.

Grupos	Massa do músculo tibial cranial direito (g)		Massa do músculo tibial cranial esquerdo (g)	
	Média / dp	Mediana min/max	Média / dp	Mediana min/max
G1 Controle	0,94 ± 0,11 A a	0,94 (0,75/1,17)	0,90 ± 0,15 A a	0,89 (0,70/1,31)
G2 Desnervado	0,24 ± 0,19 C a	0,18 (0,09/0,78)	0,89 ± 0,16 A b	0,86 (0,60/1,20)
G3 Neurorrafia	0,55 ± 0,19 B a	0,55 (0,15 / 0,98)	0,87 ± 0,16 A b	0,83 (0,57/1,23)
G4 Fáscia	0,64 ± 0,18 B a	0,58 (0,36 / 0,79)	0,89 ± 0,07 A b	0,90 (0,79/1,11)
G5 Gel de plaquetas	0,58 ± 0,12 B a	0,59 (0,26 / 0,79)	0,89 ± 0,09 A b	0,88 (0,72/1,05)
G6 Gel e fáscia	0,62 ± 0,17 B a	0,62 (0,30/ 0,92)	0,87 ± 0,12 A b	0,87 (0,65/1,10)
G7 Células-tronco	0,68 ± 0,10 B a	0,68 (0,46 / 0,97)	0,88 ± 0,06 A b	0,87 (0,77/0,98)

Massa do músculo tibial cranial direito: G1>G3=G4=G5=G6=G7>G2

Massa do músculo tibial cranial esquerdo: G1=G2=G3=G4=G5=G6=G7

ANOVA e teste de Tukey foram usados para essa comparação, admitindo-se $p < 0,05$.

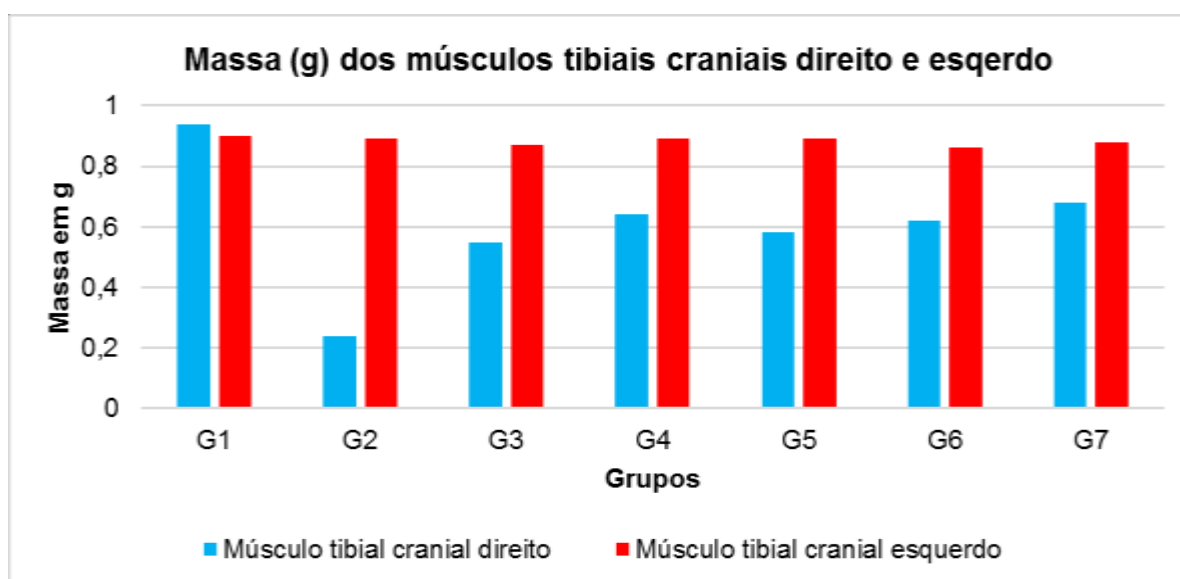


Figura 10 - Gráfico da massa (g) dos músculos tibiais craniais direito e esquerdo.

No grupo 1 não há diferença estatisticamente significativa quanto à massa dos músculos tibiais craniais direito e esquerdo, nos grupos de 2 a 7 a massa dos músculos tibiais craniais direitos é estatisticamente menor que a massa dos músculos tibiais craniais esquerdos.

Comparando os grupos quanto à massa dos músculos tibiais craniais à direita, há diferença estatística entre o grupo 1 (melhor resultado) e os demais grupos e entre o grupo 2 (pior resultado) e os demais grupos. Os grupos de 3 a 7 não diferiram estatisticamente entre si. Quanto à massa dos músculos tibiais craniais esquerdos não há diferença entre os grupos de 1 a 7.

4.4 Perimetria dos membros posteriores direito e esquerdo

A Tabela abaixo mostra a média (mm), desvio padrão, mediana, valor mínimo e máximo da perimetria dos membros posteriores do animal acordado e anestesiado.

Tabela 4 - Perimetria (mm) dos membros posteriores com o animal acordado.

Grupos		Lado direito	Lado esquerdo
G1 Controle	Média e DP	45,02 ± 7,73 Aa	47,01 ± 7,52 Aa
	Mediana (Min/Max)	42,8 (34,8/64,9)	47 (35/63,5)
G2 Desnervado	Média DP	37,03 ± 6,92 Ba	48,06 ± 8,26 Ab
	Mediana (Min/Max)	37,6 (27,1/52,2)	48,55 (32,9/64,5)
G3 Neurorrafia	Média DP	41,44 ± 7,22 Aa	45,53 ± 7,18 Ab
	Mediana (Min/Max)	39,5 (34,3/59)	45,5 (37/63)
G4 Fáscia	Média DP	46,96 ± 4,46 Aa	51,03 ± 5,91 Ab
	Mediana (Min/Max)	47 (38/53,8)	49 (40,5/62,5)
G5 Gel de plaquetas	Média DP	47,58 ± 3,21 Aa	49,6 ± 4,32 Ab
	Mediana (Min/Max)	47,75 (43,5/54)	48,25 (43/56)
G6 Gel e fáscia	Média DP	43,71 ± 3,53 Aa	48,45 ± 4,40 Ab
	Mediana (Min/Max)	43,55 (38/50)	48,5 (42/62)
G7 Células-tronco	Média DP	45,21 ± 5,00 Aa	49,49 ± 5,62 Ab
	Mediana (Min/Max)	44,75 (36/56,5)	48 (41,8/60)

Perimetria do lado direito: G1=G3=G4=G5=G6=G7>G2

Perimetria do lado esquerdo: G1=G2=G3=G4=G5=G6=G7

ANOVA e teste de Tukey foram usados para essa comparação, admitindo-se $p < 0,05$

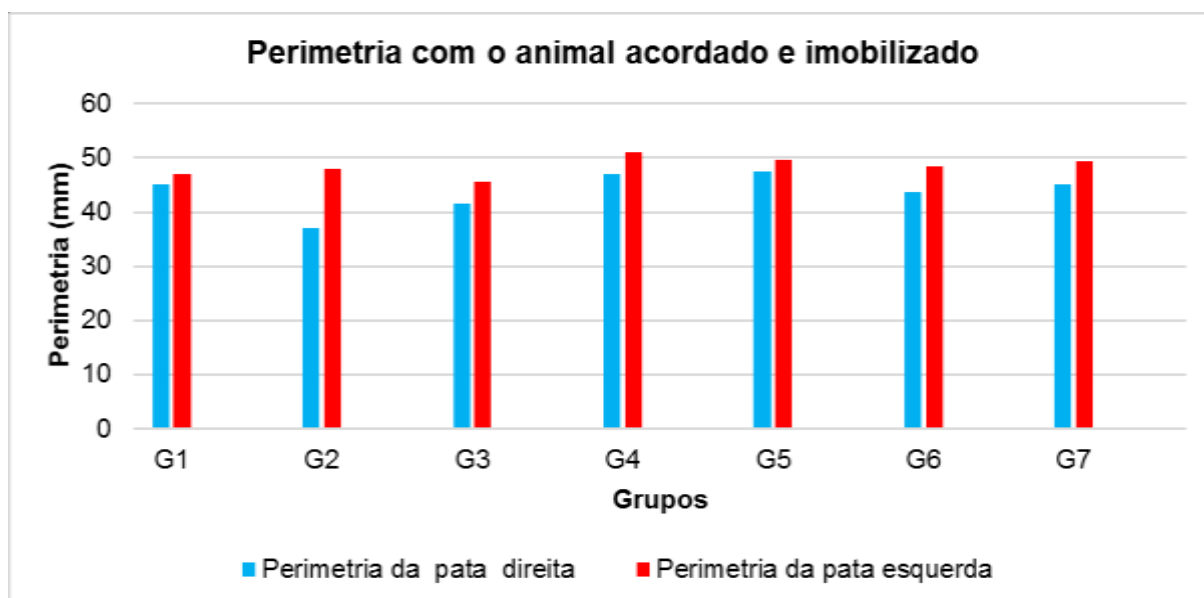


Figura 11 – Gráfico da perimetria (mm) dos membros posteriores com o animal acordado.

Comparando os grupos com os animais acordados e imobilizados: para o lado direito não houve diferença estatística entre os grupos experimentais de 3 a 7 e o grupo 1 (controle), todos com resultados melhores que o observado no grupo 2 (desnervado). Para o lado esquerdo não houve diferença estatística entre os grupos de 1 a 7. Comparando os lados dentro do mesmo grupo, no grupo 1 o lado direito mostrou resultado estatisticamente semelhante ao do lado esquerdo. Nos demais grupos o lado direito mostrou resultado pior que o observado no lado esquerdo.

Tabela 5 - Perimetria (mm) dos membros posteriores com o animal anestesiado.

Grupos		Lado direito	Lado esquerdo
G1 Controle	Média DP	49,22 ± 7,93 AB a	51,14 ± 7,98 B a
	Mediana (Min/Max)	51 (34/62)	50,9 (35,1/63,4)
G2 Desnervado	Média DP	37,50 ± 5,91 D a	49,03 ± 7,54 B b
	Mediana (Min/Max)	37,25 (27,9/52,1)	48,95 (34,9/68)
G3 Neurorrafia	Média DP	42,23 ± 5,99 CD a	48,38 ± 5,44 B b
	Mediana (Min/Max)	43,5 (32,3/50)	47,58 (40,5/60)
G4 Fáscia	Média DP	49,84 ± 4,81 A a	57,29 ± 6,04 A b
	Mediana (Min/Max)	50,5 (37,5/59)	56,5 (48,5/66)
G5 Gel de plaquetas	Média DP	45,40 ± 5,40 ABC a	52,79 ± 4,90 AB b
	Mediana (Min/Max)	45,85 (31,5/53)	52,75 (40/63)
G6 Gel e fáscia	Média DP	42,46 ± 3,34 CD a	49,36 ± 4,47 B b
	Mediana (Min/Max)	42 (38/51)	49,5 (42/57)
G7 Células-tronco	Média DP	44,3 ± 5,21 BC a	50,11 ± 4,60 B b
	Mediana (Min/Max)	44,25 (36/56,8)	49,3 (43/60)

Perimetria à direita: G4=G1=G5>G2; G1=G5=G7>G2; G2=G3=G6; G3=G5=G6=G7
 Perimetria à esquerda: G4>G1=G2=G3=G6=G7; G4=G5; G5=G1=G2=G3=G6=G7
 ANOVA e teste de Tukey foram usados para essa comparação, admitindo-se $p<0,05$.

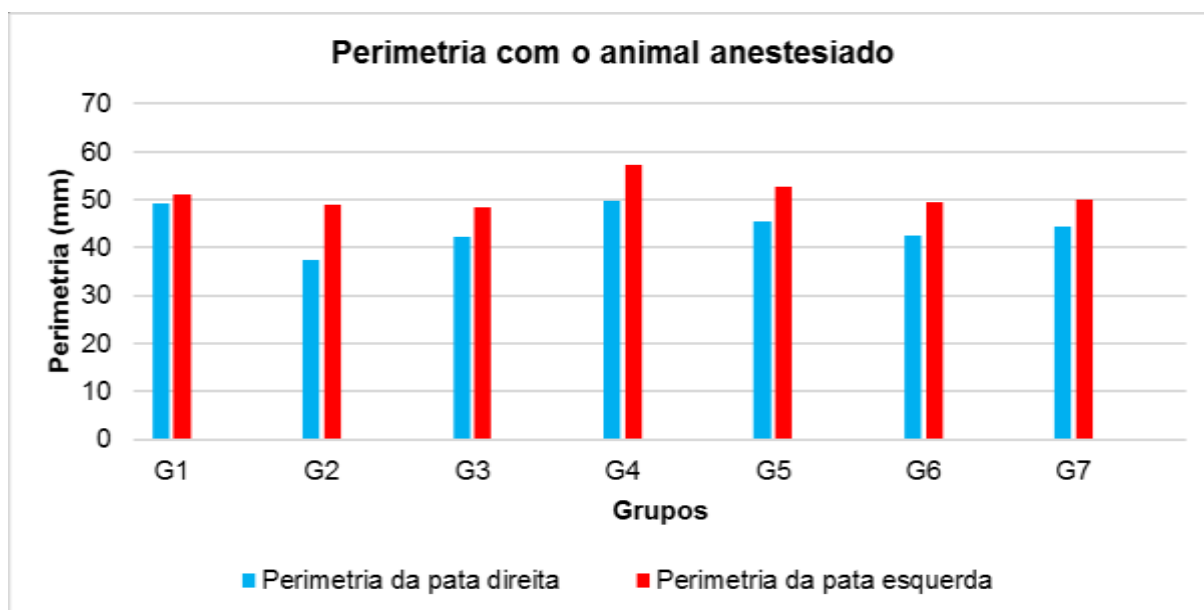


Figura 12 – Gráfico da perimetria (mm) dos membros posteriores com o animal anestesiado.

Comparando os grupos quanto à perimetria no lado direito com os animais anestesiados: o grupo 2 (desnervado) apresentou resultados estatisticamente semelhantes aos resultados dos grupos 3 e 6, os piores resultados. Os grupos 1 (controle da normalidade), 4 e 5 não diferiram estatisticamente entre si. Os grupos 3, 5, 6 e 7 não diferiram estatisticamente entre si. O grupo 7 apresentou resultados semelhantes aos observados nos grupos 1 e 5.

Quanto ao lado esquerdo, os grupos 4 e 5 apresentaram os melhores resultados. Os grupos 1, 2, 3, 5, 6 e 7 não diferiram estatisticamente entre si.

Comparando os lados no mesmo grupo, no grupo 1 (controle) não houve diferença estatística entre os lados. Nos demais grupos, o lado direito apresentou resultado inferior que o observado no lado esquerdo.

4.5 Estudo eletrofisiológico do músculo tibial cranial direito

A Tabela abaixo mostra a comparação entre os grupos quanto à latência e amplitude.

Tabela 6 - Teste eletrofisiológico com os nervos e neurografia mantidos.

Grupos		Latência (ms)	Amplitude (mV)
G1 Controle	Média DP	2,263 ± 1,56 A	10,60 ± 6,49 A
	Mediana (Min/Max)	1,67 (1,5/8,5)	10,95 (0,46/24,6)
G2 Desnervado	Média DP	3,90 ± 2,37 B	1,370 ± 2,48 C
	Mediana (Min/Max)	3,26 (1,54 /8,88)	0,415 (0,29/10,1)
G3 Neurografia	Média DP	1,94± 0,73 A	8,93 ± 6,89 AB
	Mediana (Min/Max)	1,71 (1,52/4,68)	6,59 (0,44/22,8)
G4 Fáscia	Média DP	2,24 ± 0,51 A	8,95 ± 3,78 AB
	Mediana (Min/Max)	2,14 (1,56/3,2)	9,89 (2,15/15,9)
G5 Gel de plaquetas	Média DP	2,09 ± 0,61 A	6,97 ± 3,77 AB
	Mediana (Min/Max)	1,97 (1,54/3,7)	5,55 (2,86/16,5)
G6 Gel e fáscia	Média DP	1,987 ± 0,48 A	5,84 ± 2,24 B
	Mediana (Min/Max)	1,87 (1,52/3,14)	5,47 (1,86/10,9)
G7 Células-tronco	Média DP	2,06 ± 0,55 A	6,14 ± 2,64 B
	Mediana (Min/Max)	1,86 (1,52/3,26)	5,57 (1,34/10,8)

Latência: G1=G3=G4=G5=G6=G7>G2

Amplitude: G1=G3=G4=G5>G2; G3=G4=G5=G6=G7>G2; G1>G6=G7>G2

ANOVA e teste de Tukey foram usados para essa comparação, admitindo-se $p<0,05$.

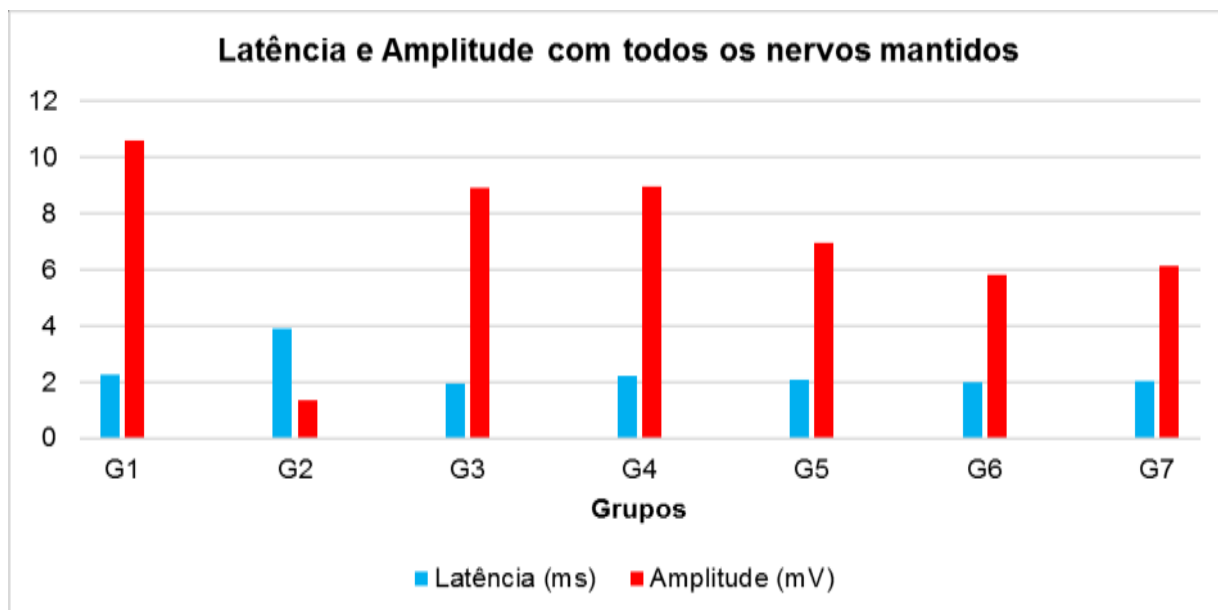


Figura 13 – Latência e amplitude com os nervos e neurografia mantidos conforme o experimento para cada grupo.

Na avaliação eletrofisiológica, com todos os nervos e neurografia mantidos, quando são comparados os grupos quanto à latência, todos os grupos de 3 a 7 diferiram do grupo 2 (desnervado), com o pior resultado e não diferiram entre si ou do grupo 1 (controle da normalidade). Quanto à amplitude, todos os grupos diferiram do grupo 2, que apresentou o pior resultado. Os grupos 3, 4 e 5 não diferiram estatisticamente do grupo 1, os grupos 6 e 7 diferiram do grupo 1, mas não diferiram estatisticamente dos grupos 3, 4 e 5.

Tabela 7 - Teste eletrofisiológico com secção do nervo tibial, distal à neurorrafia.

Grupos		Latência (ms)	Amplitude (mV)
G1	Média DP	2,17 ± 1,27 CD	9,87 ± 5,07 A
Controle	Mediana (Min/Max)	1,65 (1,52/7)	10,55 (0,49/19,6)
G2	Média DP	4,34 ± 2,81 A	1,25 ± 1,58 B
Desnervado	Mediana (Min/Max)	3,99 (1,52/11,6)	0,539 (0,29/6,32)
G3	Média DP	3,22 ± 2,68 B	7,93 ± 5,99 A
Neurorrafia	Mediana (Min/Max)	2,27 (1,58/9,94)	6,86 (0,44/17,6)
G4	Média DP	1,92 ± 0,36 D	8,78 ± 3,81 A
Fáscia	Mediana (Min/Max)	1,8 (1,54/2,94)	8,18 (2,27/19,4)
G5 Gel de	Média DP	2,56 ± 0,79 BC	7,16 ± 4,24 A
plaquetas	Mediana (Min/Max)	2,36 (1,84/4,6)	6,95 (0,83/17,2)
G6	Média DP	2,78 ± 1,42 B	6,69 ± 2,74 A
Gel e fáscia	Mediana (Min/Max)	2,36 (1,8/8,42)	6,52 (1,54/12,8)
G7	Média DP	2,31 ± 1,09 CD	6,20 ± 2,97 A
Células-tronco	Mediana (Min/Max)	1,98 (1,56/5,32)	6,01 (1,39/11,7)

Latência: G2 >G3=G5=G6>G4; G4=G7=G1; G5=G1=G7

Amplitude: G1>G3=G4=G5=G6=G7>G2

ANOVA e teste de Tukey foram usados para essa comparação, admitindo-se $p < 0,05$.

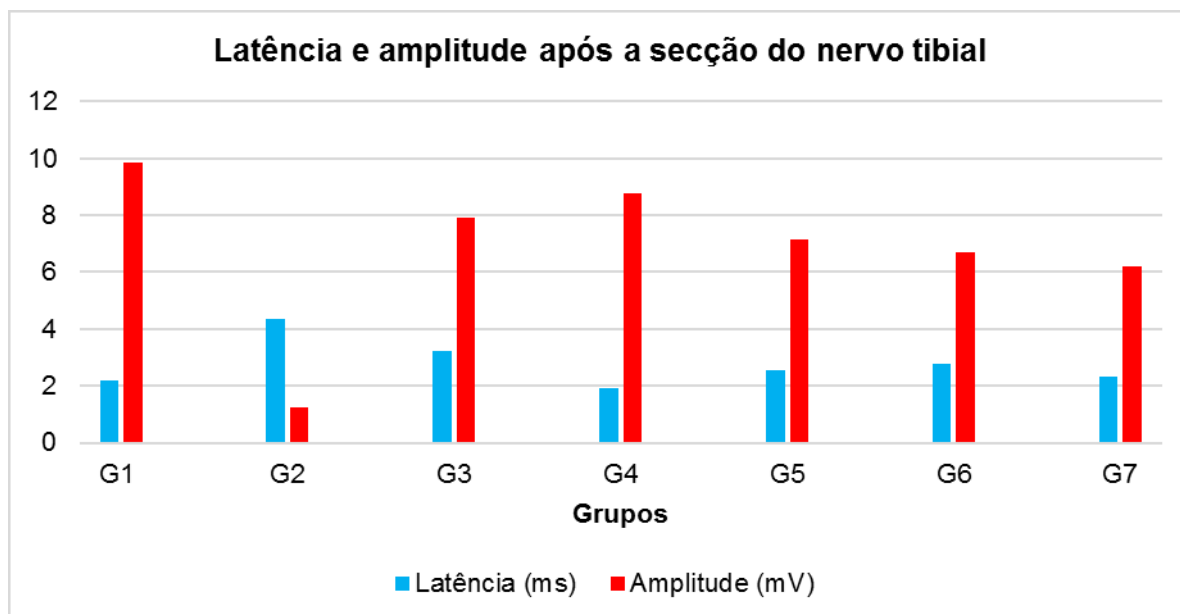


Figura 14 – Gráfico do teste eletrofisiológico com secção do nervo tibial, distal à neurorrafia.

Nos resultados do teste eletrofisiológico com o nervo tibial seccionado, quanto à latência, todos os grupos diferiram estatisticamente do grupo 2 (pior resultado). Os grupos 4, 5 e 7 são estatisticamente semelhantes ao grupo 1 (controle de normalidade), os grupos 3, 5 e 6 são semelhantes entre si e os grupos 3 e 6 diferiram do grupo 1. Quanto à amplitude, todos os grupos diferiram do grupo 2 (pior resultado) e não diferiram estatisticamente entre si ou do grupo 1.

Tabela 8 - Teste eletrofisiológico com secção dos nervos tibial e sural.

Grupos		Latência (ms)	Amplitude (mV)
G1	Média DP	2,02 ± 0,54 C	9,66 ± 4,94 A
Controle	Mediana (Min/Max)	1,72 (1,52/3,16)	10,08 (0,88/18,5)
G2	Média DP	5,62 ± 3,14 A	0,91 ± 1,52 C
Desnervado	Mediana (Min/Max)	5,58 (1,52/9,72)	0,44 (0,00/6,67)
G3	Média DP	2,34 ± 1,34 B	8,93 ± 5,63 AB
Neurorrafia	Mediana (Min/Max)	1,98 (1,58/7,3)	6,47 (0,37/17,7)
G4	Média DP	1,96 ± 0,37 C	8,86 ± 3,36 AB
Fáscia	Mediana (Min/Max)	1,86 (1,58/3,02)	7,93 (4,3/18,5)
G5 Gel de	Média DP	2,60 ± 1,05 B	7,37 ± 4,41 AB
plaquetas	Mediana (Min/Max)	2,34 (1,84/6,68)	7,52 (1,1/18,1)
G6	Média DP	2,66 ± 1,03 B	6,99 ± 2,93 AB
Gel e fáscia	Mediana (Min/Max)	2,42 (1,76/6,44)	6,84 (1,12/13,4)
G7	Média DP	2,30 ± 1,02 BC	5,67 ± 2,89 B
Células-tronco	Mediana (Min/Max)	1,96 (1,64/5,28)	5,91 (0,70/11,2)

Latência: G2 > G3=G5=G6>G1=G4; G7=G4=G1; G7=G6=G5=G3

Amplitude: G1=G3=G4=G5=G6>G2; G3=G4=G5=G6=G7>G2; G1>G7

ANOVA e teste de Tukey foram usados para essa comparação, admitindo-se $p < 0,05$.

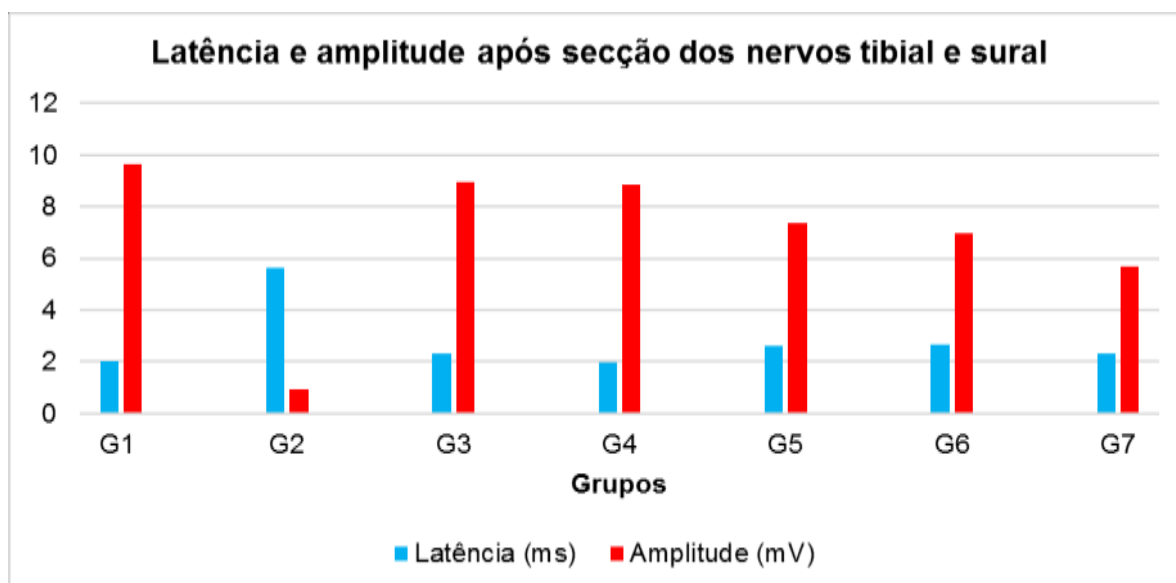


Figura 15 – Gráfico do teste eletrofisiológico com secção dos nervos tibial e sural.

Na avaliação eletrofisiológica com apenas o nervo fibular comum mantido, quando à latência, os grupos 1 (controle da normalidade), 4 e 7 apresentam os melhores resultados, os grupos 7, 3, 5 e 6 não diferiram estatisticamente entre si, o grupo 2 (desnervado) apresenta o pior resultado. Quanto à amplitude, o grupo 2 apresenta o pior resultado, os grupos 1, 3, 4, 5 e 6 apresentam resultados estatisticamente semelhantes, assim como os grupos de 3 a 7. O grupo 7 foi o único grupo entre os grupos experimentais que apresentou resultado inferior ao do grupo 1.

4.6 Avaliação da marcha pelo teste de “Walking Track”

Tabela 9 - Índice funcional do nervo ciático.

Índice funcional do nervo ciático						
	WT 1	WT 2	WT3	WT 4	WT 5	WT 6
G1	Média/dp	-4,48 ± 15,25 A	-6,90 ± 17,97 A	-4,62 ± 65,19 A	-7,22 ± 20,89 A	-3,35 ± 17,66 A
	Mediana (min/max)	4,47 (-31,27/29,58)	-7,85 (-41,03/32,18)	-41,16 (-41,16/65,18)	-9,13 (-37,74/49,36)	-8,12 (-33,62/29,52)
	Média /dp	-76,23 ± 10,30 BC	-82,27 ± 7,14 B	-78,17 ± 4,43 B	-83,68 ± 8,68 C	-79,66 ± 5,63 D
G2	mediana	-77,37	-82,86	-77,73	-84,57	-79,25
	min/max	(-90,81/-44,70)	(-94,61/-68,53)	(-88,38/-70,85)	(-98,09/-66,35)	(-90,42/-69,21)
	Média/dp	-62,01 ± 28,36 B	-77,91 ± 26,94 B	-61,12 ± 28,96 B	-50,96 ± 35,43 B	-59,50 ± 23,82 BCD
G3	mediana	-73,72	-88,53	-76,54	-47,34	-66,26
	min/max	(-97,30/9,32)	(-108,79/-19,28)	(-92,16/-2,02)	(98,90/53,44)	(-99,87/2,80)
	Média/dp	-71,37 ± 26,95 BC	-66,72 ± 38,32 B	-69,97 ± 32,08 B	-66,62 ± 42,91 B	-65,55 ± 31,87 CD
G4	mediana	-79,11	-80,68	-82,69		-80,13
	min/max	(-97,96/-2,53)	(-101,31/15,03)	(-95,76/15,31)	(-96,65/18,51)	(100,48/8,73)
	Média /dp	-80,72 ± 17,57 BC	-55,34 ± 41,37 B	-54,01 ± 35,82 B	-54,96 ± 27,85 B	-59,27 ± 28,24 BCD
G5	mediana	-84,55	-74,15	-48,97	-47,54	-56,46
	min /max	(-100,62/-27,41)	(-99,83/61,82)	(-95,36/47,11)	(-101,61/-5,89)	(-95,42/4,33)
	Média/dp	-88,38 ± 9,58 C	-74,65 ± 25,14 B	-54,55 ± 29,40 B	-48,29 ± 33,81 B	-45,13 ± 24,52 BC
G6	mediana	-90,51	-85,85	-53,53	-43,10	-40,82
	min/max	(-105,51/-68,52)	(-102,09/-23,10)	(-102,65/6,93)	(-98,85/3,41)	(-92,14/-10,36)
	Média/dp	-66,54 ± 28,31 B	-66,68 ± 29,78 B	-55,42 ± 30,88 B	-42,24 ± 33,64 B	-36,70 ± 21,12 B
G7	mediana	-78,84	-80,69	-43,87	-37,63	-37,15
	min/max	(-98,45/-14,18)	(-97,44/-4,04)	(-97,89/8,11)	(-94,23/37,36)	(-89,14/3,83)

W1 G1>G3=G7>G6; G2=G3=G4=G5=G7; G6=G2=G4=G5

W2 G1>G2=G3=G4=G5=G6=G7

W3 G1>G2=G3=G4=G5=G6=G7

W4 G1> G3=G5=G6=G7>G2

W5 G1>G3=G4=G5=G6=G7>G2

W6 G1>G7=G6>G2; G7=G3=G5=G6; G2=G3=G4=G5; G3=G4=G5=G6

ANOVA e teste de Tukey foram usados para essa comparação, admitindo-se $p < 0,05$.

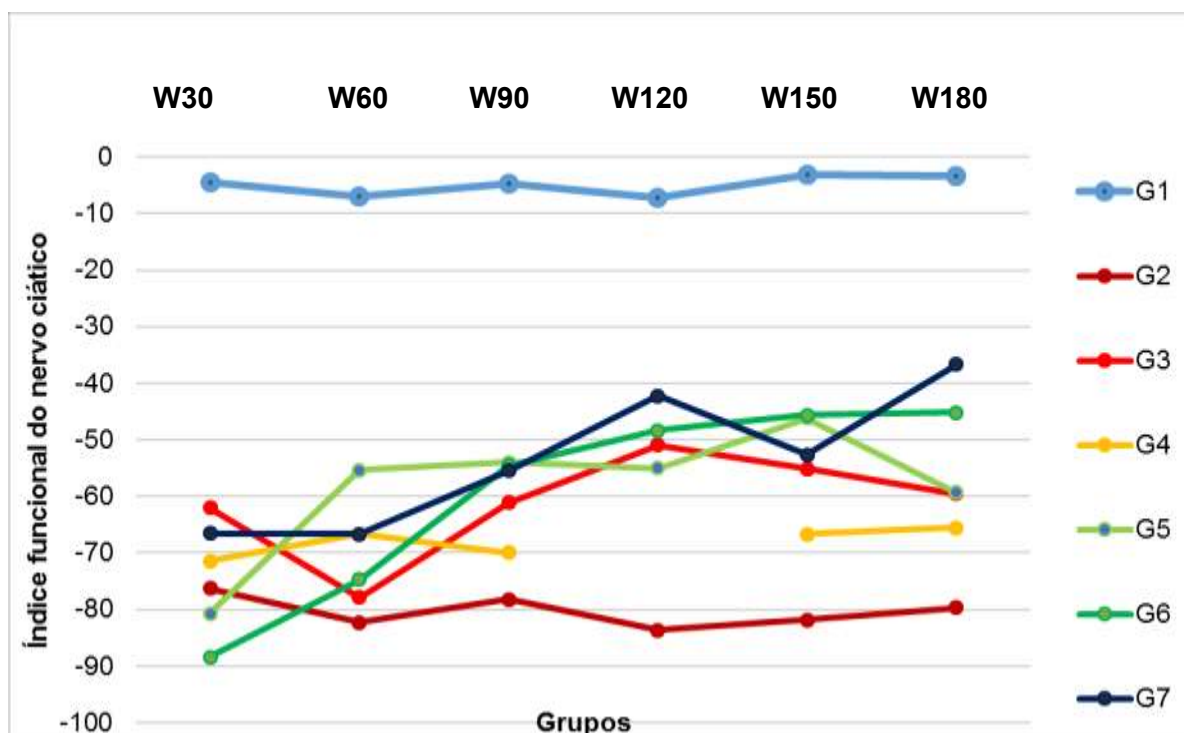


Figura 16 – Gráfico do índice funcional do nervo ciático com intervalos de 30 dias.

Na avaliação da marcha com 30 dias, todos os grupos diferiram estatisticamente do grupo 1 (controle de normalidade com melhor resultado), apenas os grupos 3 e 7 diferiram estatisticamente do grupo 2 (desnervado).

Aos 60 e 90 dias todos os grupos diferiram estatisticamente do grupo 1 (controle) e nenhum deles diferiu do grupo 2 (desnervado).

Com 120 e 150 dias os grupos experimentais de 3 a 7 diferiram estatisticamente dos grupos 2 (pior resultado) e 1 (melhor resultado).

Aos 180 dias todos os grupos diferiram do grupo 1 (controle, com o melhor resultado) e apenas os grupos 6 e 7 apresentam resultados estatisticamente superiores ao do grupo 2 (desnervado). Entre os grupos experimentais de 3 a 7, apenas os grupos 7 e 4 diferiram entre si, o grupo 7 mostrou resultado superior ao observado no grupo 4.

Tabela 10 - Índice funcional do nervo tibial.

Índice funcional do nervo tibial						
	WT 1	WT 2	WT3	WT 4	WT 5	WT 6
G1	Média/dp	-4,25 ± 18,67 A	-6,29 ± 20,96 A	-5,18 ± 58,52 A	-5,13 ± 27,67 A	-2,98 ± 20,18 A
	Mediana (min/max)	-4,73 (-33,40/40,94)	-7,35 (-41,19/50,89)	-51,31 (-51,31/58,52)	-8,79 (-42,49/84,24)	-2,92 (-34,82/52,43)
G2	Média /dp	-90,59 ± 10,86 BC	-95,79 ± 7,74 B	-91,93 ± -83,96 C	-98,02 ± 8,81 C	-96,87 ± 6,41 C
	mediana min/max	-91,27 (-106,09/10,86)	-97,84 (-109,43/7,74)	-103,34 (-103,34/-83,96)	-99,05 (-111,65/-80,92)	-97,00 (-107,64/-86,85)
G3	Média/dp	-72,74 ± 32,26 B	-88,26 ± 32,25 B	-69,05 ± 3,13 BC	-59,23 ± 39,80 B	-63,88 ± 36,95 B
	mediana min/max	-85,80 (-111,95/32,26)	-102,50 (-117,04/32,25)	-103,57 (-103,57/3,13)	-54,48 (-114,55/53,57)	-69,21 (-113,90/5,938)
G4	Média/dp	-84,20 ± 31,80 BC	-79,83 ± 41,57 B	-82,17 ± 6,76 BC		-77,46 ± 49,76 BC
	mediana min/max	-92,86 (-114,32/31,80)	-95,94 (-116,81/41,58)	-110,64 (-110,64/6,75)		-105,56 (-111,13/19,63)
G5	Média /dp	-94,52 ± 19,047 BC	-64,57 ± 47,09 B	-60,66 ± 50,53 B	-61,76 ± 35,29 B	-55,34 ± 32,33 B
	mediana min /max	-99,93 (-115,21/19,047)	-86,32 (-112,87/61,88)	-110,99 (-110,99/50,53)	-54,38 (-114,99/-0,35)	-46,29 (-109,82/-3,26)
G6	Média/dp	-102,43 ± 9,59 C	-84,67 ± 31,73 B	-60,54 ± 4,28 B	-55,138 ± 41,17 B	-52,33 ± 28,65 B
	mediana min/max	-105,25 (-120,87/9,59)	-97,63 (-116,60/31,73)	-118,89 (-118,89/4,28)	-48,35 (-111,16/14,58)	-51,90 (-96,29/-5,72)
G7	Média/dp	-75,56 ± 35,45 B	-81,17 ± 34,17 B	-61,11 ± 12,21 B	-46,53 ± 40,94 B	-58,52 ± 33,79 B
	mediana min/max	-91,96 (-110,82/35,44)	-98,41 (-112,06/34,17)	-113,33 (-113,33/12,21)	-41,75 (-109,14/41,22)	-47,38 (-117,08/4,48)

W1 G1>G3=G7>G6; G2=G4=G5=G6

W2 G1>G2= G3=G4=G5=G6=G7

W3 G1>G5=G6=G7>G2; G3=G4=G2

W4 G1> G3=G5=G6=G7>G2

W5 G1>G3=G5=G6=G7>G2; G3=G4=G5=G6=G7; G4=G2

W6 G1>G7=G6>G2=; G6=G5>G2; G3=G4=G5=G6; G3=G4=G2; G7>G3=G4=G5

ANOVA e teste de Tukey foram usados para essa comparação, admitindo-se $p < 0,05$.

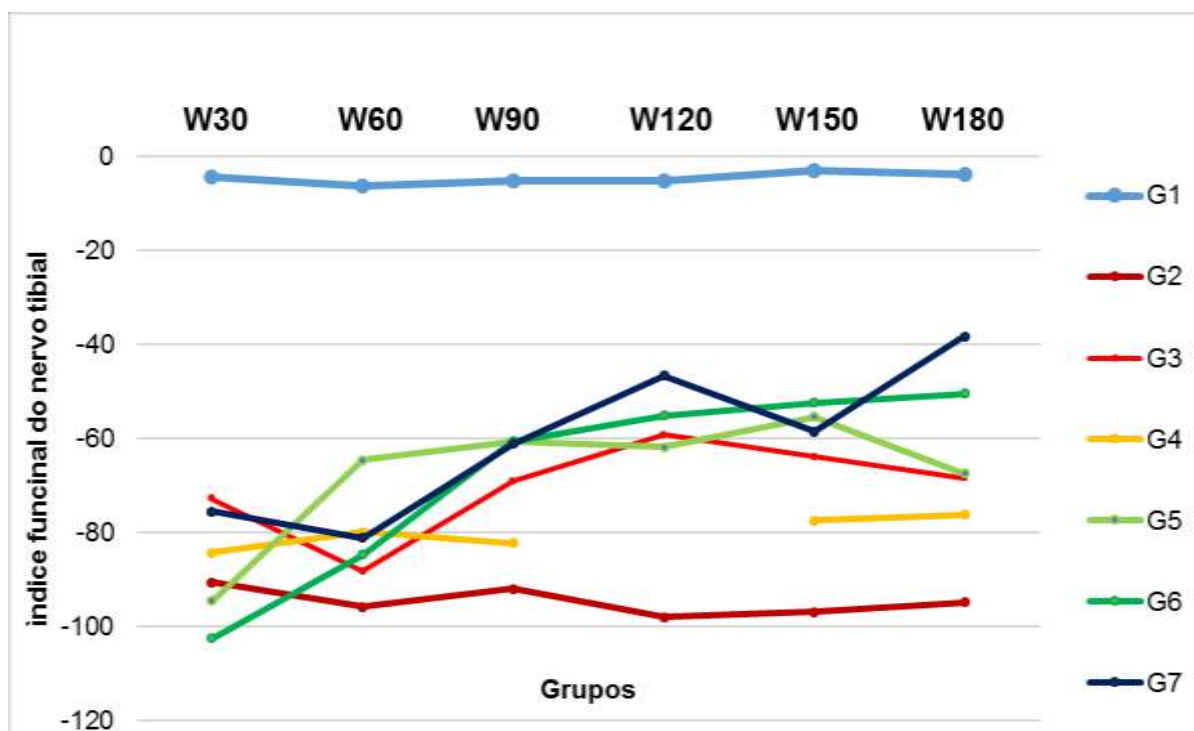


Figura 17 – Gráfico do índice funcional do nervo tibial com intervalos de 30 dias.

Quanto ao índice funcional do nervo tibial, na avaliação de trinta dias, os grupos experimentais de 3 a 7 não diferiram estatisticamente do grupo 2 (desnervado) e diferiram do grupo 1 (grupo controle, com o melhor resultado). O grupo 6 apresentou resultado inferior ao observado nos grupos 3 e 7.

Na avaliação de 60 dias, nenhum dos grupos experimentais de 3 a 7 diferiram do grupo 2 (desnervado) e todos diferiram do grupo 1 (controle, com o melhor resultado).

Aos noventa dias, o grupo 1 tem o melhor resultado, os grupos experimentais de 3 a 7 não diferiram entre si, mas os grupos 5, 6 e 7 diferiram do grupo 2 (desnervado).

Aos 120 dias os grupos 3, 5, 6 e 7 diferiram do grupo 2 e também do grupo 1 (controle, com o melhor resultado), o grupo 4 não foi avaliado aos 120 dias.

Aos 150 dias os grupos de 3 a 7 não diferiram entre si, o grupo 4 não diferiu do grupo 2 (desnervado). Todos mantêm a diferença estatística do grupo 1, controle e com o melhor resultado.

Na última avaliação, com 180 dias, os grupos 6 e 7 não diferiram entre si, os grupos 3, 4, 5 e 6 não diferiram entre si, o grupo 7 apresentou resultado superior ao

observado nos grupos de 2 a 5. Todos os grupos diferiram do grupo 1 (controle, com o melhor resultado) e os grupos 3 e 4 não diferiram do grupo 2 (desnervado).

Tabela 11 - Índice funcional do nervo fibular comum.

Índice funcional do nervo fibular comum						
	WT 1	WT 2	WT3	WT 4	WT 5	WT 6
G1	Média/dp 0,48 ± 26,61 A Mediana (min/max) -7,45 (-34,04/82,08)	-7,92 ± 23,19 A (-52,56/53,67)	-17,72 ± 14,41 A (-42,61/19,89)	-16,59 ± 28,40 A (-70,72/36,87)	-11,155 ± 18,48 A (-44,44/19,66)	-15,21 ± 20,71 A (-58,38/25,99)
G2	Média /dp -149,35 ± 28,51 C mediana min/max -155,49 (-207,37/28,50)	-135,88 ± 31,79 C (-183,52/31,78)	-154,65 ± 20,14 D (-189,35/20,14)	-134,02 ± 32,97 C (-193,7/32,97)	-148,39 ± 24,23 C (-177,69/24,23)	-154,86 ± 17,41 D (-178,78/17,41)
G3	Média/dp -103,75 ± 50,39 B mediana min/max -102,22 (-175,79/50,39)	-92,47 ± 38,66 BC (-161,40/38,66)	-86,54 ± 52,49 BC (-183,54/52,49)	-65,68 ± 58,99 B (-200,68/58,99)	-75,65 ± 63,94 B (-180,38/63,94)	-75,16 ± 51,78 C (-167,76/51,77)
G4	Média/dp -114,45 ± 45,66 BC mediana min/max -121,55 (-174,68/45,66)	-97,29 ± 67,20 BC (-190,22/67,20)	-105,11 ± 48,78 C (-181,65/48,78)		-73,71 ± 46,51 B (-152,61/46,51)	-82,85 ± 52,04 C (-172,5/52,04)
G5	Média /dp -112,54 ± 42,59 B mediana min /max -110,72 (-181,06/42,59)	-85,71 ± 61,25 B (-182,06/61,25)	-68,58 ± 48,86 BC (-168,57/48,86)	-72,92 ± 45,67 B (-158,25/45,67)	-71,84 ± 49,16 B (-180,78/49,16)	-70,83 ± 60,28 BC (-163,30/89,23)
G6	Média/dp -104,99 ± 39,60 B mediana min/max -104,10 (-191,64/39,60)	-90,96 ± 48,41 B (-176,76/48,41)	-63,06 ± 67,10 B (-182,76/67,10)	-71,78 ± 56,44 B (-188,58/56,44)	-61,78 ± 55,42 B (-163,92/55,42)	-66,18 ± 60,53 BC (-191,03/60,53)
G7	Média/dp -98,86 ± 45,45 B mediana min/max -86,92 (-185,38/45,45)	-87,75 ± 48,79 B (-156,05/48,79)	-54,52 ± 32,95 B (-102,70/32,94)	-50,98 ± 45,97 AB (-179,62/45,97)	-48,37 ± 23,79 AB (-100,63/23,79)	-31,48 ± 24,68 AB (-95,74/24,68)

W1 G1>G3=G5=G6=G7>G2; G4=G2

W2 G1>G3=G4=G5=G6=G7; G5=G6=G7>G2; G3=G4=G2

W3 G1>G3=G5=G6=G7>G2; G3=G4=G5>G2; G6=G7>G4

W4 G1>G3=G5=G6>G2; G1=G7>G2

W5 G1>G3=G4=G5=G6>G2; G1=G7>G2; G7=G3=G4=G5=G6

W6 G1>G3=G4=G5=G6>G2; G1=G7>G2; G5=G6=G7

ANOVA e teste de Tukey foram usados para essa comparação, admitindo-se $p < 0,05$.

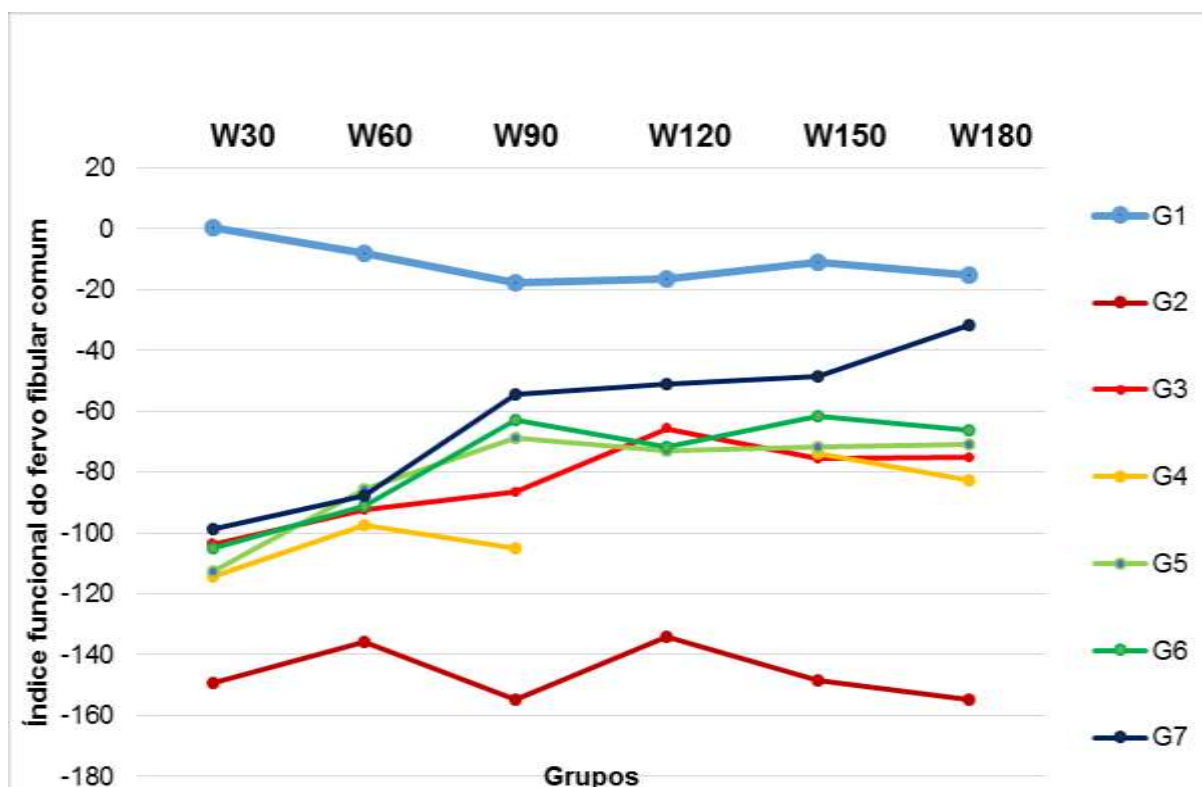


Figura 18 – Gráfico do Índice funcional do nervo fibular comum com intervalos de 30 dias.

Com 30 dias, a avaliação da marcha mostrou que os grupos experimentais de 3 a 7 não diferiram estatisticamente entre si, todos diferiram do grupo 1 e apenas o grupo 4 não difere estatisticamente do grupo 2 (desnervado).

Com 60 dias, os índices do nervo fibular comum são estatisticamente semelhantes entre os grupos de 3 a 7, todos estes grupos diferiram do grupo 1 e os grupos 3 e 4 não diferiram estatisticamente do grupo 2.

Com 90 dias, a avaliação dos índices mostra que todos os grupos experimentais de 3 a 7 diferiram do grupo 1 e também diferiram do grupo 2, e os grupo 6 e 7 diferiram do grupo 4.

Com 120 dias, todos os grupos diferiram do grupo 2 (desnervado). Os grupos experimentais não diferiram estatisticamente entre si, mas apenas o grupo 7 não difere estatisticamente do grupo 1, o grupo 4 não foi avaliado aos 120 dias. Com 150 dias, este mesmo resultado se mantém.

Aos 180 dias apenas o grupo 7 tem valores estatisticamente semelhantes ao grupo 1 (controle). Os grupos 5, 6 e 7 não mostram diferença estatística entre si. Os grupos de 3 a 6 não mostram diferença entre si, todos diferiram estatisticamente do grupo 2.

4.7 Avaliação da marcha pelo teste de “CatWalk”

As Tabelas e gráficos abaixo mostram os resultados obtidos através do “CatWalk”. Os grupos foram comparados entre si, letras diferentes mostram resultados estatisticamente diferentes, letras iguais mostram resultados estatisticamente iguais, pelo teste de Tukey ao nível de 5%, para todos os testes realizados pelo “catWalk” abaixo descritos.

Índices funcionais dos nervos tibial e ciático com os valores encontrados nos testes, e número de animais cujas imagens foram captadas pelo programa com clareza suficiente para que se pudesse aferir a medida entre os dedos, em cada grupo:

Tabela 12 - Índice funcional do nervo ciático.

Índice funcional do nervo ciático							
Grupos	G1 Controle	G2 Desnervado	G3 Neurorrafia	G4 Fáscia	G5 Gel de plaquetas	G6 Gel e fáscia	G7 Células- tronco
Média	2,13 A			-17,02 A	-27,10 A	-12,35 A	-19,10 A
Desvio padrão	17,77			28,05	19,89	33,47	22,15
Número de animais	8			3	6	3	3

G1=G2=G3=G4=G5=G6=G7

Tabela 13 - Índice funcional do nervo tibial.

Índice funcional do nervo tibial.							
Grupos	G1 Controle	G2 Desnervado	G3 Neurorrafia	G4 Fáscia	G5 Gel de plaquetas	G6 Gel e fáscia	G7 Células- tronco
Média	2,62 A			-17,95 A	-29,14 A	-23,62 A	-17,56 A
Desvio padrão	19,46			30,16	21,41	38,18	23,45
Número de animais	8			3	6	3	3

G1=G2=G3=G4=G5=G6=G7

Não houve diferença entre os grupos 4 a 7 e o grupo 1 quanto ao índice funcional do nervo tibial e o índice funcional do nervo ciático medidos através do “CatWalk”. Não foi possível calcular os índices nos grupos 2 e 3, pois o programa

não registrou imagens que permitissem a medida entre os dedos nos animais desses grupos.

São mostrados os resultados dos índices funcionais dos nervos tibial e ciático com a admissão de que os valores das medidas entre os dedos fosse 0,6cm para os animais em que essa medida não foi aferida pelo programa do “CatWalk”, (De Medinacelli et al., 1982 e Bain et al., 1989).

Tabela 14 - Índice funcional do nervo ciático com 0,6 cm para medidas entre os dedos, analisado pelo “CatWalk”.

Índice funcional do nervo ciático							
Grupos	G1 Controle	G2 Desnervado	G3 Neurorrafia	G4 Fáscia	G5 Gel de plaquetas	G6 Gel e fáscia	G7 Células- tronco
Média	9,183 A	-52,82 B	-35,13 B	-30,15 B	-59,98 B	-35,74 B	-28,41 AB
DP	23,97	27,25	34,24	40,49	41,76	28,46	30,55
Número de animais	14	18	16	17	19	16	13

G1=G7; G1>G2=G3=G4=G5=G6; G7=G2=G3=G4=G5=G6

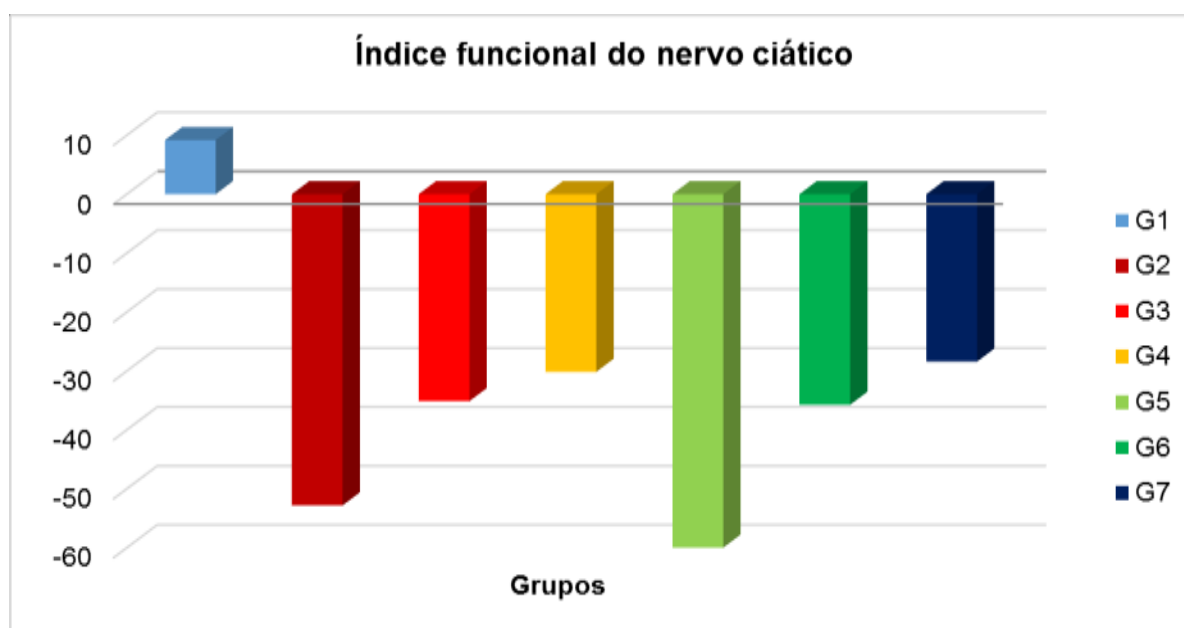


Figura 19 – Gráfico do Índice funcional do nervo ciático, com 0,6cm para medidas entre os dedos, analisado pelo “CatWalk”.

Quanto ao índice funcional do nervo ciático, os grupos de 2 (desnervado) a 7 não diferiram estatisticamente entre si. Apenas o grupo 7 apresentou resultado estatisticamente semelhante ao observado no grupo 1 (controle).

Tabela 15 - Índice funcional do nervo tibial com 0,6cm para medidas entre os dedos, analisado pelo “CatWalk”.

Índice funcional do nervo tibial							
Grupos	G1 Controle	G2 Desnervado	G3 Neurorrafia	G4 Fáscia	G5 Gel de plaquetas	G6 Gel e fáscia	G7 Células- tronco
Média	13,22 A	-56,47 B	-36,63 B	-33,35 B	-68,36 B	-48,65 B	-35,39 B
DP	31,17	29,25	33,15	42,08	42,26	32,83	33,06
Número de animais	14	18	16	17	19	16	13

G1>G2=G3=G4=G5=G6=G7

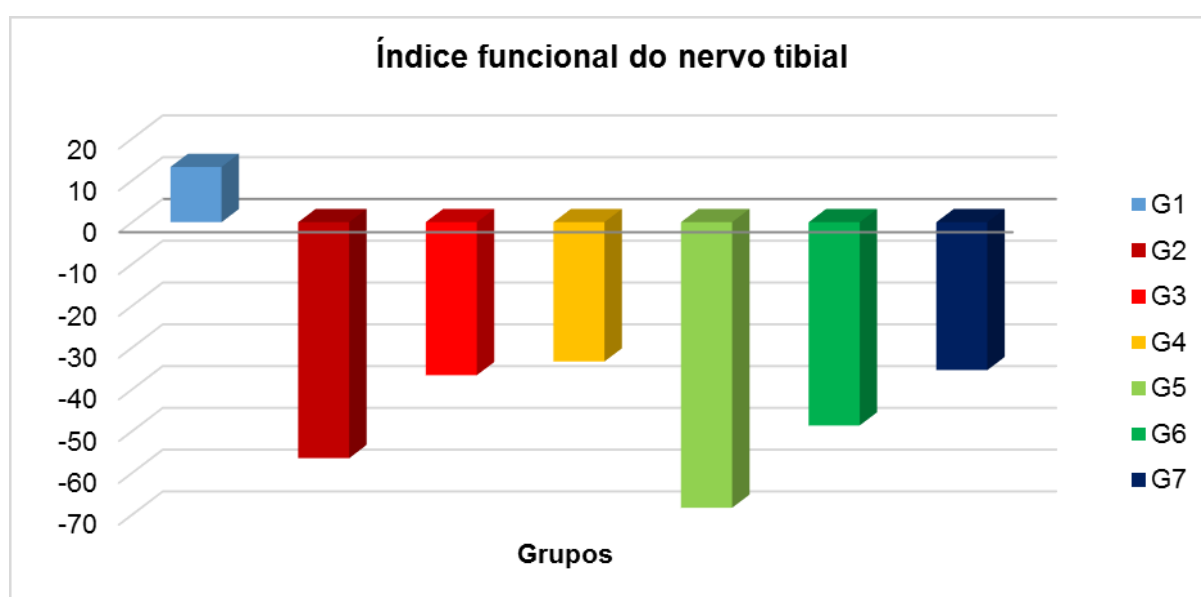


Figura 20 – Gráfico do índice funcional do nervo tibial, com 0,6 cm para medidas entre os dedos, analisado pelo “CatWalk”.

Quanto ao índice funcional do nervo tibial, o melhor resultado foi visto no grupo 1. Os grupos de 2 (desnervado) a 7 não diferiram estatisticamente entre si e mostraram resultados inferiores ao observado no grupo 1 (controle).

Foi possível calcular o índice funcional do nervo fibular comum para mais animais, pois esse índice independe das medidas intermediárias entre os dedos desses animais. Valores obtidos apenas pelo programa do “CatWalk”.

Tabela 16 - Índice funcional do nervo fibular comum, com 0,6 cm para medidas entre os dedos, analisado pelo “CatWalk”.

Índice funcional do nervo fibular comum							
Grupos	G1 Controle	G2 Desnervado	G3 Neurorrafia	G4 Fáscia	G5 Gel de plaquetas	G6 Gel e fáscia	G7 Células- tronco
Média	38,07 A	-156,14 C	-86,47 ABC	-116,86 BC	-47,50 ABC	-23,03 AB	-34,75 ABC
DP	75,20	96,69	100,96	86,57	157,30	146,51	83,04
Número de animais	14	18	16	17	19	16	13

G1=G3=G5=G6=G7; G2=G3=G4=G5=G6=G7; G1>G4=G2

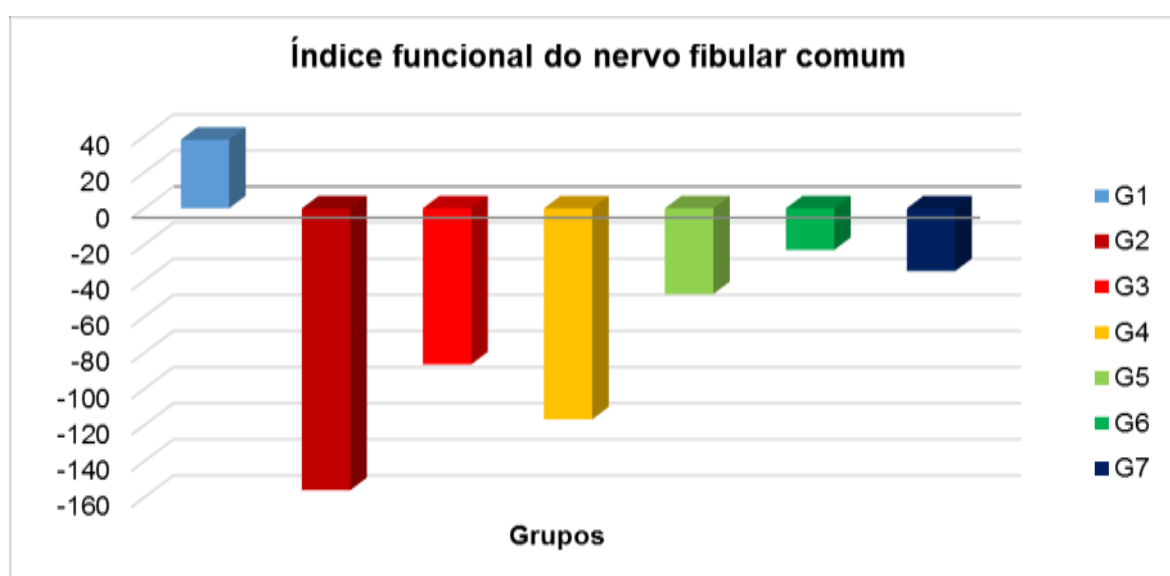


Figura 21 - Gráfico do índice funcional do nervo fibular comum pelo “CatWalk”.

Quanto ao índice funcional do nervo fibular comum, os grupos de 3 a 7 não diferiram estatisticamente entre si. Apenas os grupos 1 e 6 apresentaram resultados estatisticamente superiores ao resultado do grupo 2 (desnervado). O grupo 4 mostrou resultado estatisticamente inferior ao resultado do grupo 1 (controle), os demais grupos de 3 a 7 mostraram resultados estatisticamente semelhantes ao do grupo 1.

Outros parâmetros calculados pelo “CatWalk”

Para os próximos parâmetros de análise, o número de animais em cada grupo foi o seguinte: em G1, 14 animais; em G2, 18 animais; em G3, 16 animais; em G4, 17 animais; em G5, 19 animais; em G6, 16 animais e G7, 13 animais.

Tabela 17 – Índice de regularidade.

Índice de regularidade							
Grupos	G1 Controle	G2 Desnervado	G3 Neurorrafia	G4 Fáscia	G5 Gel de plaquetas	G6 Gel e fáscia	G7 Células-tronco
Média	94,28 A	46,28 B	67,34 AB	70,90 AB	85,72 A	83,43 A	80,19 A
DP	8,91	26,07	37,07	26,87	26,60	21,99	20,35

G1=G5=G6=G7>G2; G2=G3=G4; G3=G4=G1=G5=G6=G7

Quanto ao índice de regularidade os grupos de 3 a 7 não diferiram estatisticamente do grupo 1 (controle da normalidade) e não diferiram entre si. Os grupos 3 e 4 não diferiram estatisticamente do grupo 2 (desnervado).

Tabela 18 - Intensidade máxima da pegada completa.

Intensidade máxima da pegada completa							
Grupos	G1 Controle	G2 Desnervado	G3 Neurorrafia	G4 Fáscia	G5 Gel de plaquetas	G6 Gel e fáscia	G7 Células-tronco
Média	103,37 A	73,27 C	80,65 BC	82,31 BC	87,96 BC	96,90 AB	94,79 BC
DP	10,98	15,09	18,39	23,63	15,50	26,70	11,94

G1=G6>G2; G3=G4=G5=G6=G7; G2=G3=G4=G5=G7

Quanto à intensidade máxima da pegada completa, os grupos de 3 a 7 não diferiram estatisticamente entre si. Os grupos 3, 4, 5 e 7 apresentaram resultados estatisticamente semelhantes ao do grupo 2 (desnervado), e inferior ao do grupo 1 (controle). O grupo 6 apresentou resultado estatisticamente superior ao do grupo 2 (desnervado) e estatisticamente semelhante ao do grupo 1.

Tabela 19 - “Stand” ou fase de apoio, traduz a sequências de passos normais.

“Stand” ou fase de apoio							
Grupos	G1 Controle	G2 Desnervado	G3 Neurorrafia	G4 Fáscia	G5 Gel de plaquetas	G6 Gel e fáscia	G7 Células-tronco
Média	125,48 A	51,81 B	69,38 AB	75,66 AB	86,26 AB	112,86 AB	107,54 AB
DP	37,18	55,07	45,92	53,90	28,48	111,85	47,36

G1>G2; G1=G3=G4=G5=G6=G7; G2=G3=G4=G5=G6=G7

Quanto à fase de apoio os grupos de 3 a 7 não diferiram estatisticamente entre si e nem dos grupos 1 e 2.

Tabela 20 - “Stand index” ou índice da fase de apoio.

“Stand index”							
Grupos	G1 Controle	G2 Desnervado	G3 Neurorrafia	G4 Fáscia	G5 Gel de plaquetas	G6 Gel e fáscia	G7 Células- tronco
Média	93,92 A	221,21 A	168,65 A	146,69 A	153,05 A	115,67 A	120,77 A
DP	38,92	321,49	164,48	111,31	75,39	145,85	81,25

G1=G2=G3=G4=G5=G6=G7

Quanto ao índice da fase de apoio os grupos de 1 a 7 não diferiram estatisticamente entre si.

Tabela 21 - “Print area” ou área de contato, é a área de impressão da pegada.

“Print area” (cm²) ou área de contato							
Grupos	G1 Controle	G2 Desnervado	G3 Neurorrafia	G4 Fáscia	G5 Gel de plaquetas	G6 Gel e fáscia	G7 Células-tronco
Média	114,25 A	36,49 B	57,98 AB	51,90 AB	67,81 AB	100,89 AB	78,51 AB
DP	33,92	56,06	50,01	44,97	52,84	121,58	39,31

G1>G2; G1=G3=G4=G5=G6=G7; G2=G3=G4=G5=G6=G7

Quanto ao “print area” os grupos de 3 a 7 não diferiram estatisticamente entre si e nem dos grupos 1 e 2.

Tabela 22 - “Max contact area” (cm²) ou área do contato máximo.

“Max contact area” (cm²)							
Grupos	G1 Controle	G2 Desnervado	G3 Neurorrafia	G4 Fáscia	G5 Gel de plaquetas	G6 Gel e fáscia	G7 Células-tronco
Média	114,41 A	31,54 B	52,84 AB	53,3 AB	70,03 AB	103,15 A	76,97 AB
DP	31,56	41,79	42,06	46,3	60,12	142,60	30,41

G1=G6>G2; G1=G3=G4=G5=G6=G7; G2=G3=G4=G5=G7

Tabela 23 - “Max contact, max intensity” ou intensidade máxima no contato máximo.

“Max contact, max intensity”							
Grupos	G1 Controle	G2 Desnervado	G3 Neurorrafia	G4 Fáscia	G5 Gel de plaquetas	G6 Gel e fáscia	G7 Células-tronco
Média	101,50 A	76,11 B	85,27 AB	87,99 AB	90,25 AB	99,77 A	93,31 AB
DP	10,36	14,01	19,18	25,66	17,55	24,00	11,71

G1=G6>G2; G1=G3=G4=G5=G6=G7; G2=G3=G4=G5=G7

Tabela 24 - “Max contact, mean Intensity” ou intensidade média no contato máximo.

“Max contact, mean Intensity”							
Grupos	G1 Controle	G2 Desnervado	G3 Neurorrafia	G4 Fáscia	G5 Gel de plaquetas	G6 Gel e fáscia	G7 Células-tronco
Média	100,16 A	90,58 B	94,14 AB	97,68 AB	95,07 AB	102,29 A	96,94 AB
DP	4,19	10,66	10,63	14,05	11,70	13,28	10,43

G1=G6>G2; G1=G3=G4=G5=G6=G7; G2=G3=G4=G5=G7

Quanto à área de contato máximo, intensidade máxima no contato máximo e intensidade média no contato máximo, os grupos de 3 a 7 não diferiram estatisticamente entre si e nem do grupo 1 (controle). O grupo 6 foi o único grupo de 3 a 7 a apresentar resultado estatisticamente superior ao observado no grupo 2. Os demais grupos experimentais de 3 a 7 não diferiram estatisticamente do grupo 2 (desnervado).

Tabela 25 - “Swing” (s): tempo sem contato da pata com o vidro.

“Swing”							
Grupos	G1 Controle	G2 Desnervado	G3 Neurorrafia	G4 Fáscia	G5 Gel de plaquetas	G6 Gel e fáscia	G7 Células-tronco
Média	114,89 B	125,05 B	123,96 AB	129,60 AB	140,70 AB	159,41 AB	211,74 A
DP	48,70	72,08	74,04	75,18	59,44	61,95	136,80

G7>G1=G2; G1=G2=G3=G4=G5=G6; G7=G3=G4=G5=G6

Quanto ao “swing”, os grupos de 3 a 7 não diferiram entre si, o grupo 7 diferiu dos grupos 1 e 2, com valores maiores que os grupos 1 e 2.

Tabela 26 - “Swing speed” (cm/s) velocidade da fase do “swing”.

“Swing speed”							
Grupos	G1 Controle	G2 Desnervado	G3 Neurorrafia	G4 Fáscia	G5 Gel de plaquetas	G6 Gel e fáscia	G7 Células-tronco
Média	116,25 A	54,49 B	64,81 AB	67,29 AB	69,29 AB	78,50 AB	75,36 AB
DP	44,99	86,73	50,79	27,55	28,55	61,75	26,05

G1>G2; G1=G3=G4=G5=G6=G7; G2=G3=G4=G5=G6=G7

Quanto ao “swing speed” os grupos de 3 a 7 não diferiram estatisticamente entre si e nem dos grupos 1 e 2.

Tabela 27 - “Stride length” (cm) ou distância de pegadas de uma mesma pata.

“Stride length”							
Grupos	G1 Controle	G2 Desnervado	G3 Neurorrafia	G4 Fáscia	G5 Gel de plaquetas	G6 Gel e fáscia	G7 Células-tronco
Média	129,27 A	51,49 B	76,63 AB	86,94 AB	92,47 AB	119,07 A	126,63 A
DP	49,07	37,99	47,94	50,92	39,87	109,41	62,43

G1=G6=G7>G2; G1=G3=G4=G5=G6=G7; G2=G3=G4=G5

Quanto ao “stride length”, os grupos de 3 a 7 não diferiram entre si, os grupos 6 e 7 não diferiram do grupo 1 (controle) e apresentam melhor resultado que o visto no grupo 2 (desnervado). Os grupos 3, 4 e 5 não diferiram dos grupos 1 e 2.

Tabela 28 - “Step cycle” (s) ou tempo em segundos entre dois contatos da mesma pata.

“Step cycle”							
Grupos	G1 Controle	G2 Desnervado	G3 Neurorrafia	G4 Fáscia	G5 Gel de plaquetas	G6 Gel e fáscia	G7 Células-tronco
Média	123,64 A	100,26 A	86,40 A	86,61 A	89,80 A	107,34 A	130,11 A
DP	40,36	154,68	60,94	54,95	30,70	83,81	55,28

G1=G2=G3=G4=G5=G6=G7

Quanto ao “step cycle” não houve diferença entre os grupos de 1 a 7.

Tabela 29 - “Duty cycle” (%), expressa a fase de apoio como porcentagem do ciclo de passos.

“Duty cycle”							
Grupos	G1 Controle	G2 Desnervado	G3 Neurorrafia	G4 Fáscia	G5 Gel de plaquetas	G6 Gel e fáscia	G7 Células-tronco
Média	113,97 A	104,53 A	87,76 A	85,19 A	85,46 A	83,83 A	86,65 A
DP	29,94	109,61	44,77	16,90	11,11	9,97	32,23

G1=G2=G3=G4=G5=G6=G7

Quanto ao “duty cycle” não houve diferença entre os grupos de 1 a 7.

Tabela 30 - "Print positions"

"Print position"			
G1 Controle	Lado direito Média / dp	1,21 / 1,53	AB
	Lado esquerdo Média / dp	0,65 / 0,99	A
G2 Desnervado	Lado direito Média / dp	4,38 / 4,61	A
	Lado esquerdo Média / dp	2,40 / 2,00	A
G3 Neurorrafia	Lado direito Média / dp	2,21 / 4,98	AB
	Lado esquerdo Média / dp	2,98 / 4,00	A
G4 Fáscia	Lado direito Média / dp	3,85 / 3,73	AB
	Lado esquerdo Média / dp	1,58 / 2,51	A
G5 Gel de plaquetas	Lado direito Média / dp	2,42 / 4,26	AB
	Lado esquerdo Média / dp	1,80 / 3,02	A
G6 Fáscia e gel	Lado direito Média / dp	0,30 / 1,87	B
	Lado esquerdo Média / dp	1,69 / 1,96	A
G7 Células-tronco	Lado direito Média / dp	0,50 / 2,61	AB
	Lado esquerdo Média / dp	3,41 / 3,49	A

Lado direito: G1=G2=G3=G4=G5=G7; G2>G6; G6=G1=G3=G4=G5=G7

Lado esquerdo: G1=G2=G3=G4=G5=G6=G7

Quanto à avaliação da posição das patas, comparando os grupos quanto às patas do lado esquerdo, os grupos de 1 a 7 não diferiram entre si; quanto às patas do lado direito, os grupos de 1 a 7 não diferiram entre si, o grupo 6 mostrou valores menores que o encontrado no grupo 2.

Tabela 31 - “Base of suport”.

“Base of support”			
G1 Controle	Pata dianteira Média / dp	3,05 / 0,77	A
	Pata traseira Média / dp	5,23 / 0,80	B
G2 Desnervado	Pata dianteira Média / dp	2,65 / 0,62	A
	Pata traseira Média / dp	6,32 / 1,13	A
G3 Neurorrafia	Pata dianteira Média / dp	2,62 / 0,68	A
	Pata traseira Média / dp	6,06 / 1,14	AB
G4 Fáscia	Pata dianteira Média / dp	2,75 / 0,69	A
	Pata traseira Média / dp	6,54 / 1,05	A
G5 Gel de plaquetas	Pata dianteira Média / dp	2,29 / 1,07	A
	Pata traseira Média / dp	6,15 / 0,82	AB
G6 Fáscia e gel	Pata dianteira Média / dp	2,67 / 0,63	A
	Pata traseira Média / dp	6,62 / 0,84	A
G7 Células-tronco	Pata dianteira Média / dp	2,68 / 0,44	A
	Pata traseira Média / dp	6,29 0,88	AB

Pata dianteira: G1=G2=G3=G4=G5=G6=G7

Pata traseira: G1<G2; G1=G3=G5=G7; G2=G3=G4=G5=G5=G7

Quanto ao “Base of suport” os grupos de 1 a 7 não diferiram entre si, quanto à pata dianteira. Quanto à pata traseira, os grupos de 3 a 7 não diferiram entre si, os grupos 4 e 6 apresentaram valores maiores que o observado no grupo 1.

4.8 Força máxima de contração do músculo tibial cranial

A Tabela abaixo mostra a comparação entre os grupos quanto à resposta de força contrátil (N) do músculo tibial cranial após estímulo no músculo e no nervo fibular.

Tabela 32 – Média (N) e mediana da força máxima de contração do músculo tibial cranial com o estímulo feito no nervo fibular comum ou no próprio músculo.

Grupos		Estímulo no nervo	Estímulo no músculo
G1	Média DP	1,041 ± 0,40 AB	0,96 ± 0,30 B
Controle	Mediana (Min/Max)	1,06(0,29/2,1)	0,95(0,5/1,87)
G2	Média DP	0,45 ± 0,20 D	0,60 ± 0,25 C
Desnervado	Mediana (Min/Max)	0,43(0,03/0,78)	0,51(0,16/1,07)
G3	Média DP	0,91 ± 0,25 AB	0,96 ± 0,24 B
Neurorrafia	Mediana (Min/Max)	0,89(0,42/1,7)	0,96(0,51/1,65)
G4	Média DP	1,06 ± 0,20 A	1,24 ± 0,33 A
Fáscia	Mediana (Min/Max)	1,03(0,66/1,66)	1,16(0,7/1,96)
G5	Média DP	0,69 ± 0,24 C	0,90 ± 0,17 B
Gel de plaquetas	Mediana (Min/Max)	0,71(0,3/1,53)	0,89(0,61/1,55)
G6	Média DP	0,90 ± 0,26 B	0,99 ± 0,30 B
Fáscia e gel	Mediana (Min/Max)	0,87(0,46/1,7)	0,91(0,51/1,74)
G7	Média DP	1,04 ± 0,32 A	1,08 ± 0,27 B
Célula-tronco	Mediana (Min/Max)	1,06(0,44/1,95)	1,15(0,49/1,53)

Estímulo no nervo: G4=G7>G6>G5>G2; G1=G3=G4=G7>G5>G2; G1=G3=G6>G5>G2

Estímulo no músculo: G4>G1=G3=G5=G6=G7>G2

ANOVA e teste de Tukey foram usados para essa comparação, admitindo-se $p < 0,05$.

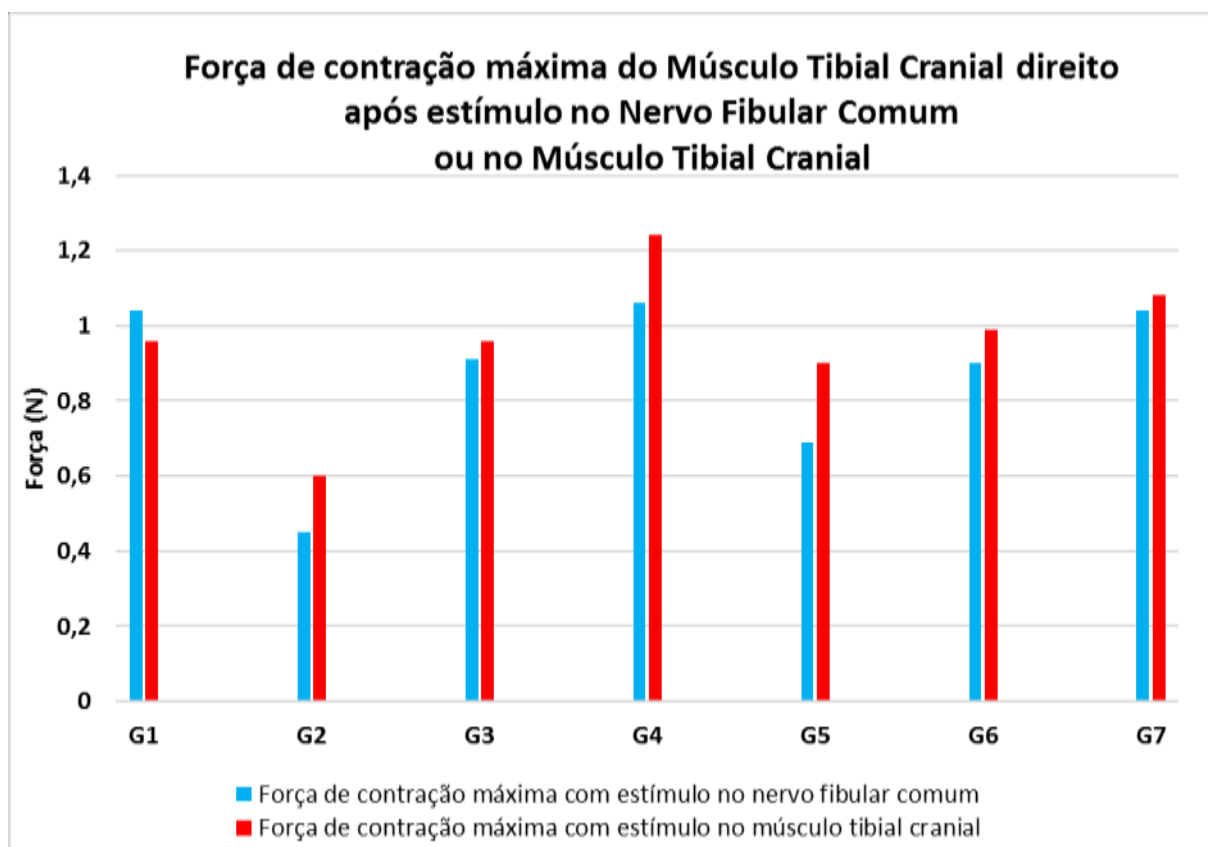


Figura 22 – Gráfico da média (N) da força máxima de contração do músculo tibial cranial direito após estímulo direto no músculo tibial cranial direito ou no nervo fibular comum conforme o grupo.

Quanto à força máxima de contração do músculo tibial cranial direito, com o estímulo no nervo fibular comum, os grupos 3, 4, 6 e 7 não diferiram estatisticamente do grupo 1 (controle), o grupo 2 apresentou a menor média, seguido pelo grupo 5. Quando o estímulo foi realizado no músculo tibial cranial, os grupos 3, 5, 6 e 7 não diferiram estatisticamente do grupo 1. Os grupos 2 e 4 diferiram de todos os outros, o grupo 2 possui a menor média (desnervado) e o grupo 4 a maior média.

No grupo 2 (desnervado) o estímulo foi dado no coto distal do nervo fibular comum que havia sido suturado com um fio de náilon preto 4.0 na musculatura adjacente e foi facilmente encontrado, mesmo com degeneração evidente.

4.9 Análise histológica e morfométrica de músculos e nervos

4.9.1 Morfologia e morfometria dos músculos tíbiais craniais

As fibras musculares no grupo 1 apresentam formato poligonal, núcleos em posição periférica e pouco tecido conjuntivo entre as fibras. No lado direito do grupo 2 (desnervado) há mais tecido conjuntivo entre as fibras musculares que são menores e há infiltrado celular abundante. Nos grupos de 3 a 7 o diâmetro das fibras dos lados direito e esquerdo não apresenta grande diferença, mais semelhante ao observado no grupo 1.

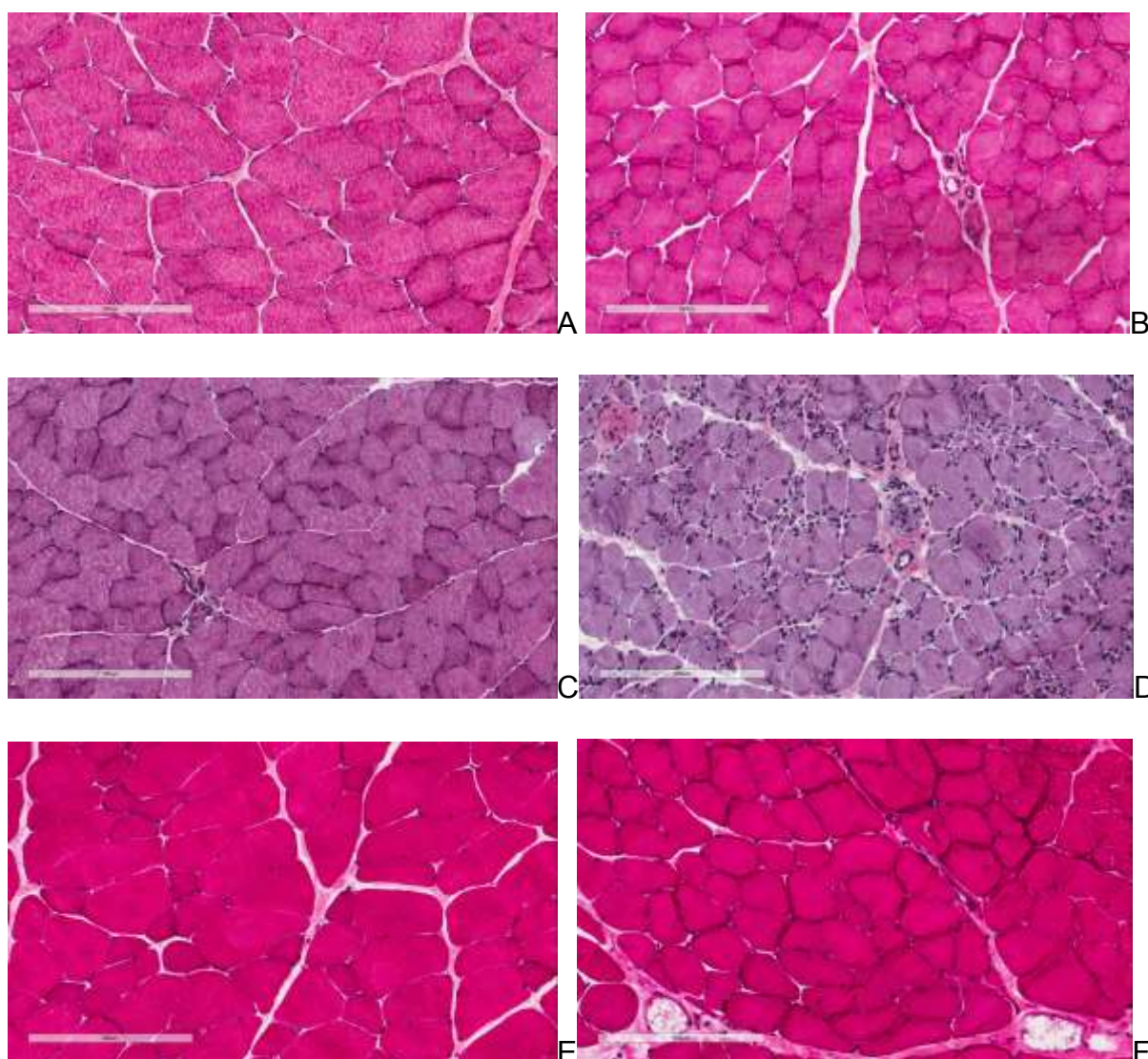


Figura 23 – Músculos tíbiais craniais. A e B (grupo 1, animal nº 27). C e D (grupo 2, animal nº 44). E e F (grupo 3, animal nº 64). A, C e E: músculos tíbiais craniais esquerdos. B, D e F: músculos tíbiais craniais direitos. A coloração usada foi hematoxilina e eosina (HE) e as imagens foram fotografadas com aumento de 20X (HE/20X). A barra nas figuras mostra a medida de 200μm.

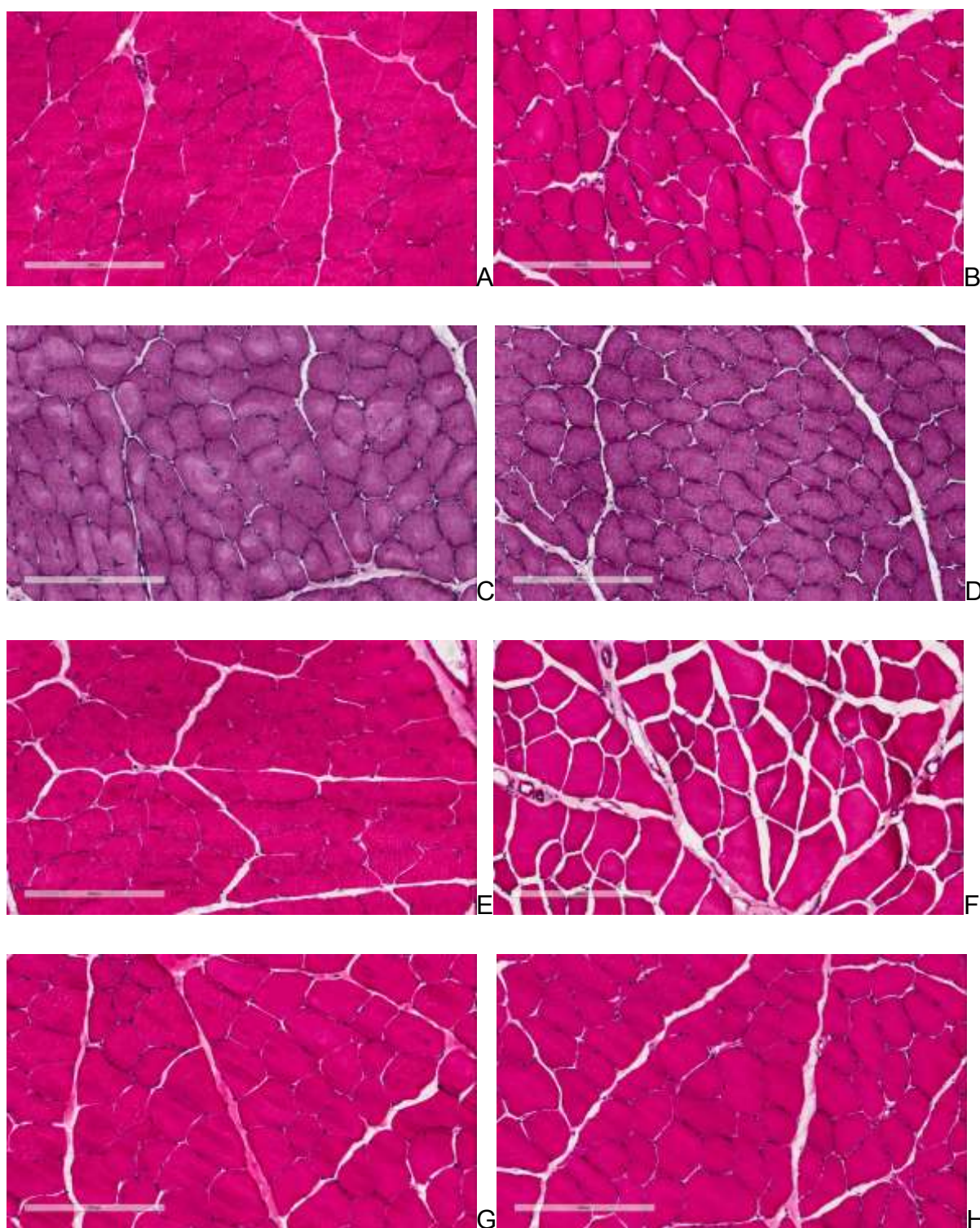


Figura 24 – Músculos Tibiais Craniais. A e B (grupo 4, animal nº 98). C e D (grupo 5, animal nº 143). E e F (grupo 6, rato nº 124). G e H (grupo 7, animal nº 102). A, C, E e G: músculos tibiais craniais esquerdos. B, D, F e H: músculos tibiais craniais direitos. A coloração usada foi hematoxilina e eosina (HE) e as imagens foram fotografadas com aumento de 20X (HE/20X). A barra nas figuras mostra a medida de 200μm.

A) Diâmetro mínimo (μm) das fibras musculares do músculo tibial cranial.

Tabela 33 - Média (μm), desvio padrão, mediana, valor mínimo e máximo do diâmetro mínimo das fibras musculares do músculo tibial cranial direito e esquerdo nos animais dos grupos 1 a 7.

Diâmetro mínimo (μm) das fibras musculares do músculo tibial cranial						
Grupos	Lados	Média	Desvio padrão	Mediana	Mínimo	Máximo
G1	Direita Aa	46,91	3,96	46,99	40,58	54,1
Controle	Esquerda Aa	47,83	7,34	44,99	40,81	74,23
G2	Direita C a	23,44	4,789	23,18	17,55	34,95
Desnervado	Esquerda AB b	46,09	3,94	45,39	40,39	55,09
G3	Direita Ba	41,32	5,71	42,71	24,25	51,11
Neurorrafia	Esquerda AB b	45,91	4,55	45,05	38,66	57,49
G4	Direita B a	42,01	4,44	42,73	29,47	49,48
Fáscia	Esquerda AB b	46,82	4,04	45,97	41,03	57,82
G5	Direita B a	41,57	4,47	42,12	30,15	49,25
Gel de plaquetas	Esquerda AB b	46,32	5,6	44,71	38,99	57,77
G6	Direita B a	41,4	5,26	42,31	25,19	48,97
Fáscia e gel	Esquerda B a	43,16	3,18	42,97	35,91	47,68
G7	Direita B a	42,15	3,42	41,99	37,06	53,04
Célula-tronco	Esquerda AB a	43,93	3,93	43,94	36,55	50,35

Lado direito: $G1 > G3 = G4 = G5 = G6 = G7 > G2$

Lado esquerdo: $G1 > G6$; $G1 = G2 = G3 = G4 = G5 = G7$; $G2 = G3 = G4 = G5 = G6 = G7$

ANOVA e teste de Tukey foram usados para essa comparação, admitindo-se $p < 0,05$

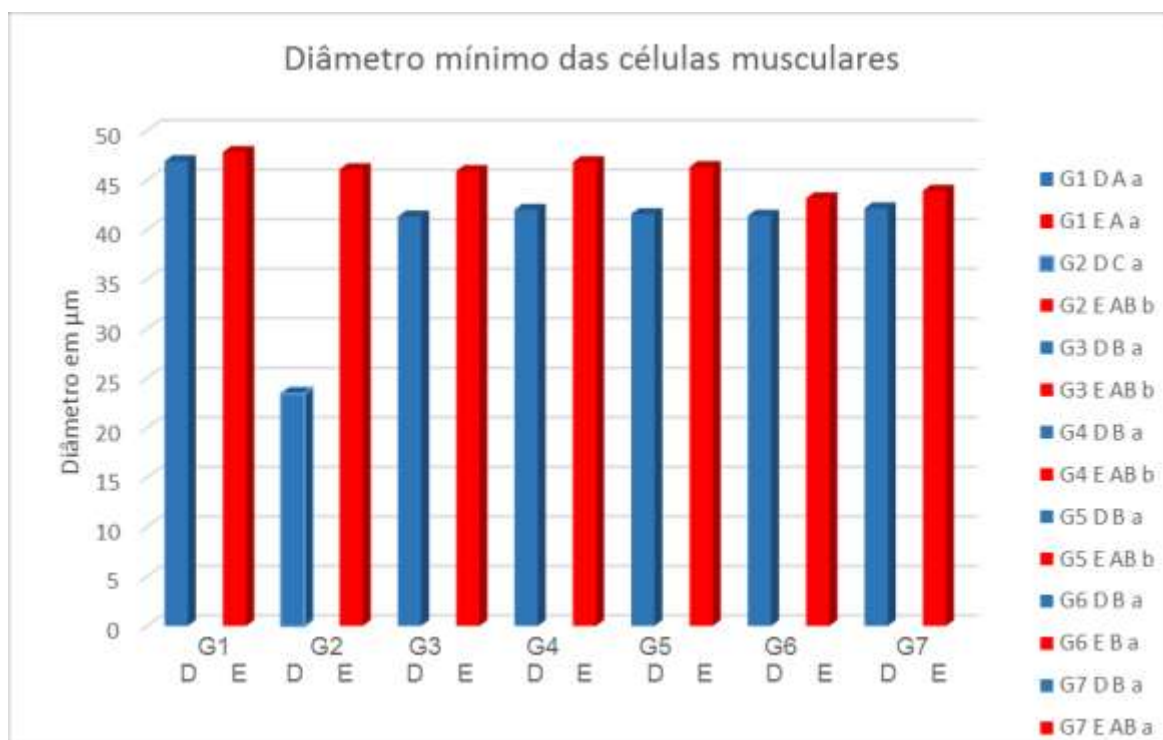


Figura 25 - Gráfico mostrando média (µm) do diâmetro mínimo das fibras musculares dos músculos tibiais craniais, conforme o grupo, dos lados direito (experimento – em azul) e esquerdo (controle – em vermelho).

Quanto ao diâmetro mínimo das fibras musculares do músculo tibial cranial do lado direito, os grupos experimentais de 3 a 7 não mostraram diferença estatística entre si, todos os grupos de 3 a 7 mostraram resultados estatisticamente superiores ao resultado observado no grupo 2 (desnervado) e inferiores ao resultado mostrado pelo grupo 1 (controle da normalidade).

Avaliando as fibras musculares do lado esquerdo, o grupo 6 mostrou resultado inferior ao observado no grupo 1 (controle de normalidade) e semelhante estatisticamente aos demais grupos. Todos os outros grupos mostraram resultados estatisticamente semelhantes entre si.

Avaliando os lados dentro de cada grupo, nos grupos 6 e 7 não há diferença estatística entre os lados, resultado semelhante ao encontrado no grupo 1.

B) Perímetro (μm) das fibras musculares do músculo tibial cranial.

Tabela 34 - Média (μm), desvio padrão, mediana, valor mínimo e máximo do perímetro das fibras musculares do músculo tibial cranial dos lados direito e esquerdo nos animais dos grupos 1 a 7.

Perímetro (μm) das fibras musculares do músculo tibial cranial						
Grupos	Lados	Média	Desvio padrão	Mediana	Mínimo	Máximo
G1 Controle	Direito Aa	234,68	20,01	233,88	201,36	284,21
	Esquerdo Aa	239,26	29,469	232,92	200,41	305,97
G2 Desnervado	Direito Ca	117,24	28,12	106,22	90,19	200,4
	Esquerdo ABb	224,01	25,86	223,31	189,47	280,68
G3 Neurorrafia	Direito Ba	204,59	29,411	210,07	120,97	244,26
	Esquerdo ABb	223,91	28,22	216,91	195,84	321,53
G4 Fáscia	Direito ABa	217,56	26,27	218,89	145,37	257,96
	Esquerdo Ab	241,89	22,48	240,14	216,08	285,63
G5 Gel de plaquetas	Direito ABa	212,69	23,04	216,73	164,37	255,68
	Esquerdo ABb	235,64	31,59	227,42	185,91	295,14
G6 Fáscia e gel	Direito Ba	205,81	28,82	209,19	115,74	245,09
	Esquerdo ABa	212,36	12,87	211,83	192,6	238,31
G7 Célula-tronco	Direito ABa	214,06	18,05	209,55	194,8	274,35
	Esquerdo ABa	225,11	22,6	223,03	14,72	269,76

Lado direito: $G1=G4=G5=G7>G2$; $G3=G6>G2$; $G3=G4=G5=G6=G7$

Lado esquerdo: $G1=G2=G3=G4=G5=G6=G7$

ANOVA e teste de Tukey foram usados para essa comparação, admitindo-se $p<0,05$.

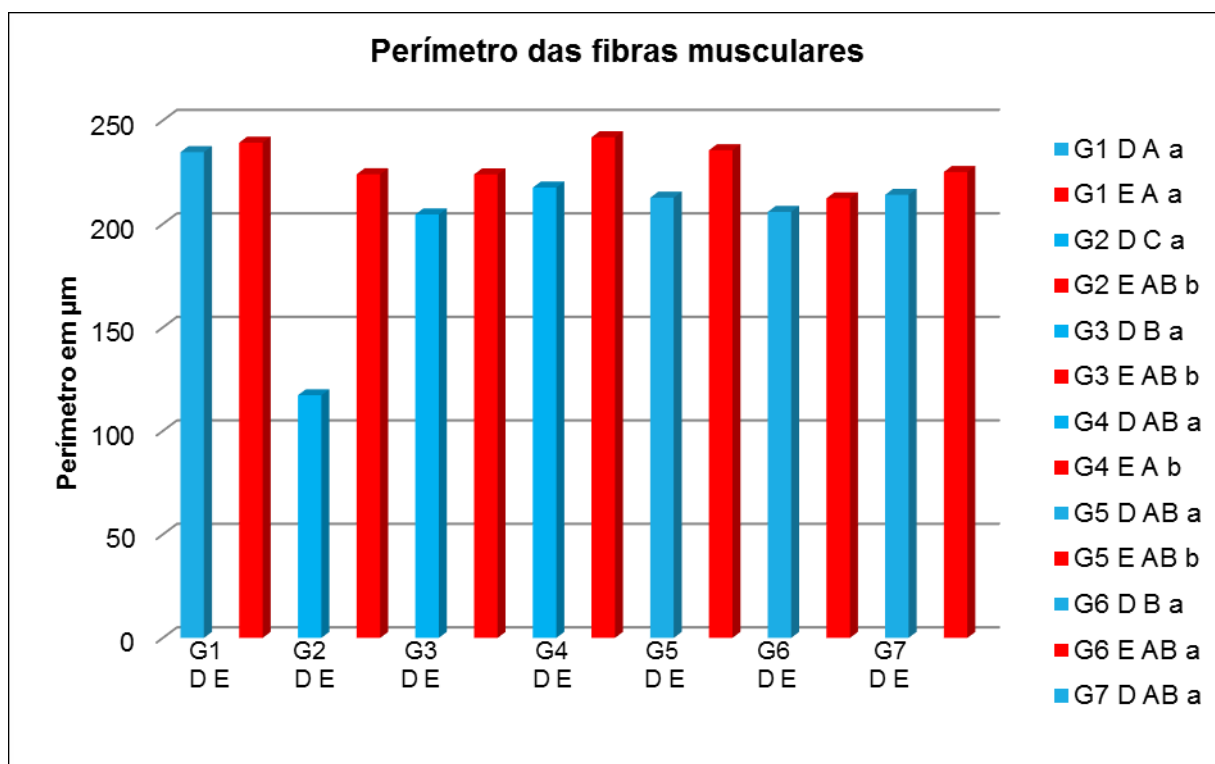


Figura 26 - Gráfico mostrando a média (µm) do perímetro das fibras musculares dos músculos tibiais craniais, conforme o grupo, dos lados direito (experimento – em azul) e esquerdo (controle – em vermelho).

Avaliando o perímetro das fibras musculares do músculo tibial cranial do lado direito, os melhores resultados foram vistos nos grupos 4, 5 e 7 que foram estatisticamente semelhantes ao resultado do grupo 1 (controle de normalidade). O pior resultado foi visto no grupo 2 (desnervado), nenhum dos grupos experimentais apresentou resultado estatisticamente semelhante ao do grupo 2.

Quanto ao perímetro das fibras musculares dos músculos tibiais craniais do lado esquerdo, não houve diferença estatística entre os grupos de 1 a 7.

Os grupos 1, 6 e 7 não mostraram diferença estatística entre os lados direito e esquerdo, dentro do mesmo grupo, quanto ao perímetro das fibras musculares dos músculos tibiais craniais. Os grupos 2, 3, 4 e 5 mostraram que o perímetro das fibras musculares do músculo tibial cranial do lado direito foi estatisticamente menor que o perímetro das fibras musculares do lado esquerdo.

C) Área (μm^2) das fibras musculares do músculo tibial cranial.

Tabela 35 - Média (μm^2), desvio padrão, mediana, valor mínimo e máximo da área das fibras musculares do músculo tibial cranial dos lados direito e esquerdo nos animais dos grupos 1 a 7.

Área (μm^2) das células musculares do músculo tibial cranial						
Grupos	Lados	Média	Desvio Padrão	Mediana	Mínimo	Máximo
G1 Controle	Direito Aa	3275,48	504,38	3202,41	2405,63	4369,08
	Esquerdo Aa	3346,61	707,77	3182,77	2636,17	4970,87
G2 Desnervado	Direito Ca	870,48	448,67	710,44	479,23	2189,08
	Esquerdo ABb	3108,06	613,4	2950,46	2281,08	4425,38
G3 Neurorrafia	Direito Ba	2547,94	620,72	2675,27	894,046	3533,36
	Esquerdo ABb	3077,27	741,65	2932,21	2248,03	5670,16
G4 Fáscia	Direito Ba	2702,79	547,71	2734,88	1250,15	3769,58
	Esquerdo Ab	3413,74	560,98	3335,83	2635,56	4550,25
G5 Gel de plaquetas	Direito Ba	2634,43	503,67	2697,09	1477,19	3416,11
	Esquerdo ABb	3284,25	771,74	3131,26	2050,77	4923,77
G6 Fáscia e gel	Direito Ba	2559,75	583,6	2564	899,32	3614,52
	Esquerdo Ba	2718,2	324,4	2667,73	2122,07	3256,08
G7 Célula-tronco	Direito Ba	2675,17	462,67	2597,74	2111,11	4384,31
	Esquerdo ABa	2973,3	555,58	2999,09	2191,9	3979,52

Lado direito: G1>G3=G4=G5=G6=G7>G2

Lado esquerdo: G1=G4>G6; G1=G2=G3=G4=G5=G7; G2=G3=G5=G6=G7

ANOVA e teste de Tukey foram usados para essa comparação, admitindo-se $p<0,05$.

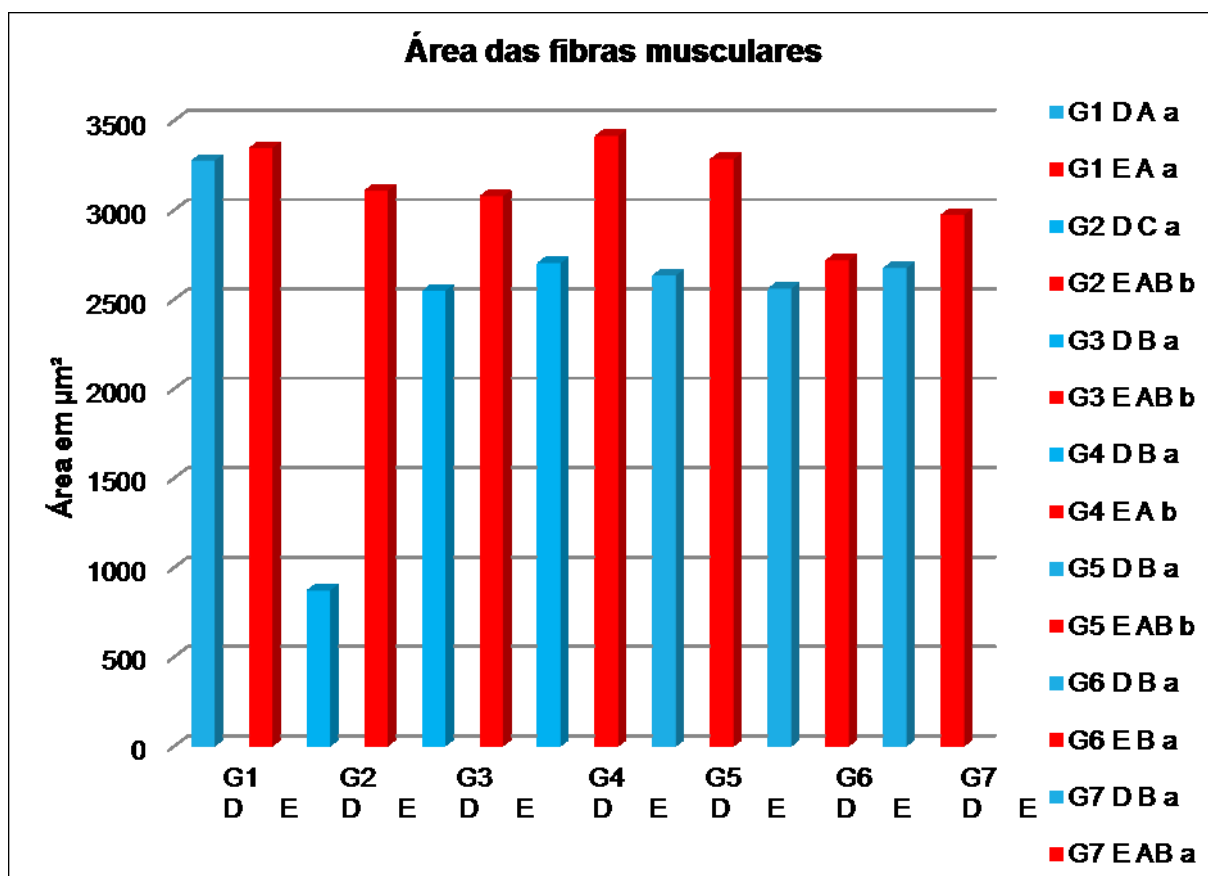


Figura 27 – Gráfico mostrando a média (μm^2) da área das fibras musculares dos músculos tibiais craniais, conforme o grupo, dos lados direito (experimento – em azul) e esquerdo (controle – em vermelho).

A média da área (μm^2) das fibras musculares do músculo tibial cranial à direita foi estatisticamente maior no grupo 1 (controle de normalidade) quando comparada aos grupos experimentais de 3 a 7. Os grupos de 3 a 7 mostraram valores de área que não diferiram entre si e que foram estatisticamente superiores ao observado no grupo 2 (desnervado).

Quanto à média da área (μm^2) das fibras musculares do músculo tibial cranial à esquerda, os grupos 1, 2, 3, 4, 5 e 7 não diferiram estatisticamente entre si assim como os grupos 2, 3, 5, 6 e 7.

Quando os lados direito e esquerdo foram comparados dentro do mesmo grupo quanto à média da área das fibras musculares, observou-se que nos grupos 1, 6 e 7 não houve diferença estatística entre os lados, os grupos 2, 3, 4 e 5 mostraram valores estatisticamente maiores para o lado esquerdo.

4.9.2 Histologia e morfometria do nervo fibular comum – N1

As figuras abaixo mostram imagens do segmento (N1) após a neurorrafia.

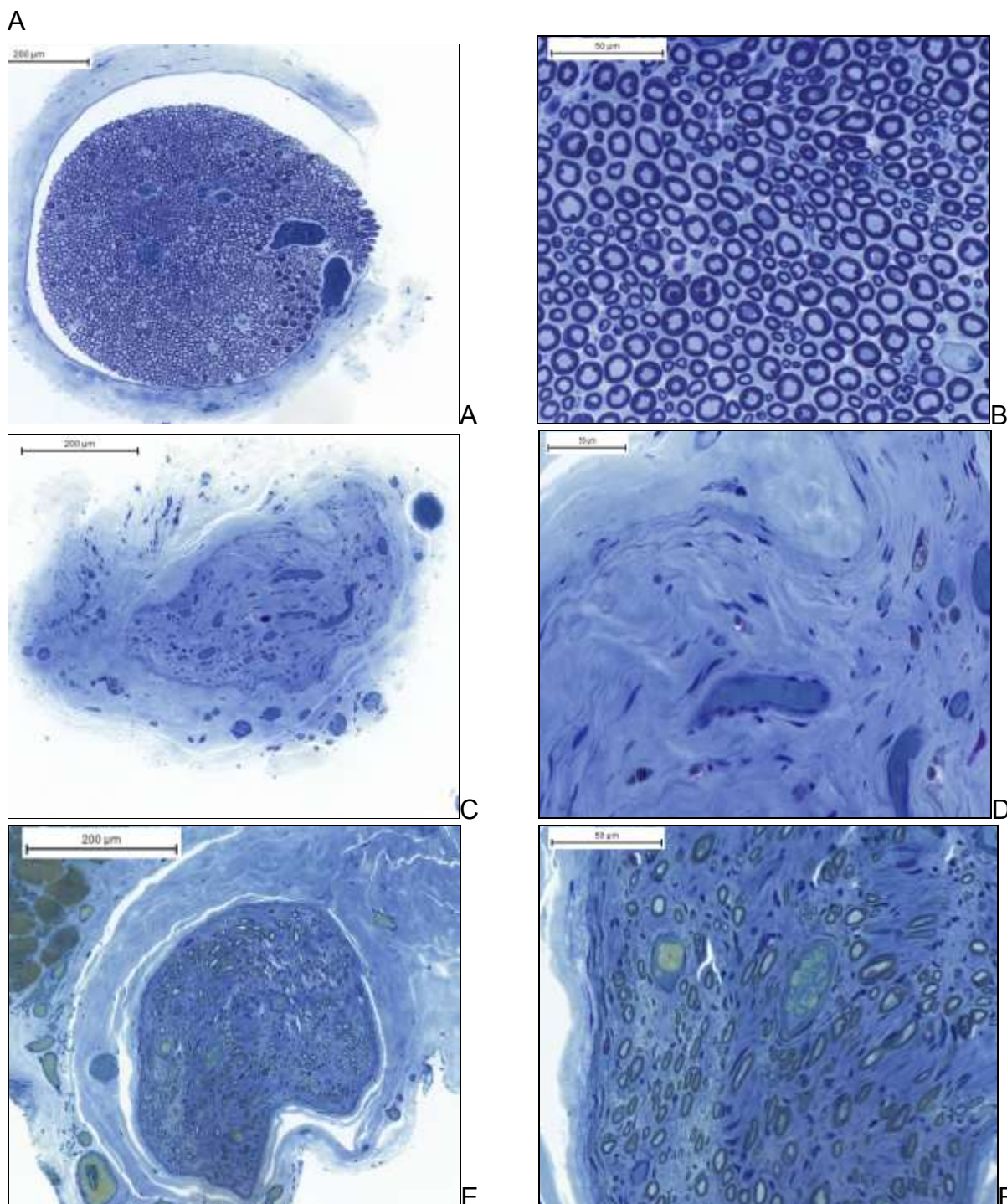


Figura 28 – Nervos fibulares comum. A e B (grupo 1, animal nº 37), nervo fibular comum após a neurorrafia. C e D (grupo 2, animal nº 44), coto distal do nervo fibular comum. E e F (grupo 3, animal nº 71): nervo fibular comum após a neurorrafia. A, C e E: AT/10X. B, D e F: AT/40X. AT (azul de toluidina).

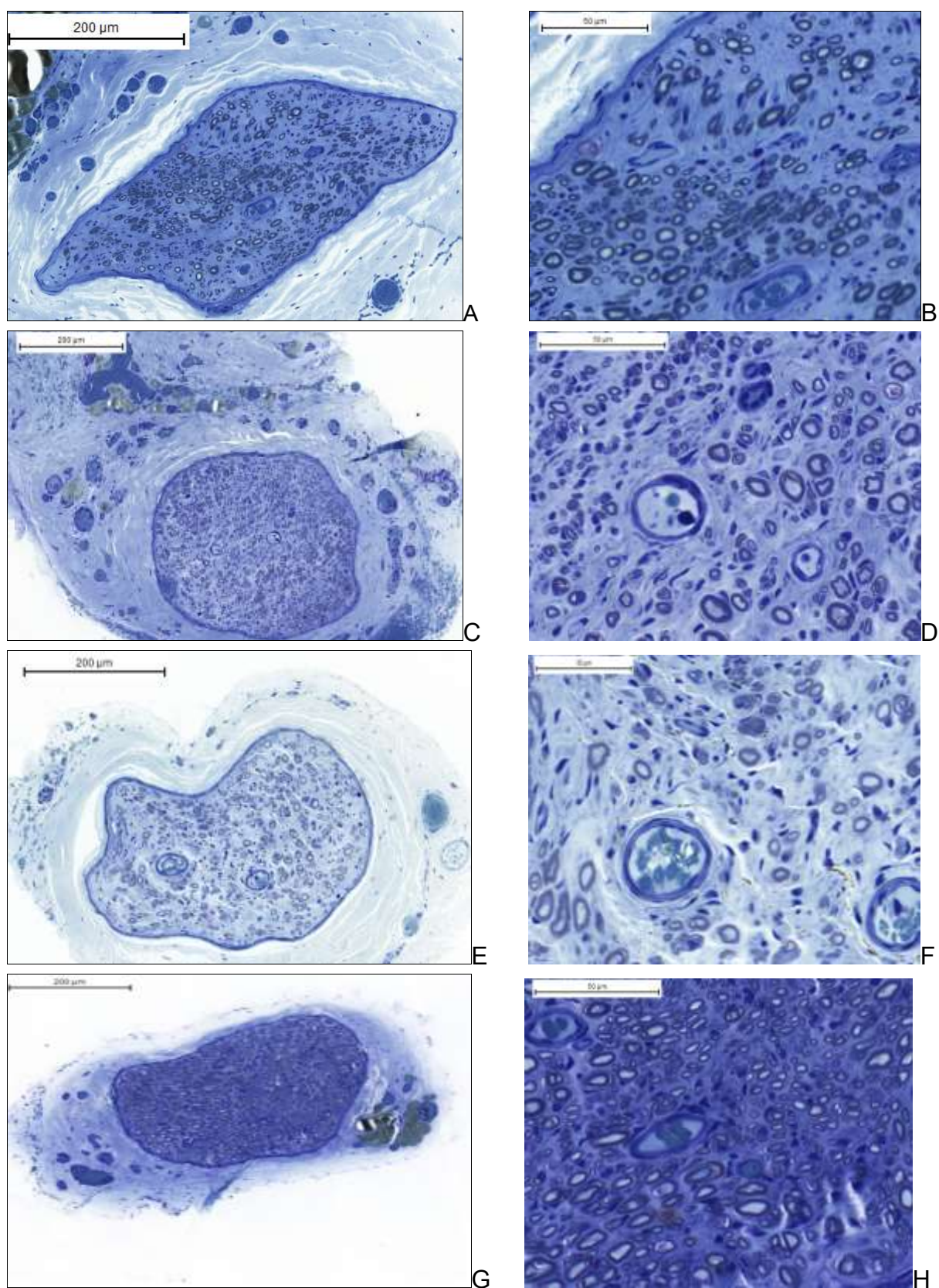


Figura 29 – Nervo fibular comum após a neurorrafia. A e B: grupo 4, animal nº 84. C e D: grupo 5, animal nº 153. E e F: grupo 6, animal nº 131. G e H: grupo 7, animal nº 101. A, C, E e G: AT/10X. B, D, F e H: AT/40X. AT: azul de toluidina.

A) Número de fibras nervosas no segmento N1.

Tabela 36 - Número de fibras nervosas no segmento N1.

Número de fibras nervosas no segmento N1						
Grupos		Média	Desvio Padrão	Mediana	Mínimo	Máximo
G1 Controle	A	1909,67	525,87	1910,5	333	2637
G2 Desnervado						
G3 Neurorrafia	BC	1154,56	864,49	1037,5	147	3037
G4 Fáscia	BC	1015,61	782,03	899	182	3546
G5 Gel de plaquetas	C	905,20	609,25	683,5	324	2612
G6 Gel e fáscia	BC	1210,50	1364,18	746	202	5774
G7 Célula-tronco	AB	1437,44	701,73	1369	554	3063

G1=G7>G5; G3=G4=G6=G7; G3=G4=G5=G6

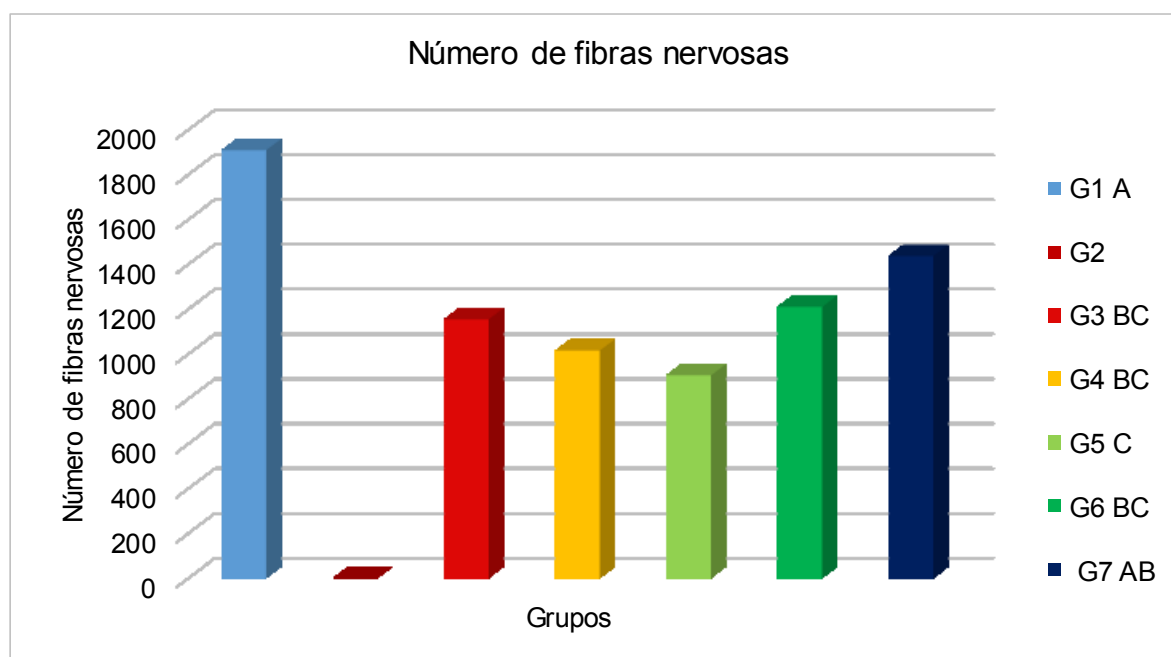


Figura 30 – Gráfico do número de fibras nervosas no segmento N1.

Quanto ao número de células ou fibras nervosas no segmento N1 o grupo 1 (controle de normalidade) e o grupo 7 apresentaram o maior número de células sem diferença estatística entre si.

Os grupos 3, 4, 6 e 7 não apresentaram diferença estatística entre si.

Os grupos 3, 4, 5 e 6 não apresentaram diferença estatística entre si e apresentaram resultados inferiores ao observado no grupo 1 (controle). O grupo 2 (desnervado) não pode ser avaliado quanto a nenhum dos critérios usados para a análise do segmento N1, pois as fibras nervosas estavam demasiadamente degeneradas.

B) Área da fibra nervosa no segmento N1.

Tabela 37 - Área (μm^2) da fibra nervosa no segmento N1.

Área da fibra nervosa no segmento N1						
Grupos		Média	Desvio Padrão	Mediana	Mínimo	Máximo
G1 Controle	A	72,49	15,79	69,13	38,12	102,38
G2 Desnervado						
G3 Neurorrafia	C	32,98	6,25	32,72	24,01	47,64
G4 Fáscia	C	30,25	9,54	27,5	18,03	57,45
G5 Gel de plaquetas	C	31,85	6,39	29,57	23,96	49,58
G6 Gel e fáscia	B	39,08	13,59	39,14	17,48	68,46
G7 Célula-tronco	C	30,36	9,45	29,26	18,98	52,84

G1>G6>G3=G4=G5=G7

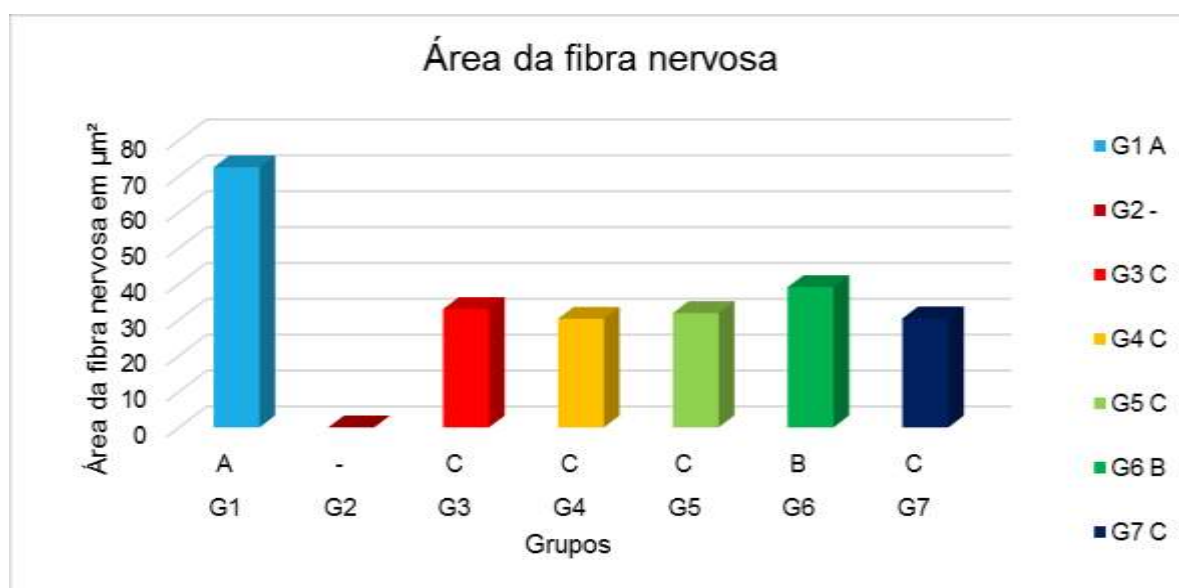


Figura 31 - Gráfico mostrando a área (μm^2) da fibra nervosa do segmento N1.

Analisando a área da fibra nervosa de N1, o grupo 1 apresenta o melhor resultado, seguido pelo grupo 6 que apresenta resultado estatisticamente melhor que os grupos 3, 4, 5 e 7 que não apresentaram diferença estatisticamente entre si.

C) Diâmetro mínimo da fibra nervosa no segmento N1.

Tabela 38 - Diâmetro mínimo (µm) da fibra nervosa no segmento N1.

Diâmetro mínimo da fibra nervosa no segmento N1						
Grupos		Média	Desvio padrão	Mediana	Mínimo	Máximo
G1 Controle	A	7,48	1,09	7,36	5,17	9,26
G2 Desnervado						
G3 Neurorrafia	C	4,96	0,35	5,01	4,16	5,4
G4 Fáscia	D	4,49	0,75	4,32	3,59	6,18
G5 Gel de plaquetas	C	4,89	0,55	4,89	4,09	6,25
G6 Gel e fáscia	B	5,44	0,86	5,47	3,99	7,12
G7 Célula-tronco	CD	4,75	0,81	4,5	3,69	6,84

G1>G6>G3=G5>G4; G7=G3=G5=G4

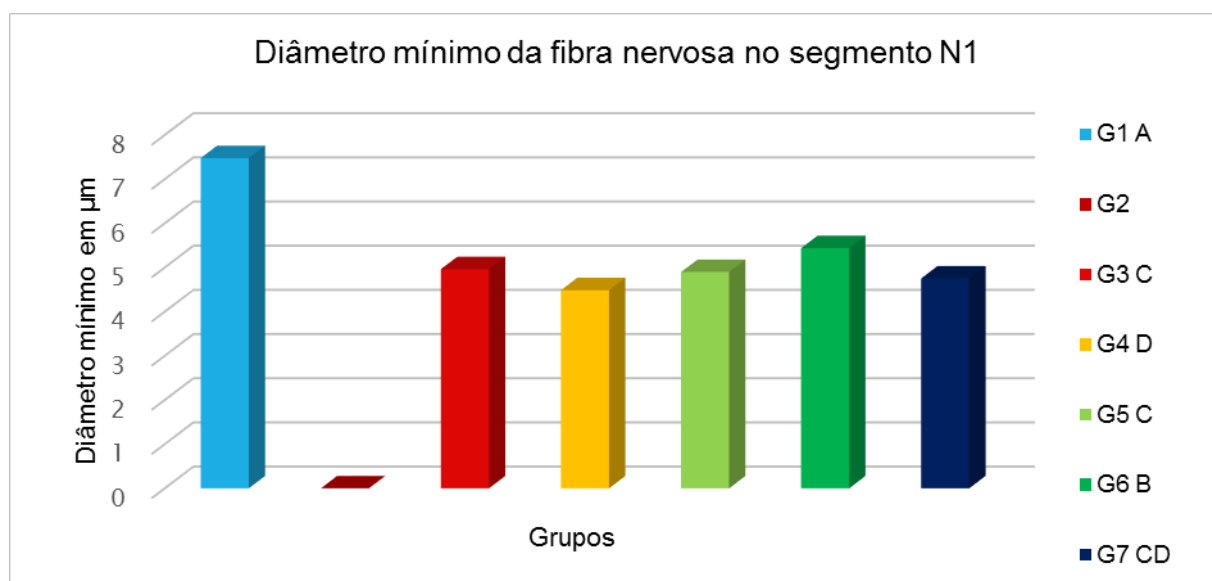


Figura 32 - Gráfico mostrando o diâmetro mínimo (µm) no segmento N1.

Quanto ao diâmetro mínimo da fibra nervosa no nervo fibular comum o grupo 1 (controle da normalidade) apresenta o melhor resultado, seguido pelo grupo 6 que apresentou resultado melhor que os resultados dos grupos 3, 4, 5 e 7 que não diferiram em si.

D) Área do axônio no segmento N1.

Tabela 39 - Área do axônio (μm^2) no segmento N1.

Área do axônio no segmento N1						
Grupos		Média	Desvio Padrão	Mediana	Mínimo	Máximo
G1 Controle	A	20,16	5,25	19,31	11,46	33,95
G2 Desnervado						
G3 Neurorrafia	C	9,79	2,2	9,36	6,57	14,32
G4 Fáscia	C	9,07	2,72	9,01	5,82	15,48
G5 Gel de plaquetas	B	10,03	2,88	9,69	6,74	15,1
G6 Gel e fáscia	B	11,98	4,24	10,76	5,28	20,35
G7 Célula-tronco	BC	10,01	4,45	8,19	5,46	19,72

G1>G5=G6>G3=G4; G7=G5=G6; G7=G3=G4

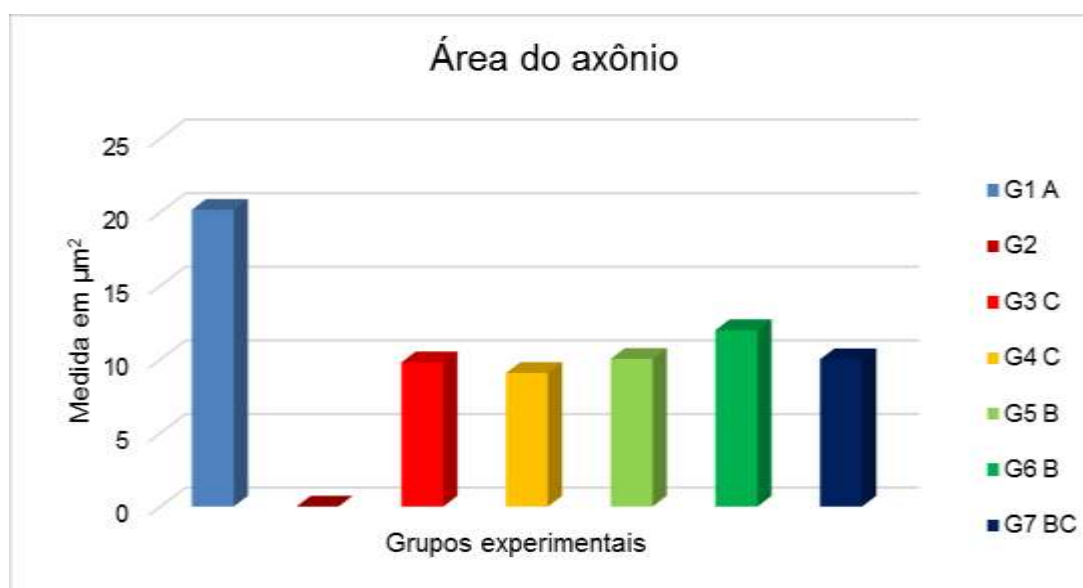


Figura 33 - Gráfico da área do axônio (μm^2) do segmento N1.

Analisando a área do axônio no segmento N1, o grupo 1 apresentou o melhor resultado seguido pelos grupos 5 e 6 que apresentaram resultados melhores que os resultados dos grupos 3 e 4 que não diferiram entre si. O grupo 7 apresentou resultado estatisticamente semelhante aos resultados dos grupos 3 a 6.

E) Diâmetro mínimo do axônio no segmento N1.

Tabela 40 - Diâmetro mínimo do axônio (μm) no segmento N1.

Diâmetro mínimo do axônio no segmento N1						
Grupos		Média	Desvio Padrão	Mediana	Mínimo	Máximo
G1 Controle	A	3,60	2,39	2,27	2,45	2,7
G2 Desnervado						
G3 Neurorrafia	B	3,55	2,45	2,16	2,41	2,66
G4 Fáscia	B	2,46	1,95	1,75	1,92	1,83
G5 Gel de plaquetas	B	4,99	2,84	3,65	3,07	3,51
G6 Gel e fáscia	B	3,60	2,39	2,276	2,45	2,70
G7 Célula-tronco	B	0,64	0,25	0,46	0,34	0,439

G1>G3=G4=G5=G6=G7

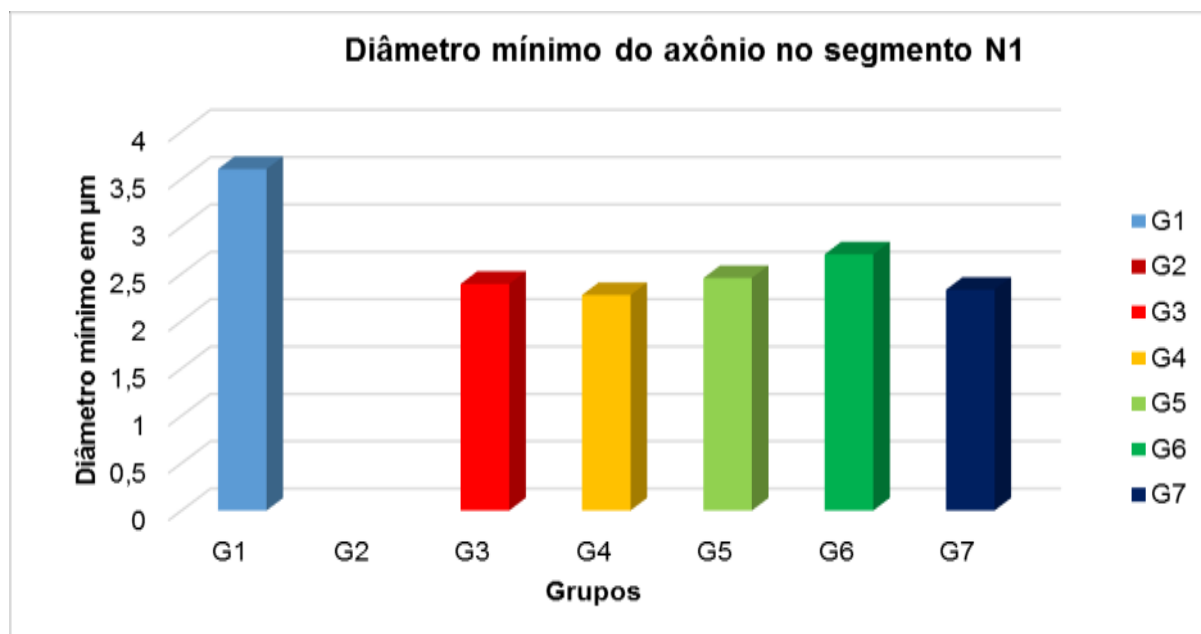


Figura 34 – Gráfico do diâmetro mínimo do axônio (μm) do segmento N1 do nervo fibular comum.

Analisando o diâmetro mínimo do axônio, os grupos de 3 a 7 não diferiram estatisticamente entre si e tiveram resultados inferiores ao observado no grupo 1 (controle de normalidade).

F) Área da bainha de mielina no segmento N1.

Tabela 41 - Área da bainha de mielina (μm^2) no segmento N1.

Área da bainha de mielina do segmento N1						
Grupos		Média	Desvio padrão	Mediana	Mínimo	Máximo
G1 Controle	A	50,51	11,67	47,95	26,65	70,78
G2 Desnervado						
G3 Neurorrafia	BC	23,19	4,33	23,52	16,01	33,32
G4 Fáscia	C	21,16	6,97	18,98	12,21	41,97
G5 Gel de plaquetas	C	21,82	4,41	21,76	15,99	34,48
G6 Gel e fáscia	B	27,09	9,59	28,39	11,05	48,12
G7 Célula-tronco	C	20,36	6,23	19,79	11,23	35,38

G1>G6>G4=G5=G7; G3=G6; G3=G4=G5=G7

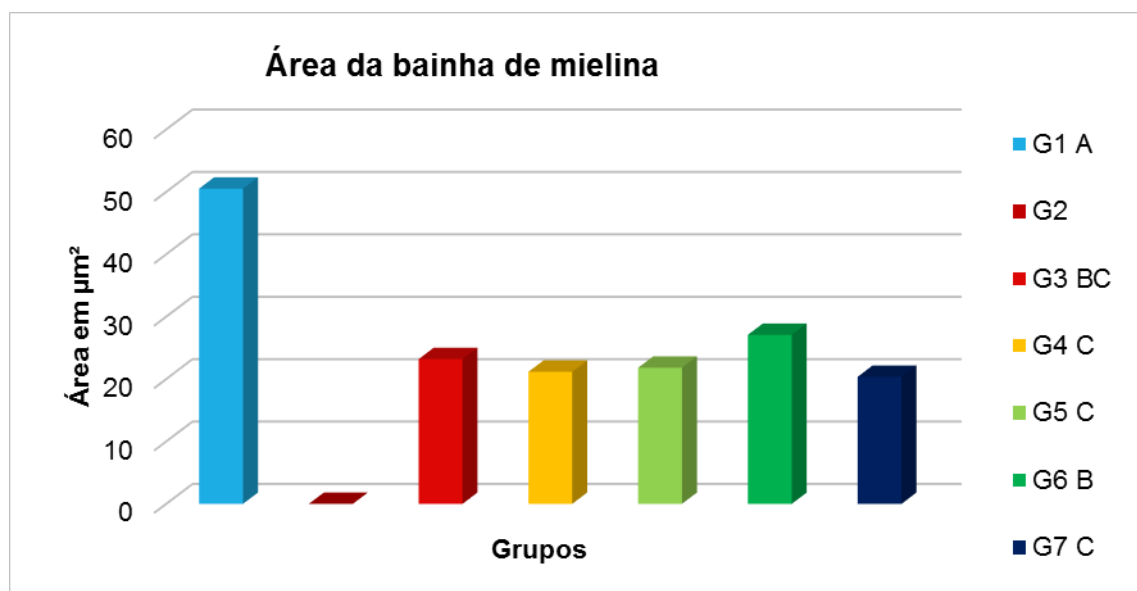


Figura 35 – Gráfico da área da bainha de mielina (μm^2) do segmento N1 do nervo fibular comum.

Quanto à área da bainha de mielina, o grupo 1 apresentou o melhor resultado seguido pelos grupos 6 e 3 que não diferiram estatisticamente entre si. Os grupos 3, 4, 5 e 7 apresentaram resultados estatisticamente semelhantes entre si.

G) Espessura da bainha de mielina no segmento N1.

Tabela 42 - Espessura da bainha de mielina (μm) no segmento N1.

Espessura da bainha de mielina do segmento N1						
Grupos		Média	Desvio padrão	Mediana	Mínimo	Máximo
G1 Controle	A	2,11	0,646	2,07	1,36	4,54
G2 Desnervado						
G3 Neurorrafia	B	1,281	0,10	1,28	1,106	1,45
G4 Fáscia	B	1,17	0,23	1,13	0,736	1,71
G5 Gel de plaquetas	B	1,227	0,14	1,23	1,016	1,59
G6 Gel e fáscia	B	1,37	0,24	1,43	0,89	1,81
G7 Célula-tronco	B	1,21	0,2	1,16	0,95	1,80

G1>G3=G4=G5=G6=G7



Figura 36 - Gráfico da espessura da bainha de mielina (μm) do segmento N1 do nervo fibular comum.

Analisando a espessura da bainha de mielina do segmento N1 do nervo fibular comum, o grupo 1 (controle da normalidade) apresentou o melhor resultado seguido pelos grupos 3, 4, 5, 6 e 7 que não diferiram entre si quanto à espessura da bainha de mielina.

H) Razão G: relação entre o diâmetro do axônio/ diâmetro da fibra nervosa no nervo fibular comum, no segmento N1.

Tabela 43- Razão G (diâmetro do axônio/ diâmetro da fibra nervosa) em N1.

Razão G no nervo fibular comum, segmento N1.						
Grupos		Mediana	Média	Desvio padrão	Primeiro quartil	Terceiro quartil
G1 Controle	A	0,48	0,48	0,07	0,46	0,51
G2 Desnervado						
G3 Neurorrafia	A	0,47	0,48	0,03	0,46	0,5
G4 Fáscia	A	0,48	0,51	0,13	0,48	0,5
G5 Gel de plaquetas	A	0,51	0,5	0,03	0,48	0,52
G6 Gel e fáscia	A	0,49	0,5	0,03	0,47	0,51
G7 Célula-tronco	A	0,49	0,49	0,03	0,47	0,5

G1=G3=G4=G5=G6=G7

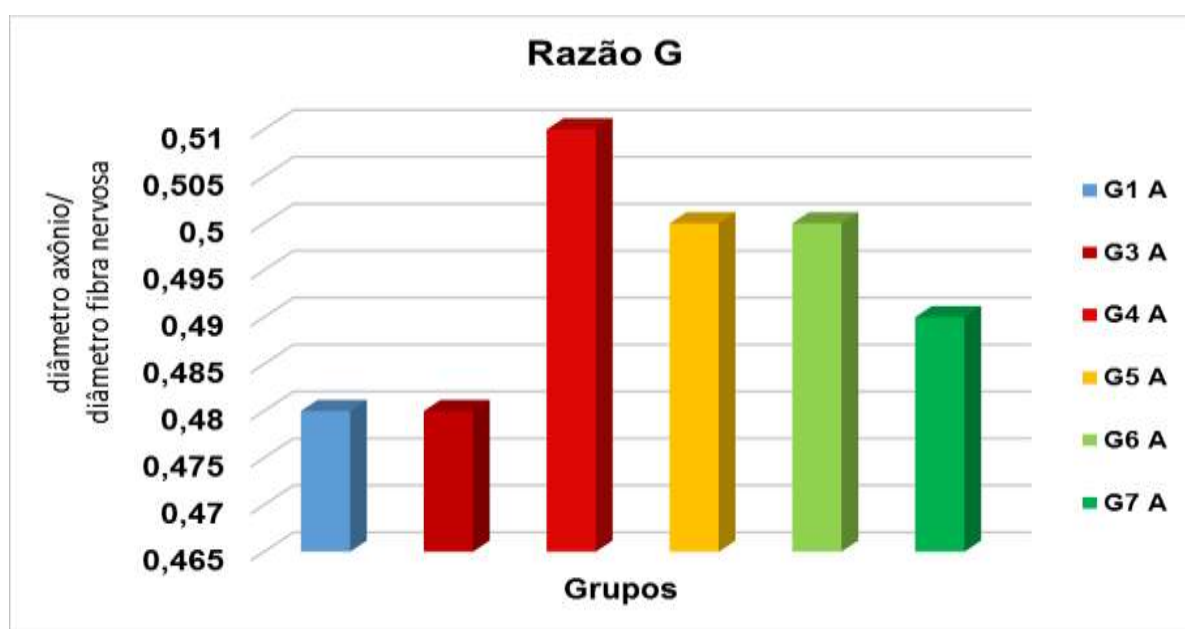


Figura 37: Gráfico da razão G no segmento N1 do nervo fibular comum.

Não houve diferença estatística entre os grupos de 1, 3, 4, 5, 6 e 7 quanto à razão G avaliada no segmento N1 do nervo fibular comum.

4.9.3 Histologia e morfometria do nervo fibular comum – N2

Os cotos proximais do nervo fibular comum foram analisados e verificou-se a formação de neuroma de amputação nos cotos proximais em todas as amostras dos animais dos grupos 2, 3, 4, 5, 6 e 7, pela coloração de prata de Bielschowsky (PB).

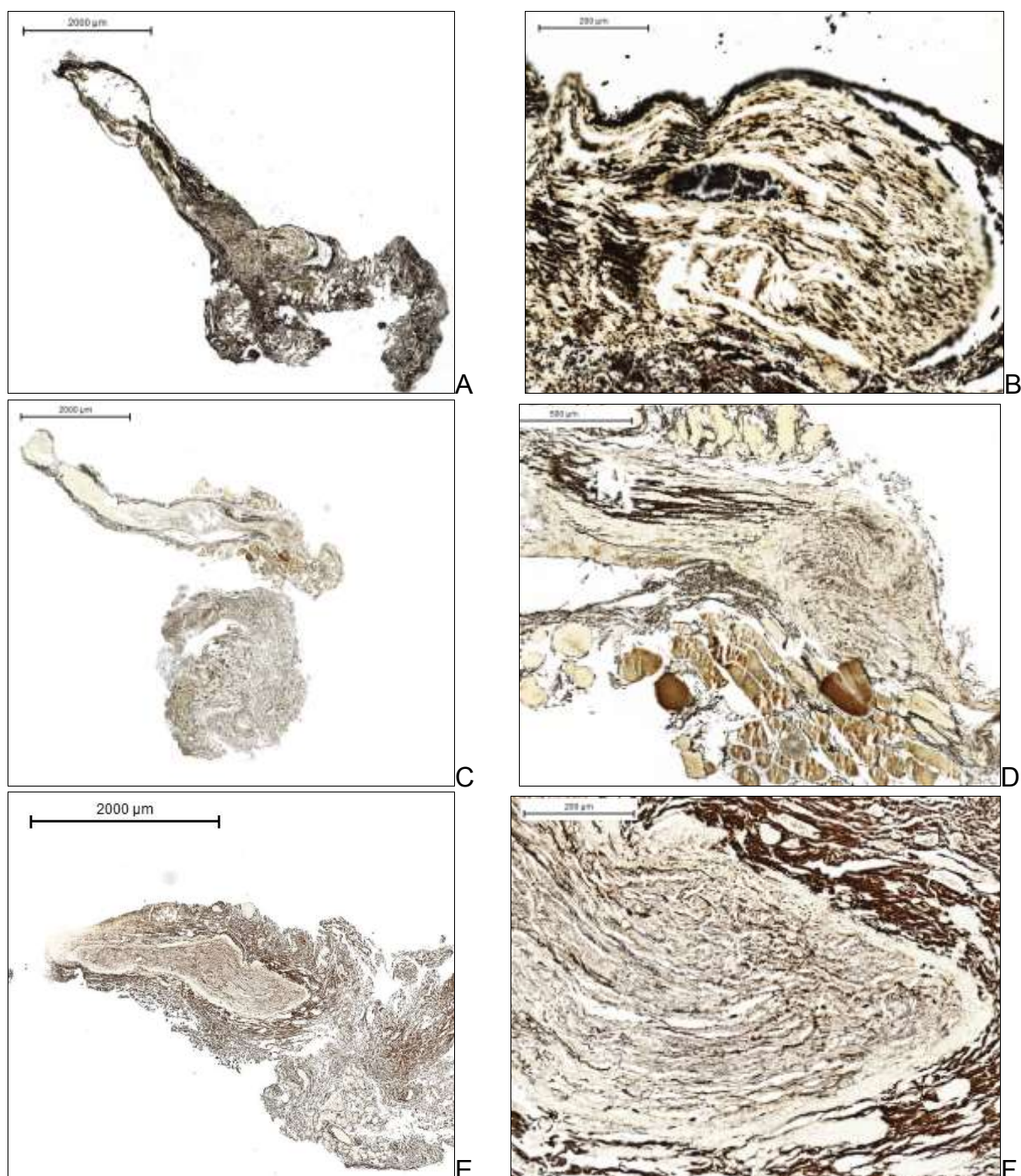


Figura 38 – Coto proximal do nervo fibular comum. A e B: grupo 2, animal nº 52. C e D: grupo 3, animal nº 66. E e F: grupo 4, animal nº 94. Figuras A, C e E: PB/1X. Figuras B e F: PB/10X. Figura D: PB/5X.

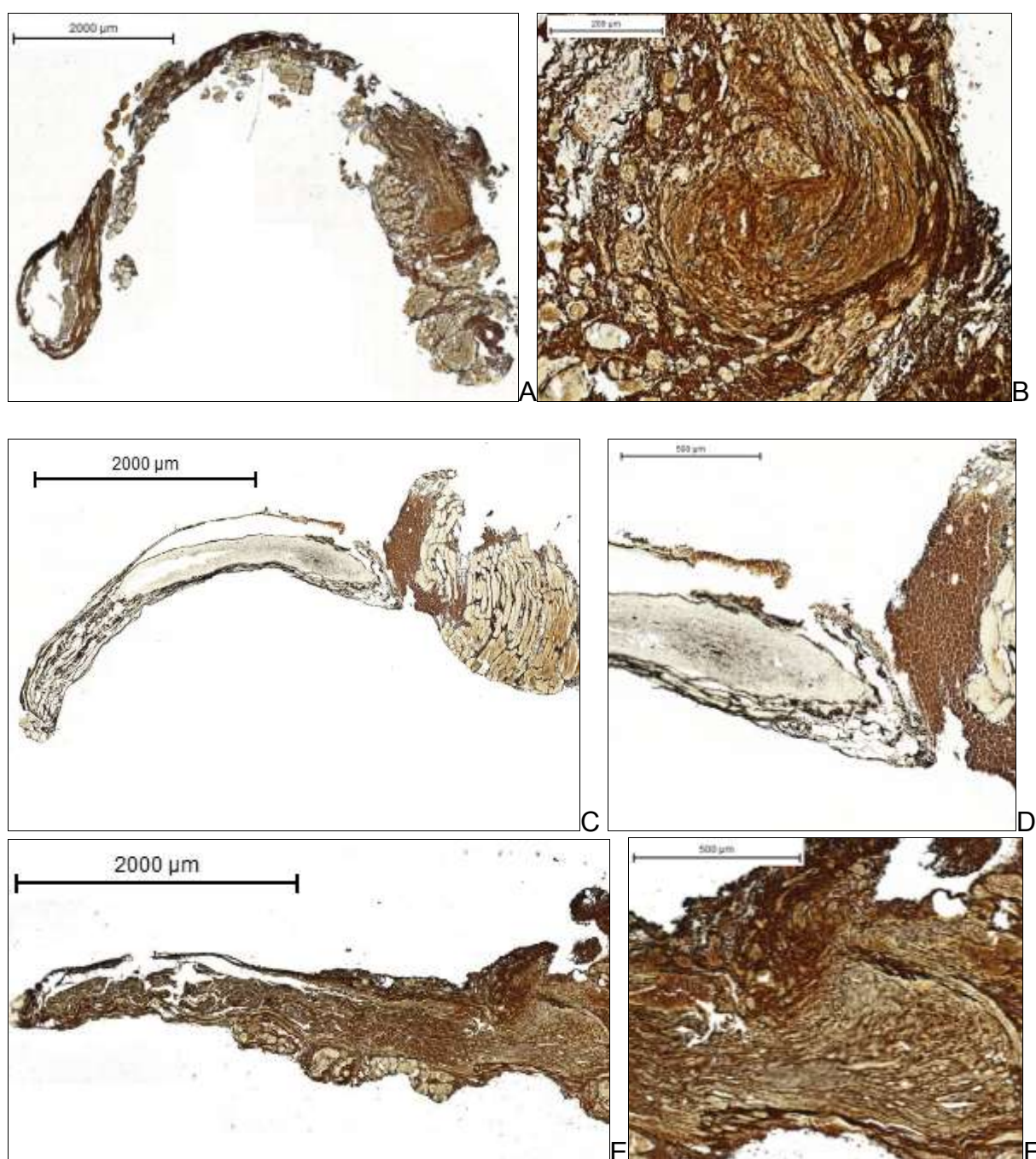


Figura 39 - Coto proximal do nervo fibular comum. A e B: grupo 5, rato nº 156. C e D: grupo 6, rato nº 126. E e F: grupo 7, rato nº 106. Figuras A, C e E: PB/1X. Figura B: PB/10X. Figuras D e F: PB/5X.

4.9.4 Histologia e morfometria da neurorrafia – N3

Os segmentos de N3 foram analisados quanto à hemorragia, edema, vascularização e granuloma em laminas coradas po HE e foram analisadas através de imunoistoquímica usando-se os marcadores CD34, Cd105, CD90 e proteína S100.

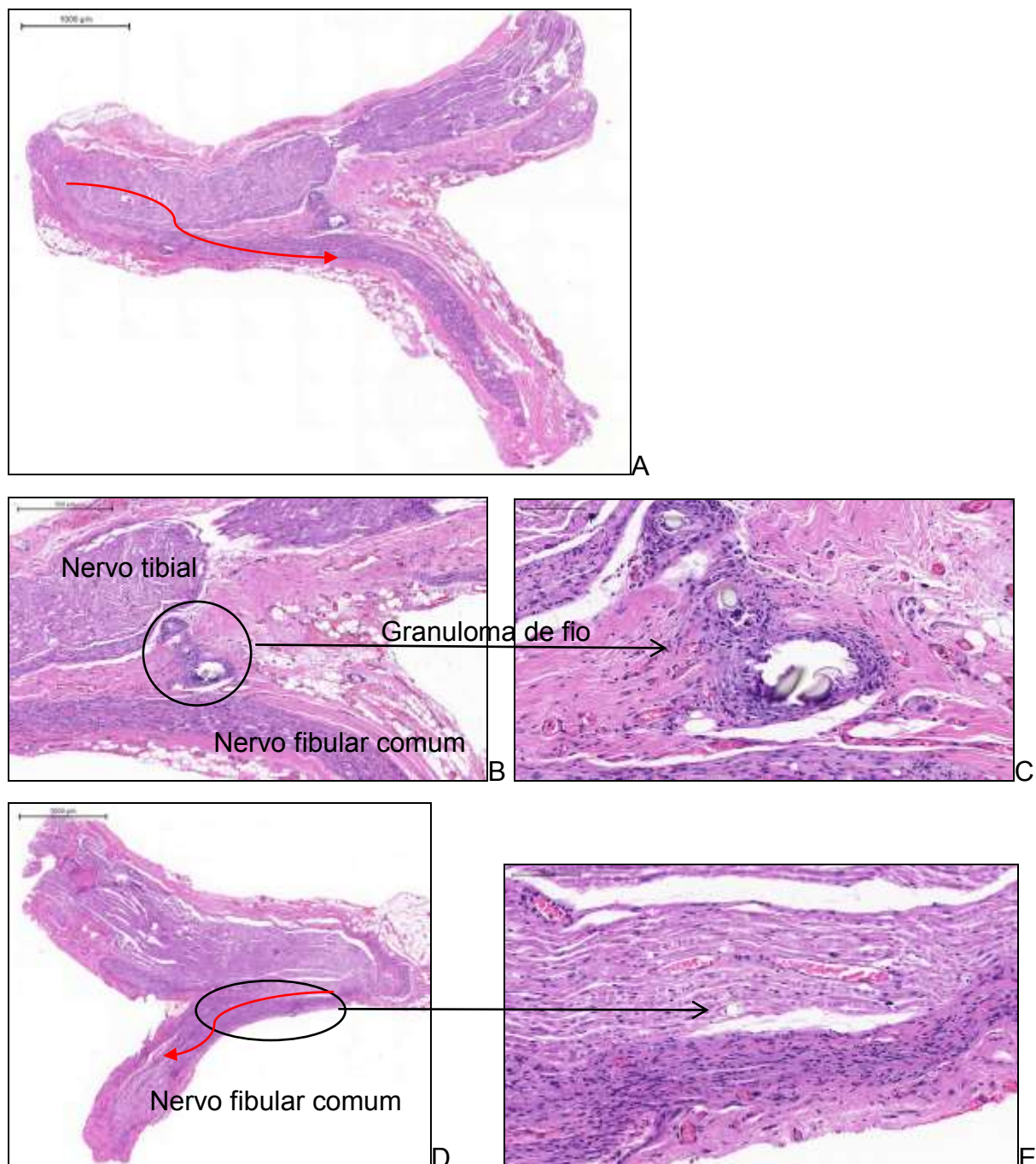


Figura 40 - Imagens da neurorrafia (N3). A: animal 74, grupo 3, mostrando a transição da neurorrafia (HE/2X). B: observar a migração de axônios do nervo tibial para o nervo fibular comum e C: granuloma de fio de sutura (B: HE/5X, C: HE/20X). D: animal 72, grupo 4 (HE/2X). E: migração de axônios do nervo tibial para o nervo fibular comum direito e vascularização score 1 (HE/20X). As setas vermelhas indicam a direção da migração dos axônios.

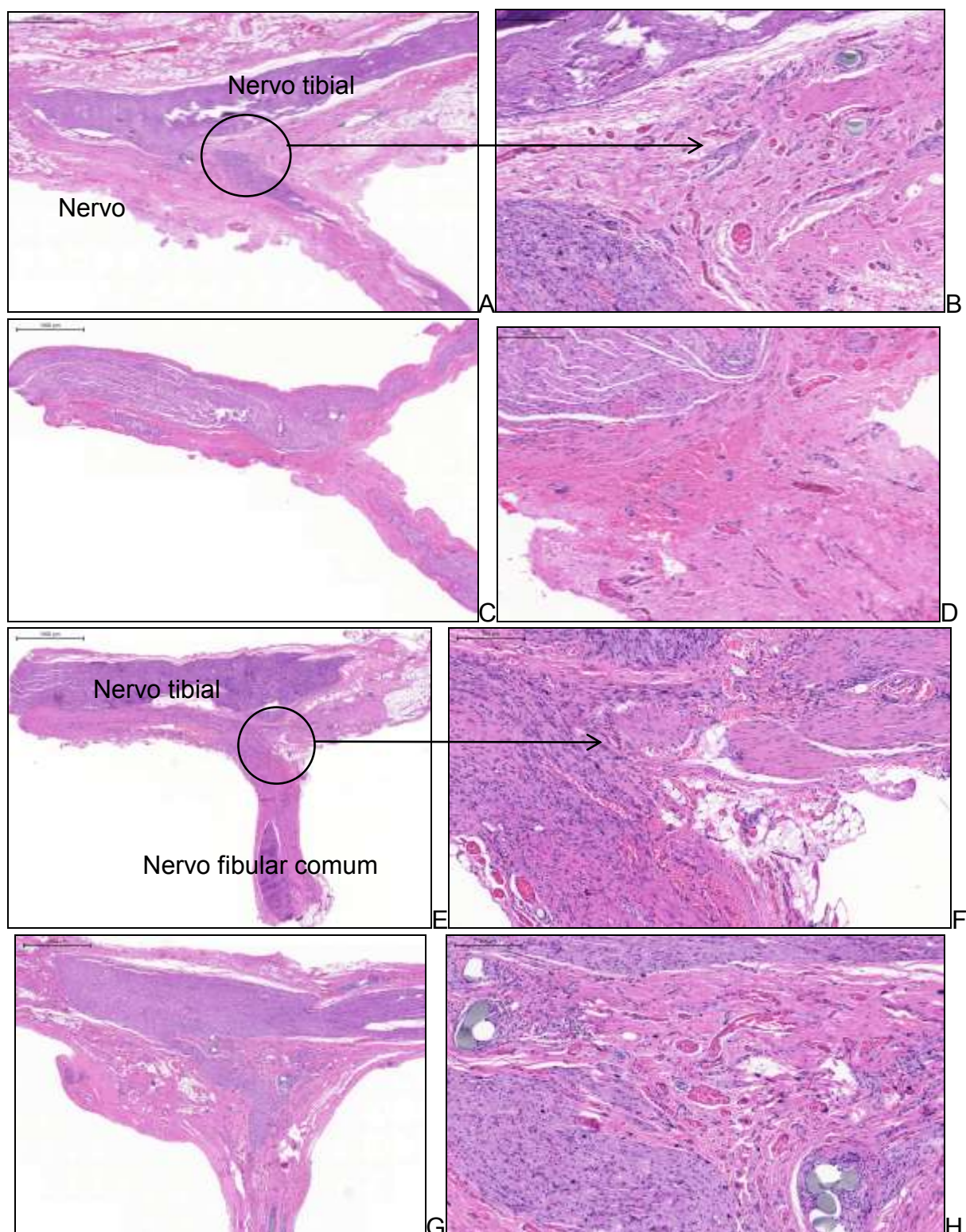


Figura 41 - Imagens da neurorrafia (N3) mostrando a migração de axônios do nervo tibial para o nervo fibular comum e o aumento da vascularização peri neurorrafia látero-terminal. A e B: Grupo 4, animal 96. C e D: Grupo 5, animal 144. E e F: grupo 6, animal 126. G e H: grupo 7, animal 100. A, B, E e G: HE/2X. C, D, F e H: HE/10X.

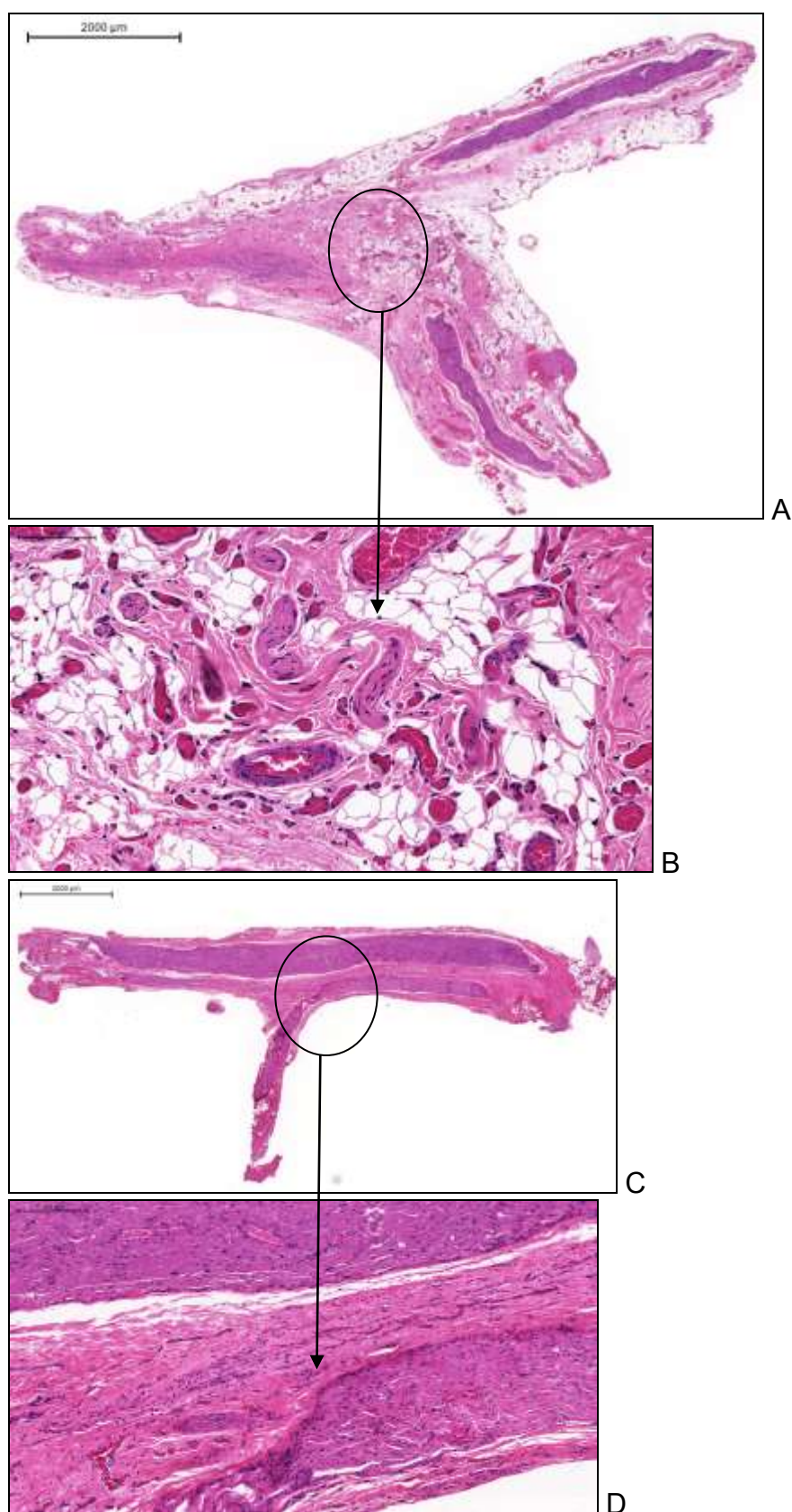


Figura 42 - Imagens da neurorrafia (N3). A e B: animais 159, grupo 5, mostrando edema, vascularização e inflamação aumentados (Score 2 para edema, 1 para inflamação e 3 para vasos). C e D: animal 124, grupo 6, mostrando menor edema, menos inflamação e menor vascularização na neurorrafia (score 1 para edema, inflamação e vasos). A: HE/2X. C: HE/1X. B: HE/20X e D: HE/10X.

Imagens de Imunoistoquímica (IMH) em N3.

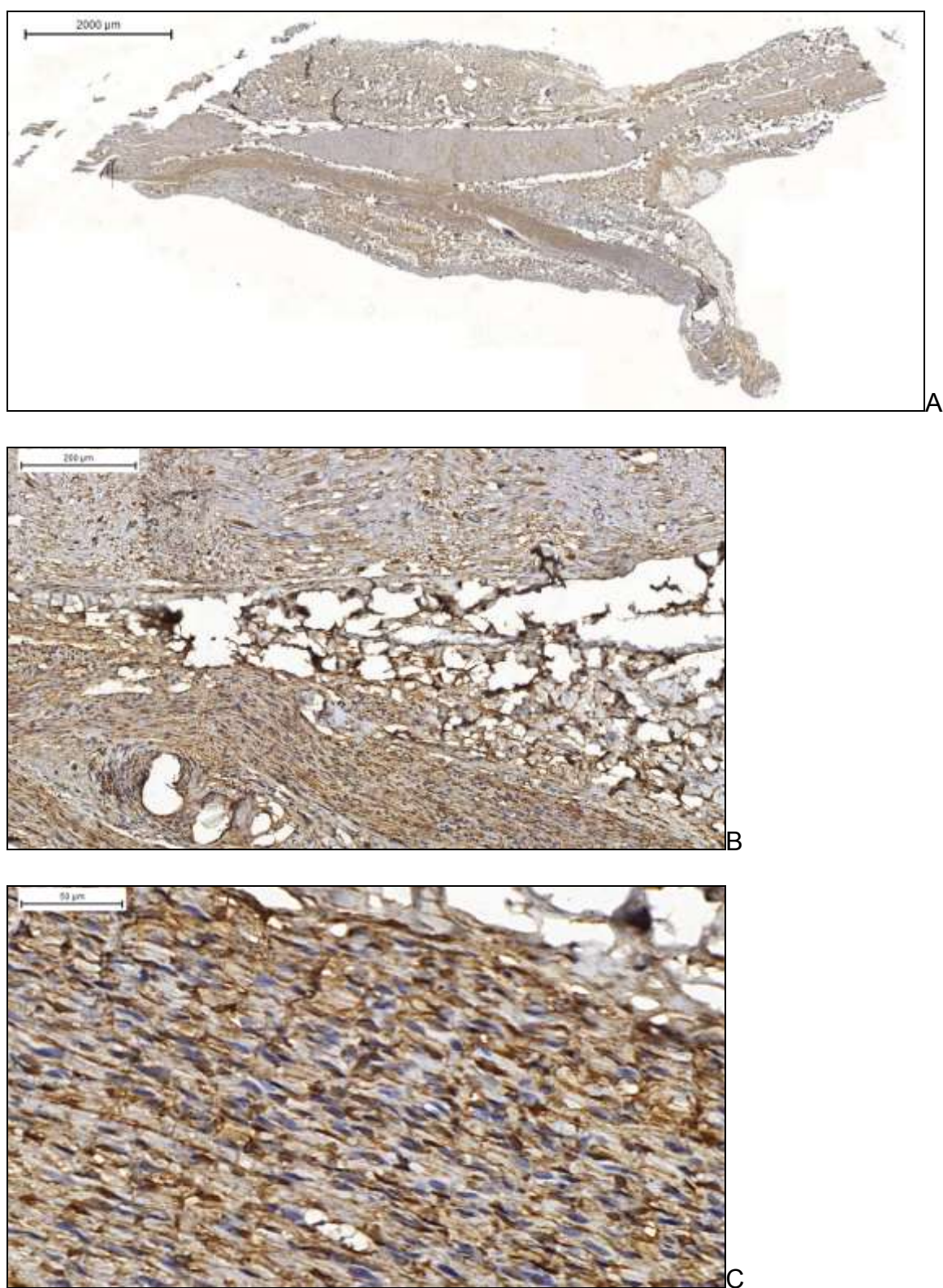


Figura 43 – Imagens de segmentos da neurorrafia (N3) coradas pelo S100 em animal n° 89, grupo 4. A: neurorrafia (IMH-S100/1X). B: S100 mais intenso no nervo fibular comum do que no nervo tibial (IMH-S100/10X). C: S100 no nervo fibular comum marcando células de Schwann (IMH-S100/40X).

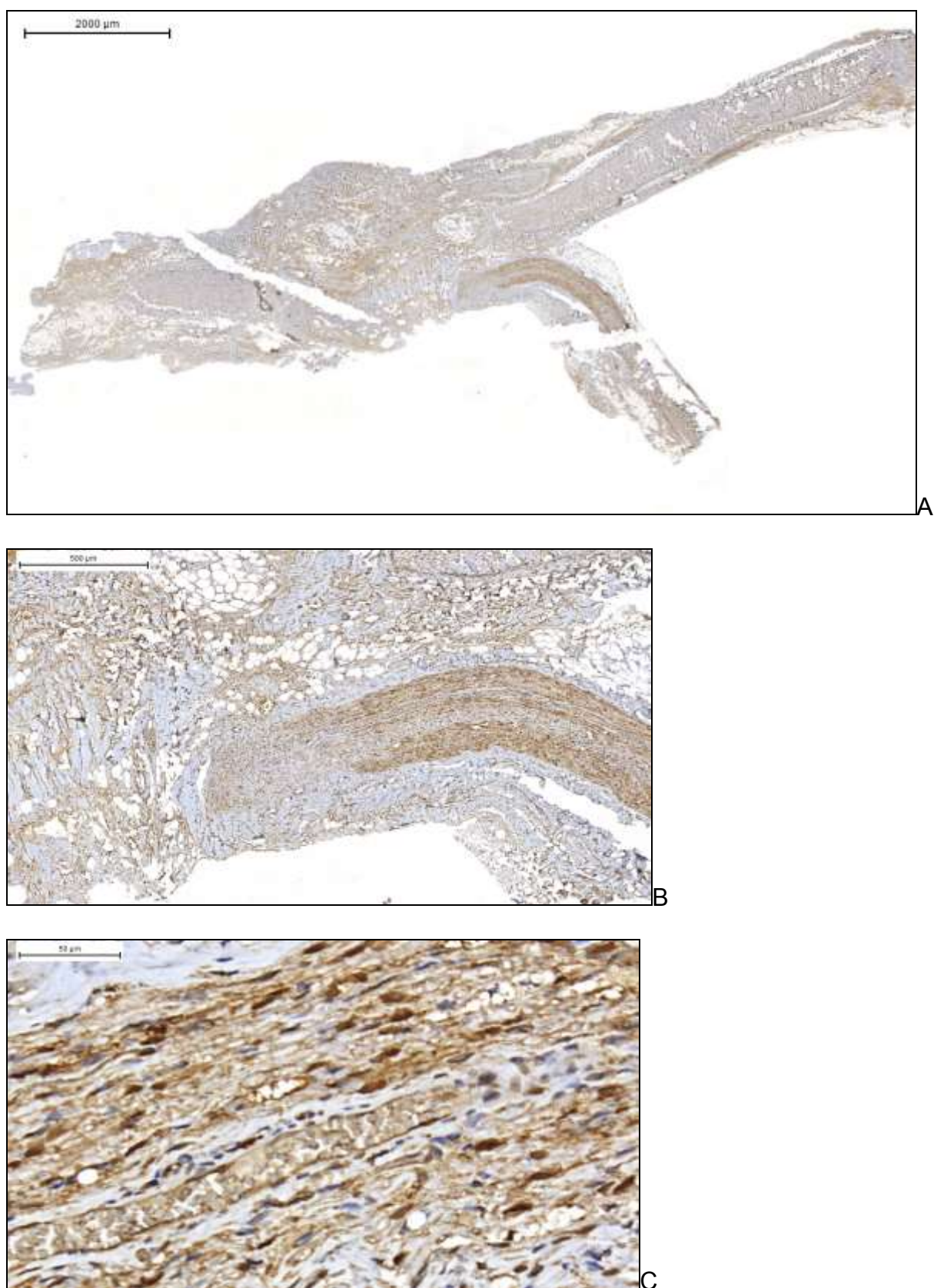


Figura 44 - Imagens da neurorrafia (N3) coradas pelo S100 em animal n° 101 do grupo 7. A: neurorrafia (IMH-S100/1X). B: S100 mais intenso no nervo fibular comum do que no nervo tibial (IMH-S100/5X). C: marcador S100 no nervo fibular comum marcando células de Schwann (IMH-S100/40X).

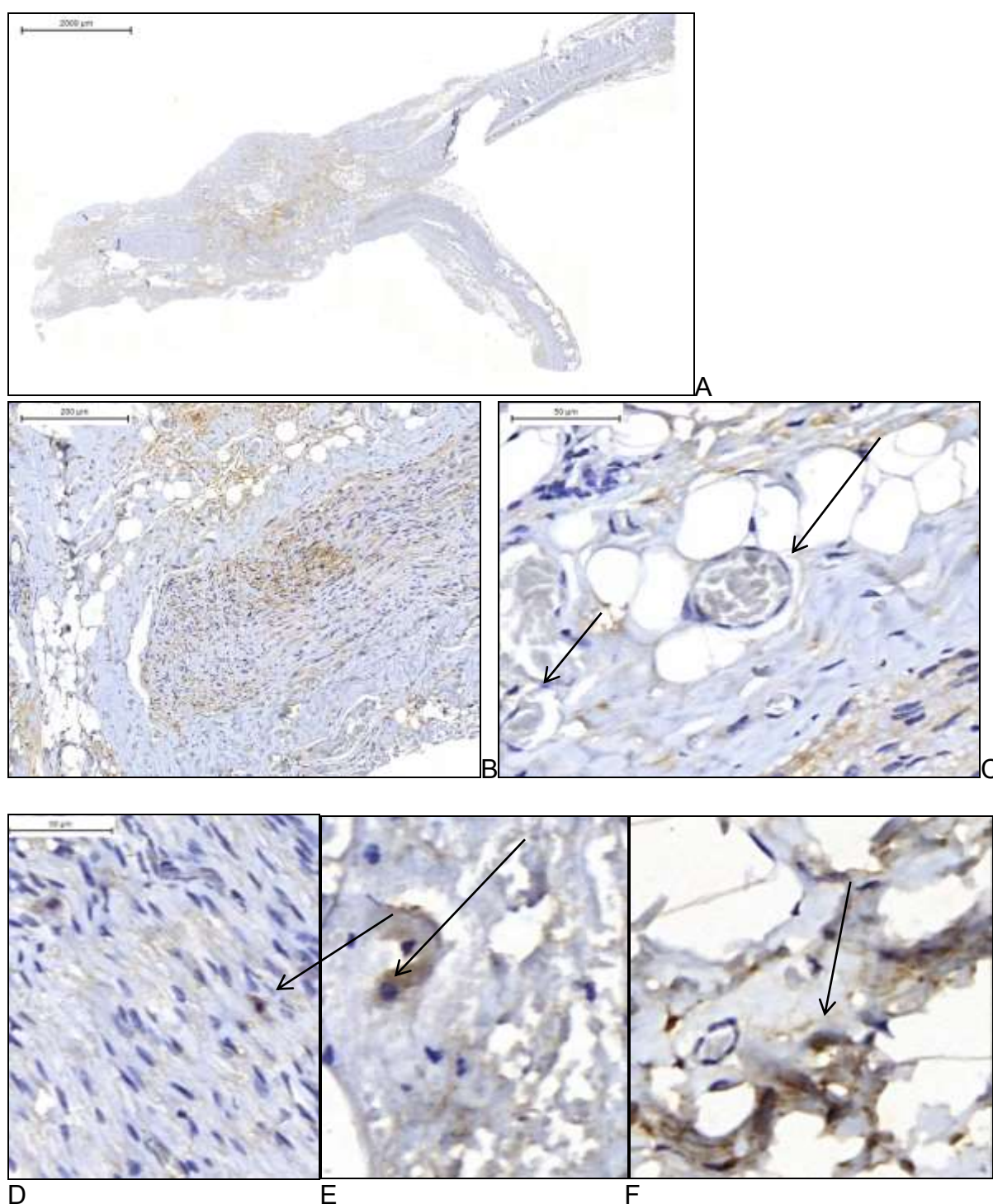


Figura 45 - Imagens da neurorrafia (N3) coradas pelo CD90 em animal nº 101 do grupo 7. A: neurorrafia (IMH-CD90/X). B: nervo fibular comum com acúmulo do marcador CD90 (IMH-CD90/10X). C: os vasos não se coram pelo CD90 (IMH-CD90/20X). D, E e F: algumas células marcadas, D: IMH-CD90/20X), E e F: IMH-CD90/40X.

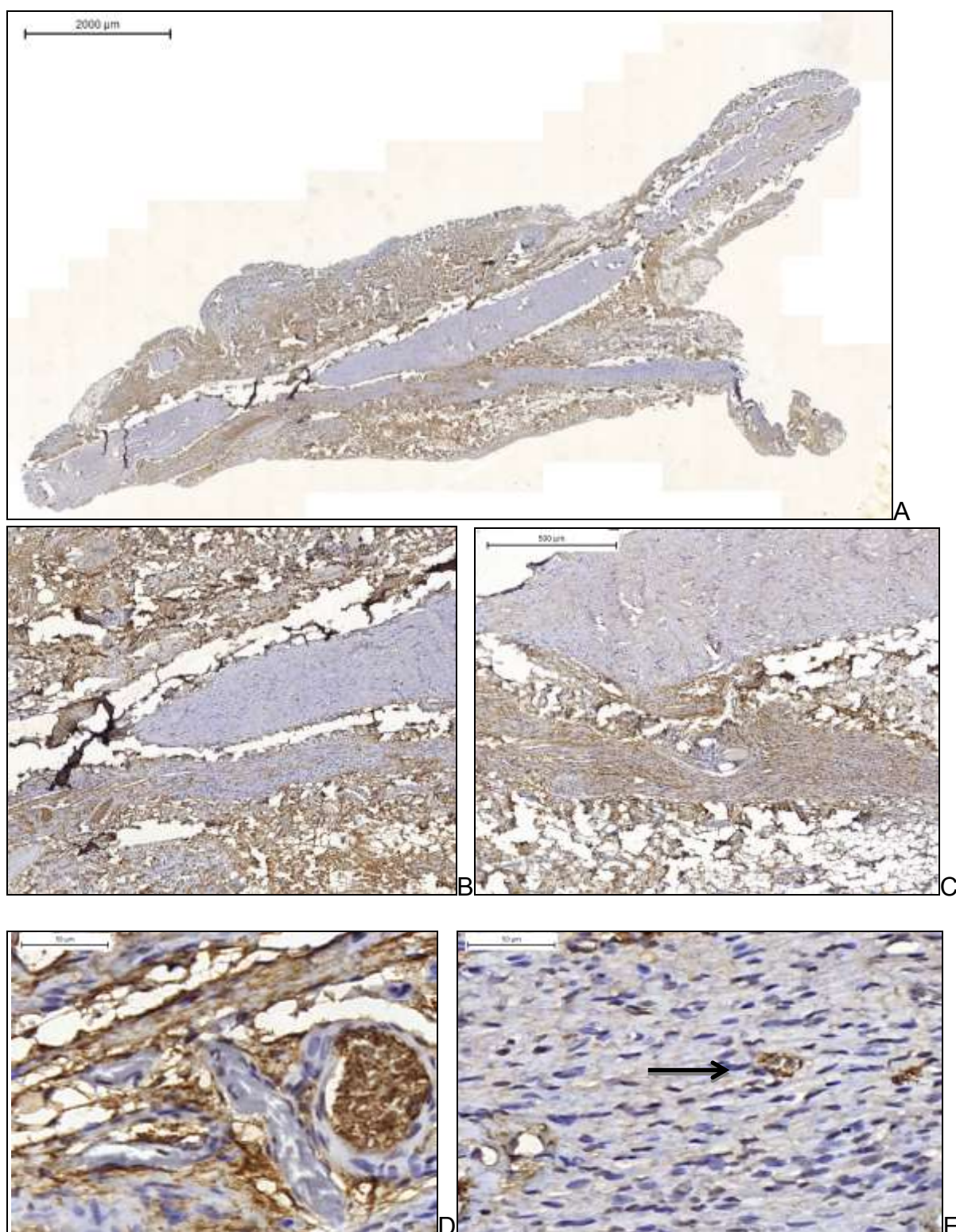


Figura 46 - Imagens da neurorrafia (N3), em animal nº 89 do grupo 4 coradas pelo CD 105. A: IMH-CD105/2X. B e C: maior intensidade do marcador no nervo fibular comum quando comparado ao nervo tibial, IMH-CD105/5X. D: vaso NÃO marcado pelo CD105 no nervo fibular comum direito, IMH-CD105/40X. E: vasos marcados pelo CD105 dentro do nervo fibular comum, IMH-CD105/40X.

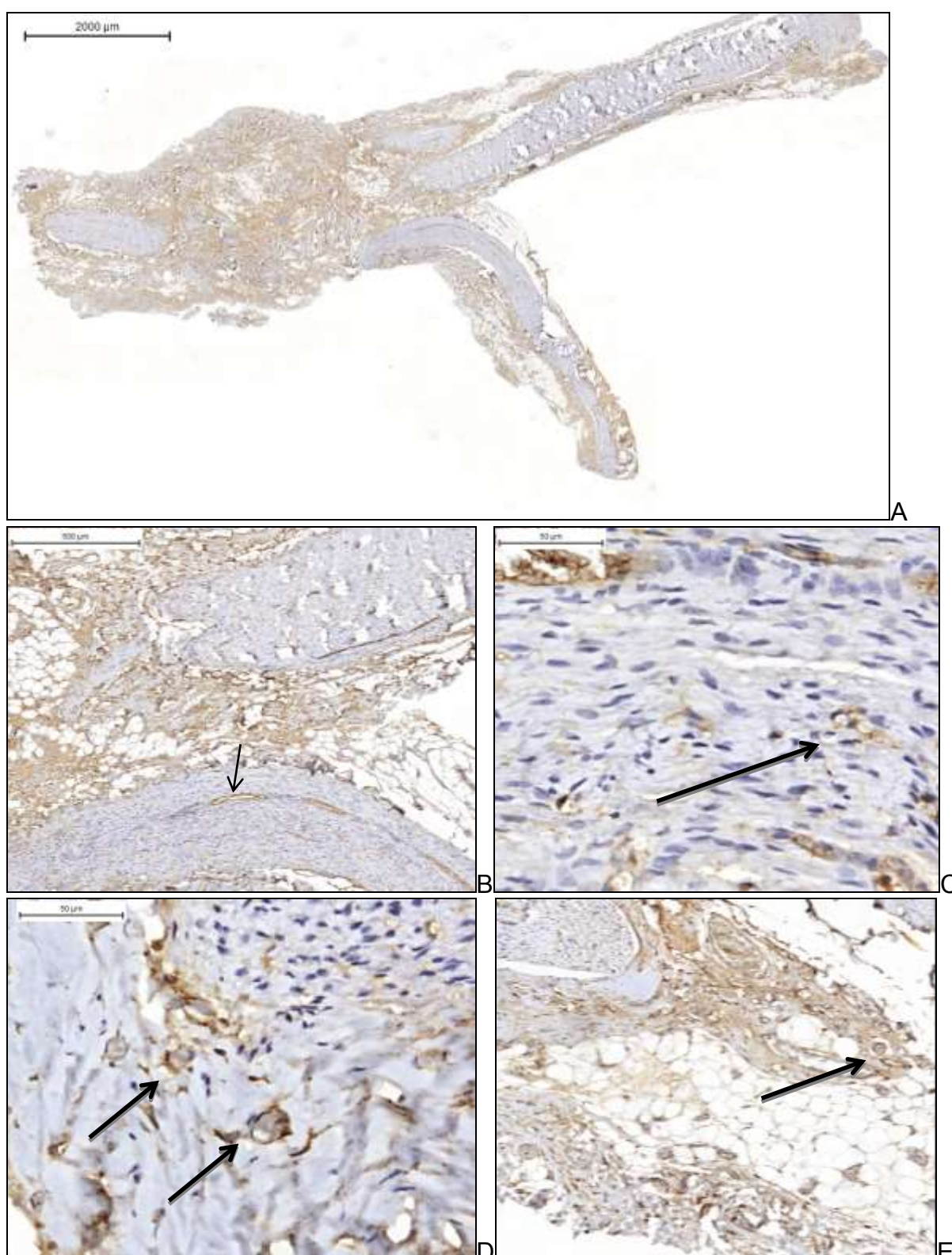


Figura 47 – A: Imagens da neurorrafia (N3), em animal n° 101 do grupo 7, marcadas pelo CD34. A: neurorrafia (IMH-CD34/1X). B: maior intensidade do marcador no nervo fibular comum quando comparado ao nervo tibial (IMH-CD34/20X). C: vasos marcados pelo CD34 no nervo fibular comum direito (IMH-CD34/40X). D: vasos marcados na periferia da neurorrafia, (IMH-CD34/40X). E: vasos marcados na periferia da neurorrafia, (IMH-CD34/20X).

S100

Intensidade: $G7 > G6$; $G7 = G3 = G4 = G5$; $G6 = G3 = G4 = G5$

Extensão: $G7 > G6$; $G7 = G3 = G4 = G5$; $G6 = G3 = G4 = G5$

Quanto à intensidade e extensão do marcador S100, o grupo 7 mostrou resultado estatisticamente superior ao resultado do grupo 6 não diferindo estatisticamente dos demais grupos, que não diferiram entre si e nem do grupo 6.

CD90

Intensidade: $G7 > G3 = G4 = G6$; $G7 = G5$; $G5 = G3 = G4 = G6$

Extensão: $G7 > G3 = G4 = G6$; $G7 = G5$; $G5 = G3 = G4 = G6$

Quanto à intensidade e extensão do marcador CD90, o grupo 7 mostrou resultado estatisticamente superior ao do grupo 6 e semelhante ao do grupo 5. Os grupos de 3 a 6 não diferiram entre si.

CD34 - perineurorrafia

Intensidade: $G3 = G4 = G5 = G6 = G7$

Extensão: $G3 = G4 = G5 = G6 = G7$

CD105 - perineurorrafia

Intensidade: $G3 = G4 = G5 = G6 = G7$

Extensão: $G3 = G4 = G5 = G6 = G7$

Quanto à intensidade e extensão dos marcadores CD34 e 105 analisados na região perineurorrafia não houve diferença estatística entre os grupos de 3 a 7.

CD34 - intra nervo fibular comum

Intensidade: $G7 > G6 = G3$; $G3 = G4 = G5 = G6$; $G4 = G5 = G7$

Extensão: $G7 > G6 = G3$; $G3 = G4 = G5 = G6$; $G4 = G5 = G7$

CD105 - intra nervo fibular comum

Intensidade: $G7 > G6 = G3$; $G3 = G4 = G5 = G6$; $G4 = G5 = G7$

Extensão: $G7 > G6 = G3$; $G3 = G4 = G5 = G6$; $G4 = G5 = G7$

Quanto à intensidade e extensão dos marcadores CD34 e 105 analisados no segmento do nervo fibular comum da neurorrafia, o grupo 7 apresentou resultados superiores aos dos grupos 3 e 6. Os resultados do grupo 7 não diferiram estatisticamente dos grupos 4 e 5. Os grupos de 3 a 6 não diferiram entre si. Segundo o procedimento NPAR1WAY para dados não paramétricos com $p < 0,05$.

Tabela 45 - Comparação entre os grupos de 3 a 7 quanto aos quesitos: hemorragia, edema, inflamação e presença de vasos no segmento N3.

Grupo		Hemorragia 0 a 4	Edema 0 a 4	Inflamação 0 a 4	Vasos 0 a 4
G3	Mediana	1 A	1 A	2 A	2 AB
	Média	1,4	0,8	1,8	2,4
	Mínimo	1	0	1	2
	Máximo	2	1	3	3
	Quartil inferior	1.00	1.00	1.00	2.00
	Quartil superior	2.00	1.00	2.00	3.00
G4	Mediana	1 A	1 A	1 A	2 B
	Média	1	1	1	2
	Mínimo	1	1	1	2
	Máximo	1	1	1	2
	Quartil inferior	1.00	1.00	1.00	2.00
	Quartil superior	1.00	1.00	1.00	2.00
G5	Mediana	2 A	1 A	1 A	2 B
	Média	2	1,2	1,2	2
	Mínimo	1	1	0	1
	Máximo	4	2	2	3
	Quartil inferior	1.00	1.00	1.00	2.00
	Quartil superior	2.00	1.00	2.00	2.00
G6	Mediana	2 A	1 A	1 A	2 B
	Média	2	1,2	1,2	2
	Mínimo	1	1	0	1
	Máximo	3	2	3	3
	Quartil inferior	1.00	1.00	1.00	2.00
	Quartil superior	3.00	1.00	1.00	2.00
G7	Mediana	1 A	1 A	0 A	4 A
	Média	1,2	1	0,4	3,6
	Mínimo	1	1	0	3
	Máximo	2	1	2	4
	Quartil inferior	1.00	1.00	0.00	3.00
	Quartil superior	1.00	1.00	0.00	4.00

Hemorragia, edema e inflamação: G3=G4=G5=G6=G7

Vasos: G7=G3; G7>G4=G5=G6; G3=G4=G5=G6

Quanto aos quesitos hemorragia, edema e inflamação observados perineurorrafia, os grupos de 3 a 7 não diferiram estatisticamente entre si. Quanto aos vasos observados nesse mesmo segmento, o grupo 7 apresentou resultado estatisticamente semelhante ao do grupo 3 e superior aos resultados dos grupos 4, 5 e 6 que não diferiram entre si e nem do grupo 3. Segundo o procedimento NPAR1WAY para dados não paramétricos admitindo-se $p < 0,05$.

Tabela 46 - comparação entre os grupos de 3 a 7 quanto ao quesito granuloma no segmento N3.

Grupo	Granuloma		Comparação
	Sim	Não	
G3	4	1	A
G4	4	1	A
G5	3	2	A
G6	5	0	A
G7	5	0	A

G3=G4=G5=G6=G7

Quanto à presença de granuloma no segmento da neurorrafia dos grupos de 3 a 7, não houve diferença estatística entre os grupos.

As comparações entre os grupos referentes ao granuloma no segmento N3 foram feitas segundo o procedimento FREQ admitindo-se $p < 0,05$.

4. DISCUSSÃO

4.1 Método

Todo o experimento foi realizado em laboratórios da UNIPEX/ Botucatu. Os procedimentos cirúrgicos e testes foram realizados pela mesma pesquisadora.

Os animais foram divididos aleatoriamente através de sorteio: papéis com os nomes dos grupos foram colocados em um saco de pano e sorteados, dividindo os 140 animais em sete grupos.

A separação, identificação e encapsulamento das células-tronco foram realizadas no Laboratório de Engenharia Celular do Hemocentro por profissional capacitado.

As lâminas de nervos e músculos foram processadas no Laboratório da UNIPEX, as lâminas para imunoistoquímica foram processadas no laboratório de Patologia do Hospital da UNESP/ Botucatu; sempre por técnicos experientes.

A escolha dos animais

O estudo envolveu ratos (*Rattus norvegicus*) da linhagem “Wistar”.

Segundo Tos et al. (2009), ratos e camundongos são os animais de laboratório mais utilizados em estudos de regeneração de nervos, havendo nítida prevalência do uso de ratos, pois, em uma análise na base de dados “PubMed”, de uma amostra aleatória de 1.500 artigos de pesquisa sobre “regeneração de nervos” os autores encontraram que mais de 90% desses estudos adotou o rato como modelo experimental. A principal razão parece ser o maior tamanho dos nervos de ratos em relação a camundongos, o que reduz a complexidade dos procedimentos microcirúrgicos, aumenta a possibilidade de fazer testes funcionais padronizados e comparáveis e ao fato dos ratos serem mais resistentes.

Para Nichols et al. (2005) os nervos de ratos possuem fibras nervosas semelhantes às do homem em tamanho e morfologia. Todas as razões acima justificam o rato “Wistar” ter sido o modelo animal escolhido para esse experimento.

Ratos do sexo masculino foram escolhidos por serem menos suscetíveis à ação dos hormônios adenohipofisários e gonadais como estrógeno e progesterona e por não servirem como matrizes de reprodução, sendo mais fáceis de serem adquiridos (Ellis e McCaffrey, 1984).

Embora se recomende usar o menor número possível de animais (Estatuto do COBEA), acredita-se que o número de 20 animais por grupo se prestou à observação de possíveis diferenças entre os grupos. Há três razões que orientaram essa escolha: o uso de 20 animais por grupo é ideal para a análise estatística, como visto em outros estudos semelhantes sobre regeneração nervosa periférica (Maciel, 2011; Geraldo 2012); foram usadas células-tronco não cultivadas (em número reduzido se comparado às culturas de células) e esperavam-se resultados com diferenças sutis entre os grupos, um número maior de animais em cada grupo poderia ajudar a encontrar diferenças entre os grupos; esperava-se perder alguns animais devido ao longo tempo de observação.

Sete animais morreram durante o tempo do estudo. Dos 7 animais, quatro morreram na anestesia e um na perimetria, provavelmente por fatores associados ao estresse da manipulação. Apenas dois deles morreram durante o período de observação. A perda foi bem distribuída entre os grupos e menor que a esperada, dado o tempo de observação de 180 dias.

A divisão dos grupos

Os animais foram divididos em sete grupos, um grupo controle onde realizamos a dissecação e identificação dos nervos, ou grupo “Sham”, um grupo controle de desnervação e mais cinco grupos onde se realizou a neurorrafia látero-terminal.

O grupo “Sham” foi escolhido pois esperávamos resultados longe do normal em se tratando de neurorrafia látero-terminal, trata-se de um grupo onde se simula o procedimento cirúrgico até o momento do desfecho crucial, não se realizando o desfecho, procedimento muito usado na área cirúrgica (Vieira e Hossne, 2015).

O gel de plaquetas foi usado no grupo 7 por ser o meio mais adequado disponível à manipulação, transferência e deposição das células-tronco na área da

neurorrafia látero-terminal, pois se tratou de neurorrafia látero-terminal e não término-terminal, onde normalmente se interpõem um tubo de diferentes materiais.

Além do gel de plaquetas um segmento de 1cm² de fáscia foi removida da musculatura superficial aos músculos bíceps femoral e semitendinoso, subjacente ao corte do membro posterior direito usado para a cirurgia de neurorrafia. A fáscia foi usada envolvendo a neurorrafia no intuito de certificar-se de que o gel contendo as células-tronco ficariam em torno da neurorrafia látero-terminal e não migrariam para os tecidos vizinhos. Desta forma foram necessários um grupo usando apenas a fáscia, um grupo usando apenas o gel de plaquetas e outro grupo usando o gel de plaquetas e a fáscia para que se pudesse fazer as comparações entre os grupos. Um grupo apenas com a neurorrafia látero-terminal foi estudado a fim de avaliar todas as outras intervenções.

O tempo de observação

Os animais foram sacrificados após 180 dias de tratamento. Notaram-se alterações positivas nos índices funcionais dos nervos ciático, tibial e fibular comum medidos pelo teste de avaliação da marcha entre 120 e 180 dias. Pode-se verificar diferenças entre os grupos experimentais através da análise desses índices no período de observação entre 120 e 180 dias como será mostrado adiante.

O tempo de observação de 180 dias foi longo se comparado à maioria dos estudos experimentais sobre regeneração nervosa periférica e neurorrafia látero-terminal. Na literatura o tempo de observação em estudos sobre neurorrafia látero-terminal tem sido em torno de 12 semanas (Here et al., 1992; Zhang et al., 1998; Liu et al., 1999; Al-Qattan, 2000) a 24 semanas (Cederna et al., 2001; Maciel et al., 2011). O estudo que apresentou o maior tempo de observação foi o estudo original de Viterbo (1992), com tempo médio de observação de 30,8 semanas. Pannucci et al. (2007) em uma revisão sobre estudos experimentais em neurorrafia látero-terminal encontraram estudos com tempo mínimo de observação de 8 semanas e no máximo de 24 semanas.

Hare et al. (1992) constataram que nos estudos experimentais de lesão nervosa periférica e neurorrafia término-terminal o tempo de observação deve ser de 12 semanas para que se observe a recuperação funcional perto do ótimo; e que

mudanças morfológicas observadas após este período provavelmente representem neurorregeneração inefetiva. Os autores estudaram a recuperação de diferentes nervos periféricos lesados e suturados de forma término-terminal durante 52 semanas.

Viterbo (1992) em seu trabalho sobre a neurorrafia látero-terminal observou os animais por um tempo médio de 7,7 meses, considerando esse o tempo mínimo necessário para a avaliação da regeneração nervosa e consequente reinervação muscular.

Papalia et al. (2007) observaram diferença estatística na recuperação da função motora periférica através do “grasping test” após neurorrafia látero-terminal do nervo mediano ao nervo radial inclusive na trigésima semana. Maciel (2011) em estudo sobre neurorrafia látero-terminal e eletroestimulação também encontrou diferenças entre seus grupos experimentais entre 150 e 180 dias (tempo máximo do estudo) quanto ao teste de avaliação da marcha (“Walking Track”). Assim, acredita-se que estudos que se proponham a pesquisar melhorias nas neurorrafias látero-terminais devam ter tempo de observação mais prolongado que nos estudos sobre neurorrafias término-terminais. Talvez se o presente estudo estivesse se prolongado por mais algumas semanas, fosse possível observar progressão na recuperação funcional dos grupos, sobretudo quanto ao teste funcional de avaliação da marcha (“Walking Track”).

Não há na literatura consenso sobre o tempo de seguimento em estudos envolvendo células-tronco (Hundepool et al., 2014).

Baseado no exposto acima, adotamos o tempo de observação de 24 semanas. Acredita-se que vinte e quatro semanas seja suficiente para ocorrer degeneração nervosa e chegada dos axônios à placa motora provocando a reinervação das fibras musculares do músculo tibial cranial através da neurorrafia látero-terminal e consequente recuperação funcional do músculo tibial cranial. Talvez o tempo de observação entre 24 semanas (como no presente estudo) e 30 semanas seja ideal.

4.2 Neurorrafia látero-terminal

A neurotme se mostra o modelo de eleição para estudos experimentais por permitir a investigação de novas técnicas microcirúrgicas, avaliação da efetividade de vários medicamentos e tratamentos fisioterápicos além de permitir estudos na área da engenharia de tecidos (Tos et al., 2009).

O modelo experimental usado nesse estudo foi a neurorrafia látero-terminal (sutura do coto distal do nervo fibular ao nervo tibial: nervo doador) tendo o músculo tibial cranial como órgão-alvo observado. Esse modelo foi introduzido por Viterbo et al. (1992). Segundo esses autores o modelo apresenta duas vantagens: o músculo tibial cranial é inervado exclusivamente pelo nervo fibular comum, portanto após a secção do nervo fibular comum, conta-se apenas com a neurorrafia látero-terminal para a recuperação do trofismo muscular; a localização superficial do músculo tibial cranial possibilita o acompanhamento clínico dessa reinervação. No presente estudo, os músculos tibiais craniais foram sempre facilmente encontrados, mesmo no grupo desnervado.

A neurorrafia foi feita por meio de magnificação da imagem por meio do uso de microscópio DL Vasconcelos, usando-se técnicas microcirúrgicas de forma atraumática. Usou-se fio 10.0, e o coto distal foi levado ao nervo doador sem nenhuma tensão (Braun, 1982; Lundborg, 1987; Toby et al. 1996; Lundborg & Sweden, 2000; Jiao et al, 2009). Não foi feita janela no epineuro, pois Viterbo et al. (1998) mostraram que os resultados foram iguais entre os grupos em que se fez e em que não se fez a janela de epineuro em modelo experimental semelhante.

Embora a neurorrafia término-terminal continue sendo o padrão ouro para o reparo cirúrgico das lesões nervosas periféricas (Sunderland, 1968; Braun, 1982; Lundborg, 1987; Liu et al., 1999; Cederna et al., 2001; Piskin et al., 2009) a neurorrafia látero-terminal é uma opção no reparo de nervos periféricos quando a neurorrafia término-terminal não for possível (Zhao et al., 1997; Cederna et al., 2001; Beris et al., 2007; Pannucci et al., 2007). Atualmente, estudos clínicos usando a neurorrafia látero-terminal têm sido conduzidos com resultados mostrando reinervação (Viterbo et al., 1993; Viterbo et al., 1994a; Oğü et al., 2003; Voche e Uttara, 2005; Pondaag & Gilbert, 2008). Pannucci et al. (2007) em estudo de revisão da literatura concordam que mais estudos são necessários a fim de incluir definitivamente a neurorrafia látero-terminal como técnica no tratamento de lesões

nervosas e que outros estudos devam ser direcionados a fim de elucidar o papel de fatores neurotróficos na melhora clínica associada à neurografia látero-terminal.

4.3 A escolha das células tronco mesenquimais da gordura

Embora a maioria das pesquisas tenha estudado a influência das células-tronco derivadas da medula óssea na regeneração nervosa periférica (Martins & Siqueira, 2005; Braga-Silva et al., 2006; Lopes et al., 2006; Chen et al., 2006; Chen et al., 2007; Colomé et al., 2008; Walsh & Midha, 2009; Catarozzi et al., 2015) as células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo também têm sido fonte de interesse crescente da literatura atual (Zuk et al., 2001; Covas, 2006; Yarak & Okamoto, 2010; Erba et al., 2010; Tsuji et al., 2014).

O tecido adiposo é de fácil acesso e abundante no corpo humano. As células-tronco mesenquimais do tecido adiposo têm potencial de transdiferenciação em célula tipo Schwann ou potencial em auxiliar na regeneração nervosa periférica por outros mecanismos conforme comprovado pela literatura atual (Martins & Siqueira, 2005; Covas et al., 2006; Walsh & Midha, 2009; Yarak & Okamoto, 2010; Erba et al., 2010; Salibian et al., 2013; Hundepool et al., 2014; Tsuji et al., 2014).

Yarak & Okamoto (2010), em revisão da literatura, afirmaram que a frequência de células-tronco no tecido adiposo excede a frequência das células-tronco mesenquimais no estroma medular e que a taxa de proliferação celular das células-tronco mesenquimais da gordura é maior do que a taxa de proliferação das células-tronco mesenquimais da medula óssea. Os autores também afirmam que por meio de lipoaspirado pode-se obter de 2 a 6×10^8 células em 300ml de tecido adiposo. Ou seja, a gordura é uma fonte de fácil acesso, com número abundante de células-tronco que por sua vez apresentam taxa elevada de proliferação. Essas afirmações suportam a escolha de usar células-tronco não cultivadas do tecido adiposo na regeneração nervosa periférica no presente estudo.

As células-tronco da gordura foram colhidas da região inguinal do rato, por se tratar de local de fácil acesso, que danificou pouco tecido e permitiu a coleta de material suficiente. O número de células-tronco implantadas de 1×10^5 foi o menor número de células-tronco mesenquimais encontradas em uma amostra, ou seja, em

um animal. Considerou-se o menor número para que cada amostra fosse igual; garantindo-se um número mínimo possível em cada animal.

O número de células-tronco a ser usado em determinado experimento não está estabelecido na literatura. Em uma revisão de 14 estudos, Walsh e Midha (2009) encontraram estudos usando de 4×10^3 a 2×10^7 células-tronco, com pouca explicação sobre a quantidade de células-tronco usadas.

Outros estudos sobre células-tronco na regeneração nervosa periférica mostram o uso de células-tronco de várias origens e quantidades: células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea, cultivadas e isoladas na proporção de 2×10^7 células/ml, com a implantação de 1×10^5 células por tubo de silicone, em defeitos de nervo periférico em rato (Chen et al., 2006); células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea, não cultivadas, isoladas na proporção de 10^7 células/ml e implantadas em tubo de silicone que se interpôs em defeito de nervo ciático em rato (Braga-Silva et al., 2006); células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea, cultivadas, isoladas e implantadas na proporção de 1×10^5 células-tronco por animal colocadas em tubos de silicone em defeito de nervo periférico em ratos (Lopes et al., 2006); células-tronco mesenquimais derivadas do líquido amniótico, usadas na proporção de 10^5 células/ml, em que se injetou 50µl desse concentrado de células-tronco derivadas do líquido amniótico em 100µl de gel de plaquetas dentro de um tubo de celulose de 5 mm interposto em secção de nervo ciático, em ratos (Pan et al., 2006); células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea, implantadas em tubos de silicone para corrigir defeitos de 15mm do nervo ciático em rato na proporção de 1×10^6 células por animal (Chen et al., 2007); células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea, cultivadas, diferenciadas em células de Schwann e injetadas em tubo de silicone de 10mm interposto em defeito do nervo ciático em ratos na proporção de $1-2 \times 10^7$ células-tronco por rato (Shimizu et al. 2007); células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea, não cultivadas, implantadas em tubos de silicone, em defeitos de 5mm do nervo tibial em coelho na proporção de 1×10^6 células por coelho (Colomé et al., 2008); células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo, cultivadas e injetadas em tubo de veia interposto em defeito de nervo periférico, na concentração de 5×10^6 por animal (Rosa, 2013).

O experimento aqui desenvolvido (células-tronco do tecido adiposo na neurografia látero-terminal) é condizente com a literatura atual quanto à concentração de células-tronco usadas e vale ressaltar a observação de Walsh e Midha (2009): segundo os autores talvez uma grande concentração de células-tronco implantadas em determinado local gere competição entre as células-tronco transplantadas quanto ao espaço e recursos de sobrevivência no local onde foram implantadas.

Em cirurgias para correção de lesões nervosas periféricas o tempo é sempre crucial. Quando indicada a necessidade, a neurografia deve ser feita o mais precocemente possível (Ballance, 1903; Jiao et al., 2009; Lundborg & Sweden, 2000). Portanto esse modelo usou células-tronco não cultivadas, simulando uma situação de trauma agudo de nervo periférico com correção o mais precoce possível.

Levou-se em consideração que são células disponíveis em grande quantidade no humano e de fácil obtenção, que em uma condição real de trauma agudo, poderíamos obter grande quantidade de células-tronco mesenquimais derivadas da gordura autóloga e sem necessidade de cultura.

Outro fator relacionado à cultura de células-tronco é a maior chance de teratogenicidade pela manipulação e pelas diversas passagens das células (Shimizu et al., 2007). Infelizmente a dissociação mecânica, tentada durante o projeto piloto, mostrou-se ineficaz em fornecer um número de células-tronco satisfatório. A collagenase foi usada na dissociação do tecido e assim pode-se conseguir uma média maior de células-tronco. Infelizmente o uso da collagenase no processo de dissociação das células também aumenta a chance de teratogenicidade.

É importante lembrar que nos Estados Unidos da América as células-tronco removidas de tecido adiposo de humano (para uso autólogo) foram consideradas “droga” e, portanto, deverão estar sob as normas regulatórias da “Food and Drug Administration” devido ao uso da collagenase na manipulação dessas células-tronco (Salibian et al., 2013). Concluímos assim que a possibilidade de não usar a collagenase certamente diminuiria o risco de teratogenicidade futura.

Em estudos posteriores, com o aprimoramento da dissociação mecânica das células do tecido adiposo, talvez seja possível o uso de células-tronco em maior número.

Usou-se os 3 critérios para a confirmação de características de células-tronco mesenquimais das células implantadas, em conformidade com a recomendação mínima encontrada na literatura pelo “Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee of the International Society for Cellular Therapy” (Gratama et al., 1998; Cova et al., 2006):

1. Capacidade dessas células de aderência ao plástico.
2. Imunofenotipagem por citometria de fluxo.
3. Diferenciação em tri-linhagem.

Embora as células-tronco tenham sido usadas no experimento sem serem cultivadas, uma amostra aleatória das células-tronco foi cultivada e a cultura permitiu a diferenciação em três linhagens diferentes (condrogênica, adipogênica e osteogênica). O fato de crescerem em cultura permitiu confirmar a capacidade dessas células de aderência ao plástico, pois foram cultivadas e aderiram aos recipientes plásticos próprios para o fim de se fazer a cultura dessas células.

A figura 21 e o quadro 5 registram os marcadores conforme o nível de expressão para o painel de marcadores utilizados, para confirmar o perfil fenotípico das células-tronco aplicadas no experimento. Das amostras controle, 100% delas se apresentaram com o padrão de negatividade esperado, ou seja, menos de 5% de fluorescência correspondendo ao que se denomina background de fluorescência e de autofluorescência das células.

Dos marcadores considerados como negativos, ou seja, não devem estar expresso nas células-tronco, o CD11b apresentou positividade alta em 6% das amostras, média em 78% e baixa reatividade em 15% das células analisadas. O marcador CD31 apresentou-se principalmente com média e baixa intensidade de positividade. No gráfico 5 pode-se observar que entre os marcadores utilizados como controle negativo, o CD11b e o CD31 apresentaram uma positividade ao redor de 25%, o que se deve ao fato de que as amostras não sofreram “purging” pelo método de cultura celular. Trata-se, portanto, da presença de leucócitos na amostra utilizada.

O CD44 e o CD45 apresentaram positividade alta ou média na maioria dos casos. O CD45 teve uma positividade maior pelo fato de ser um anticorpo panleucocitário. As células apresentaram alta fluorescência na presença do

marcador CD44, provavelmente devido à grande quantidade de polimorfonucleares como linfócitos e macrófagos.

Efetivamente o marcador CD34 foi o controle negativo mais eficaz para este tipo de análise e amostra. Este marcador foi negativo para 93% das análises e fracamente positivo em 6,06% das amostras analisadas. Isto pode ser justificado pelo fato de que ao se dissociar o tecido gorduroso, são removidas células CD34+ oriundas de pequenos vasos sanguíneos. O CD40 também foi um marcador negativo com resultados dentro do esperado.

O CD71 teve desempenho baixo, em que a maioria das amostras teve uma fraca reatividade ou foram negativas. O CD73 teve um pouco mais da metade das amostras analisadas com média reatividade e 42% com fraca reatividade, no entanto, nenhuma amostra se mostrou francamente negativa.

Dos marcadores positivos, o CD90 teve o desempenho esperado, confirmando que em média, 52,87% das células utilizadas no experimento tiveram o perfil fenotípico de célula-tronco mesenquimal.

O CD90 foi o marcador positivo com resultados mais homogêneos nas amostras, com predomínio de alta e média intensidade. Nenhuma amostra avaliada com o marcador CD90 teve baixa reatividade, bem como nenhuma amostra foi negativa.

Os dados do CD90, CD105 e CD106 confirmaram a identidade das células e comprovaram a excelência do método de extração das células-tronco do tecido adiposo. Na experiência do laboratório de hematologia da UNESP, onde se realizou a citometria de fluxo, mostra-se que antes de plaquear as células, a média de CD90 fica em torno de 25-30%. Sabendo que nesse experimento não se iria utilizar as células-tronco em cultura, o método de dissociação foi mais cuidadoso e meticuloso. Os resultados comprovam isso, pois conseguiu-se uma média de células de 1×10^5 células-tronco por amostra de gordura por animal, esse número é compatível com o número de células-tronco usadas em outros experimentos semelhantes como já demonstrado anteriormente.

A análise de citometria de fluxo deve levar em consideração que a amostra de CTMs não sofreu nenhum método de purificação, pois não foi submetida à cultura. Esta decisão foi baseada na possibilidade de se usar o "pool" de células linfomononucleares rapidamente processadas em condições de urgência ou

emergência. Portanto foram identificados marcadores com índice maior de positividade, o que comprova a condição pluricelular da amostra utilizada.

Assim, alguns marcadores que deveriam ser negativos mostraram positividade maior que a esperada (CD44, CD45, CD31 e CD11b), esses resultados mostram a presença de outras células que possuem perfil diverso do perfil normalmente encontrado para as células-tronco mesenquimais. A característica dessas células (polimorfonucleares, como linfócitos e macrófagos além de leucócitos) não trouxe benefício ao local de implante pois são células que modulam o crosstalking com as CTM negativamente. No entanto, é o resultado esperado para uma amostra que não sofreu o “purging” da cultura e suas passagens, o que certamente traria uma amostra de células-tronco mais pura como descrito na literatura.

Em resumo, os marcadores negativos CD11b, CD31, CD34 e CD40 apresentaram resultados esperados. Os marcadores positivos CD90, CD105 e CD106 também apresentaram os resultados esperados. Esses dados estão condizentes com os critérios mínimos requeridos pela literatura (Gratama et al., 1998; Covas, 2006 e Yarak & Okamoto, 2010).

Cartarozzi et al. (2015) em estudo experimental sobre a influência de células-tronco mesenquimais da medula em regeneração nervosa periférica, realizaram a caracterização dessas células pelos anticorpos CD90, CD54, CD73, RT1A(MHCI), CD45, CD11b/c, CD34 e I-Ad/I-Ed(MHCII). Aproximadamente 99,8% das células-tronco cultivadas expressou CD90, 89% expressou CD54, 88,6% expressou CD73 e 90,8 % expressou RT1A(MHCI), enquanto que 1,07 % de células-tronco mesenquimais cultivadas expressou CD45, 4,19 % expressou CD11b /c, 1,88 %, expressou CD34 e 2,23 % expressou IAd /I- Ed (MHCII) .

Não há na literatura uma determinação exata de quantos marcadores devam ser usados na caracterização das células-tronco e nem está estabelecido exatamente quais. Assim foram usados os mais citados e na maior quantidade possível.

Usou-se o gel de plaquetas como veículo para as células-tronco. Para se excluir essa variável foi acrescentado um grupo apenas com o gel de plaquetas (feito a partir do plasma rico em plaquetas). Esse veículo foi escolhido por tratar-se de veículo proveniente da mesma espécie, possível de ser constituído no laboratório

de Hematologia, que por sua vez possui experiência no uso desse produto e por ser de fácil obtenção. As amostras de plasma rico em plaquetas foram congeladas com o intuito de promover a ruptura da membrana plaquetária e aumentar a concentração de fatores de crescimento.

Em estudos sobre reinervação nervosa periférica que usaram o plasma rico em plaquetas, independente do espaço deixado entre os cotos dos nervos, os resultados mostraram-se promissores (Roque, 2008; Roque, 2007).

Rosa Júnior (2013) realizou estudo experimental em ratos sobre o reparo de nervo periférico utilizando a veia jugular como tubo entre os cotos nervosos preenchido por células-tronco cultivadas extraídas do tecido adiposo. Usou amostras de plasma rico em plaquetas após congelá-las com o intuito de promover a ruptura da membrana plaquetária e aumentar a concentração de fatores de crescimento, como foi feito nesse estudo. Segundo o autor a utilização do plasma rico em plaquetas associado às células-tronco se tornou viável, pois em testes realizados no laboratório foi possível observar que as células-tronco se mantiveram vivas nesse meio, ou seja, os autores constataram que o plasma rico em plaquetas foi um meio seguro para manter as células-tronco vivas até serem implantadas. Dentre as observações relatam que a utilização das células-tronco foi o fator que influenciou diretamente na melhora funcional. O grupo que usou o plasma rico em plaquetas associado às células-tronco mostrou resultado superior àquele que usou apenas o plasma rico em plaquetas.

Estudo semelhante foi feito por Braga-Silva et al. (2006) que atribuiu melhores resultados ao grupo com células-tronco. O grupo no qual as células-tronco foram implantadas sem o gel de plaquetas apresentaram melhores scores que o grupo no qual as células-tronco foram associadas ao gel de plaquetas quanto ao teste da marcha, promovendo regeneração mais rápida e mais abundante, com a formação de maior número de fibras mielinizadas, permitindo assim melhor recuperação funcional quando comparado aos demais grupos estudados. Os autores sugerem que o plasma rico em plaquetas possa ter inibido o desenvolvimento das células-tronco, mas não discutem as razões.

Os fatores de crescimento da cola de fibrina foram estudados por Nunes et al. (2012) em reparo nervoso periférico em ratos, usando a neurorrafia látero-terminal. Concluíram que o reparo nervoso término-lateral mostrou o mesmo padrão de recuperação, independentemente do tipo de reparo utilizado, evidenciando que a

adição de fatores de crescimento nervoso existentes na cola de fibrina não foi suficiente para a potencialização dos resultados.

A cola de fibrina é diferente do plasma rico em plaquetas pela concentração de alguns componentes: no plasma pré produção da cola de fibrina há 75g/dl de fibrinogênio, 294µg/mL de fibronectina, 500pg/mL de PDGF, <100pg/mL de VEGF; no lisado plaquetário pré formação do gel de plaquetas há 12 – 18g/dL de fibrinogênio, 42µg/mL de fibronectina, 60.000pg/mL de PDGF e 425pg/mL de VEGF (esses dados foram colhidos no laboratório de Hematologia da UNESP, local onde o gel de plaquetas desse estudo foi produzido).

No presente estudo o gel de plaquetas foi usado como meio onde as células-tronco foram transferidas e mantidas no local da neurorrafia. Em estudo posterior um grupo sem o gel de plaquetas talvez deva ser incluído, no entanto a dificuldade é como manipular essas células-tronco e implantá-las no local sem um meio onde se possa transferi-las. Os grupos que usaram o gel de plaquetas sem células-tronco (grupos 5 e 6) não mostraram resultados melhores que o grupo 7 (onde se usou células-tronco) ou semelhantes ao grupo 1 (controle da normalidade).

Discutindo separadamente os testes realizados

4.4 Massa inicial e final dos animais

As médias das massas dos animais no início e no final do experimento mostraram homogeneidade na amostra durante o experimento. Diferenças nos procedimentos cirúrgicos em cada grupo não influenciaram no desenvolvimento dos animais. Os mesmos resultados, quanto à massa inicial e final dos animais, foram observados em outros estudos sobre neurorrafia látero-terminal (Viterbo, 1992; Maciel et al., 2013; Romão 2011; Rosa-Júnior 2013).

4.5 Massa dos músculos tibial cranial direito e esquerdo

Quanto à massa dos músculos tibiais craniais, do lado direito (lado onde se realizou o experimento em cada grupo), os grupos experimentais de 3 a 7

mostraram resultados estatisticamente semelhantes entre si. Os grupos de 3 a 7 mostraram resultados estatisticamente superiores ao grupo 2 (desnervado), ou seja, houve reinervação que permitiu recuperação da massa muscular em todos os grupos experimentais embora nenhum deles tenha se assemelhado ao grupo 1 (controle de normalidade).

O peso do músculo-alvo foi usado por muitos autores na comparação de grupos experimentais no estudo da neurografia látero-terminal (Viterbo et al., 1992; Viterbo et al. 1998; Zhang et al., 1998; Kalliainen, 1999; Liu et al., 1999; Papalia et al., 2007).

Para Viterbo (1992), a massa do músculo tibial cranial correlaciona-se diretamente à massa do animal. Como não houve diferenças entre os grupos quanto à massa dos animais, essa diferença de massa dos músculos tibiais craniais com o grupo controle não se deve a diferenças no desenvolvimento dos animais e sim a interferências relativas às variáveis de tratamento em cada grupo experimental.

Para neurografias látero-terminais esse resultado é esperado, pois se sabe que na maioria dos estudos a neurografia látero-terminal não atinge os resultados da normalidade ou da neurografia término-terminal quanto à massa do músculo-alvo da reinervação, conforme alguns estudos exemplificados abaixo.

Tham e Morrison (1998), em estudo de neurografia látero-terminal, usaram o nervo tibial como doador para o nervo fibular comum, tendo os músculos gastrocnêmios como músculos-alvo. Os autores encontraram perda de massa dos músculos-alvo estatisticamente significativa quando comparado ao grupo controle; resultado semelhante ao encontrado nesse estudo. Mesmo sem o uso de artifício que promovesse a melhora na regeneração nervosa periférica no grupo submetido à neurografia, na conclusão, os autores ressaltaram que houve bons resultados quanto aos testes funcionais, resultado semelhante ao encontrado no presente estudo que usou células-tronco derivadas da gordura na neurografia látero-terminal no intuito de promover melhor regeneração periférica.

Yu et al. (2010) usaram o nervo musculocutâneo como receptor e o nervo ulnar como doador tendo o músculo bíceps braquial como alvo. Viterbo et al. (2012) usaram o nervo fibular como receptor e o nervo tibial como doador. Seja qual for a variação, na neurografia látero-terminal a massa do músculo-alvo sempre foi estatisticamente inferior à massa do músculo-alvo observada no grupo controle.

Papalia et al. (2007) em estudo sobre neurografia látero-terminal, mostraram que a massa do músculo-alvo foi menor que a do grupo controle e maior que a massa do músculo-alvo do grupo desnervado. Todos os resultados acima são semelhantes ao encontrado nesse estudo. Conclui-se que as células-tronco não proporcionaram melhor reinervação a ponto de promover recuperação da massa muscular do músculo-alvo se comparado a outros estudos sobre a neurografia látero-terminal

Fratini et al. (2012) realizaram estudo experimental em que o nervo ciático de ratos foi seccionado e os cotos foram aproximados por um tubo preenchido com células-tronco mesenquimais da medula óssea. Os autores constataram que o músculo gastrocnêmio mostrou aumento no peso e nos níveis de enzima creatina-fosfoquinase comparado ao controle que não usou células-tronco, sugerindo uma melhora da reinervação em animais que receberam células-tronco mesenquimais da medula óssea.

Maciel et al. (2013) observaram que a massa do músculo tibial cranial, em grupo submetido à neurografia látero-terminal e eletroestimulação, foi semelhante estatisticamente ao grupo controle, embora não fosse diferente estatisticamente do grupo submetido à neurografia látero-terminal sem eletroestimulação. Talvez a eletroestimulação e outras formas de preservação da massa muscular sejam mais eficientes na preservação da massa muscular que o emprego das células-tronco da maneira aqui empregada.

Quanto ao lado esquerdo, não houve diferença estatística entre os grupos, sendo o lado controle de cada animal. Este resultado era esperado e demonstra a homogeneidade da amostra. Esse resultado também demonstra que o procedimento realizado no lado direito não causou alterações sistêmicas no animal a ponto de comprometer o lado esquerdo. O resultado mostra que o procedimento não causou alterações na marcha que pudessem comprometer o músculo do lado esquerdo, pois os resultados são semelhantes aos resultados do lado esquerdo do grupo normal.

4.3 Perimetria dos membros posteriores direito e esquerdo

A perimetria trata-se de um método de baixo custo e facilmente executado para o acompanhamento e comparação dos grupos, fornecendo informações indiretas sobre o trofismo do músculo acometido pela desnervação e reinervação. Foi usado em estudo prévio (Maciel 2011) sobre efeito da estimulação elétrica no músculo tibial cranial após neurorrafia término-lateral do nervo fibular em ratos; os autores não constataram diferenças entre os grupos e classificaram o método como pouco sensível.

No presente estudo, a avaliação na perimetria foi aperfeiçoada, mantendo os animais sempre na mesma posição através do molde em papel que permitiu posicionar os animais sempre na mesma posição e com a mesma tração através de elásticos que ajudaram a posicionar as patas, com os animais acordados ou anestesiados. A perimetria dos membros posteriores foi realizada apenas ao final do experimento e de duas formas: com os animais acordados e, na sequência, imediatamente depois de serem anestesiados.

Com os animais anestesiados esperava-se mais sensibilidade do método pois quanto acordados os animais reagem com contração muscular dificultando a medição da perimetria do membro.

Analisando a perimetria do lado direito, quando os animais estavam acordados, observou-se diferença entre os grupos experimentais e o grupo desnervado, apenas. Não se observou diferença entre os grupos experimentais e o grupo controle, podendo-se pensar que a neurorrafia permitisse a reinervação e manutenção do trofismo muscular em todos os grupos experimentais de 3 a 7. Não foi possível detectar diferença entre esses grupos (3 a 7) e nem entre esses grupos e o grupo controle da normalidade.

No entanto, foi visto na avaliação das massas musculares que em nenhum dos grupos de 3 a 7 a massa do músculo tibial cranial direito se assemelhou à massa do grupo controle de normalidade (grupo 1). Portanto o teste da perimetria foi pouco sensível conforme constatado por Maciel (2011) e foi menos sensível que a comparação das massas dos músculos para esse estudo.

Analisando a perimetria do lado esquerdo, não foi observada diferença estatística entre os grupos, resultado já esperado, posto que este lado não foi operado, mostrando ainda que não houve aumento de diâmetro muscular do lado

esquerdo, por possível tentativa de compensação devido ao trauma imposto ao membro direito. O resultado foi compatível com as medidas de massa dos músculos tibiais craniais para o lado esquerdo.

A imobilização, para a medição da perimetria com o animal acordado, sempre causou estresse nos animais e não se mostrou um método sensível, confirmando a observação de Maciel (2011).

Com os animais anestesiados, analisando a perimetria do lado direito, os grupos 4, 5 e 7 mostraram resultados semelhantes estatisticamente ao resultado do grupo 1 e estatisticamente superiores ao do grupo 2 (desnervado). Os grupos 3, 6 e 2 não diferiram entre si. Os resultados dos grupos 3, 5, 6 e 7 foram estatisticamente semelhantes entre si. As diferenças foram sutis e os melhores resultados para esse teste estão nos grupos 4, 5 e 7, pois são comparáveis aos resultados do grupo controle.

Quanto ao lado esquerdo, os resultados dos grupos 2, 3, 5, 6 e 7 se mostraram estatisticamente semelhantes ao resultado do grupo 1. O grupo 4 mostrou resultado estatisticamente superior ao encontrado no grupo 1 e semelhante ao resultado do grupo 5. Esse resultado foi inesperado.

O aprimoramento do método é necessário para que esse seja um método de uso mais confiável. Embora a perimetria tenha sido feita apenas ao final desse experimento, o seguimento clínico dos animais com perimetrias a cada 30 dias pode se mostrar um método importante no seguimento dos animais e não apenas para a comparação final.

É importante lembrar que o estresse da anestesia tenha sido fator de morte de alguns animais em experimento semelhante que usou a perimetria a cada 30 dias (Maciel, 2011). No presente estudo apenas um animal morreu na perimetria. Se controlado o fator estresse por uma anestesia mais cuidadosa a perimetria com o animal anestesiado poderá ser um método simples de seguimento da recuperação da massa muscular nesse modelo experimental.

4.4 Estudo eletrofisiológico do músculo tibial cranial direito

O teste eletrofisiológico fornece dados de latência e amplitude. A latência está relacionada à condução nervosa, ou seja, o número de fibras mielinizadas. Já a amplitude nos informa o número de fibras musculares que respondem ao estímulo elétrico e, conseqüentemente, ao número de axônios excitáveis (Robinson & Snyder-Mackler, 2001). O teste foi realizado em três variações ou momentos diferentes:

- a. Com o nervo tibial, nervo sural e neurorrafia mantidos íntegros.
- b. Com o nervo tibial seccionado abaixo da neurorrafia, nervo sural e neurorrafia mantidos íntegros.
- c. Com o nervo sural também seccionado. Com o nervo tibial seccionado abaixo da neurorrafia como na opção da letra b e a neurorrafia mantida íntegra como nas opções a e b.

A secção do nervo tibial e posteriormente do nervo sural foram feitas para que não ocorresse “possível” transmissão de corrente nervosa pelos nervos sural e tibial e as medições de latência e amplitude pudessem ser aferidas tendo-se a certeza de que a corrente passou apenas pela neurorrafia.

A frequência, duração e intensidade do estímulo foram constantes para que a única variável fosse relativa ao grupo experimental.

Segundo Marciano e Garbino (1994) os testes de condução nervosa são objetivos, independem do paciente ou do animal. Entretanto alguns fatores podem interferir no resultado do teste, como a temperatura das extremidades que em situações de esfriamento reduzem as velocidades de condução nervosa, principalmente nos dedos. A variação de velocidade trará conseqüentemente variações da amplitude e latência.

A preocupação com a temperatura e umidade também foi ressaltada por Yu et al (2010), em estudo experimental sobre neurorrafia látero-terminal em nervos periféricos. Os autores se preocuparam em manter os animais aquecidos com manta térmica e manter nervos e músculos umedecidos com soro fisiológico a 0,9% durante os testes eletrofisiológicos. Os animais no presente estudo foram operados mantendo-se os nervos e músculos umedecidos com soro fisiológico a 0,9%, em

temperatura ambiente, em período do ano de temperatura quente, e sempre cobertos por tecido de algodão como campos cirúrgicos ou compressas.

Levando em consideração essa variação que foi constatada em outros estudos de nosso grupo (Maciel 2011; Romão 2011), optou-se por escolher, dentre as seis medidas realizadas em cada variação do teste eletrofisiológico, sempre a medida em que a amplitude fosse a maior e não a média das medidas. Pois há sempre uma grande variação, dependendo do posicionamento exato dos eletrodos ou das variações de temperatura do animal anestesiado, que está com músculos e nervos dissecados e expostos às variações de umidade e temperatura.

No teste eletrofisiológico com todos os nervos e neurorrafia mantidos, quanto à latência, não houve diferença estatística entre os grupos experimentais de 3 a 7 e nem entre esses grupos e o grupo controle (grupo 1), todos mostraram resultados superiores ao grupo desnervado (grupo 2). Quanto à amplitude, todos os grupos mostraram-se com resultados superiores ao obtido pelo grupo 2, não houve diferença estatística entre os grupos experimentais de 3 a 7 e apenas os grupos 3, 4 e 5 se assemelharam estatisticamente ao grupo 1. Esta avaliação mostrou que houve sensibilidade suficiente para diferenciar os grupos experimentais de 3 a 7 do grupo desnervado, mas não o suficiente para diferenciá-los entre si.

Com a secção do nervo tibial procurou-se excluir possível passagem de estímulo elétrico por esta via. Quanto à latência, todos os grupos mostraram resultados estatisticamente superiores ao do grupo desnervado (grupo 2). Os grupos 4, 5 e 7 mostraram resultados estatisticamente iguais ao do grupo controle (grupo 1). Quanto à amplitude, os grupos experimentais de 3 a 7 mostraram resultados estatisticamente iguais entre si, inferiores ao do grupo 1 e superiores ao do grupo 2. Novamente foi possível diferenciar os grupos experimentais de 3 a 7 do grupo desnervado e do grupo controle quanto à amplitude. Foi possível observar diferenças entre os grupos experimentais quanto à latência: os grupos 4, 5 e 7 apresentaram resultados semelhantes ao resultado do grupo controle.

Com a secção do nervo sural foi excluída outra possível via de passagem do estímulo. Quanto à latência, todos os grupos mostraram resultados

estatisticamente melhores que o resultado do grupo desnervado (grupo 2). Os grupos 4 e 7 mostraram resultados estatisticamente semelhantes ao resultado do grupo controle (grupo 1). Quanto à amplitude, todos mostraram resultados estatisticamente melhores que o resultado do grupo 2. Dos grupos experimentais de 3 a 7, apenas o grupo 7 mostrou resultado inferior ao resultado do grupo 1, resultado inesperado. Os resultados mostram pouca sensibilidade na diferenciação dos grupos, apenas o grupo desnervado se diferencia dos outros grupos. O fato do grupo 7 mostrar resultado inferior ao observado no grupo 1 é fato isolado que não se repete nos demais exames de amplitude.

De forma geral, o teste eletrofisiológico conseguiu diferenciar os grupos experimentais de 3 a 7 do grupo desnervado, mostrando que houve reinervação muscular.

No grupo 2 (desnervado) foi possível detectar latência e amplitude com o estímulo no nervo ciático. Uma possível explicação para essa captação de estímulo elétrico em um músculo teoricamente desnervado é a possível neurotização músculo-muscular, onde pode ser possível que um músculo seja reinervado através de nervos vindos de um outro músculo junto a esse músculo desnervado, pois na análise do nervo fibular comum junto ao músculo desnervado não foi possível observar nenhuma fibra nervosa em nenhum animal do grupo 2.

Os testes eletrofisiológicos são usados algumas vezes apenas para mostrar que houve reinervação e não para comparar os grupos entre si (Papalia et al. 2007).

Os grupos 1, 3, 4 e 5 mostraram os melhores resultados quanto à amplitude com todos os nervos e neurografia mantidos. Os grupos 1, 4, 5 e 7 mostraram os melhores resultados quanto à latência, com a secção do nervo tibial. Os grupos 1, 4 e 7 mostraram os melhores resultados quanto à latência com os nervos sural e tibial seccionados, mas não nos permitiu concluir pela superioridade de resultados de um dos grupos experimentais. Observou-se que apenas o grupo 4 esteve presente entre os grupos de melhores resultados nas três formas de realização do teste eletrofisiológico. Concluiu-se que esse teste foi pouco sensível para esse experimento.

Como houve diferenças entre os testes com os nervos sural e tibial seccionados, recomendamos que esses nervos sejam seccionados em estudos semelhantes para a comparação dos grupos.

Viterbo et al. (1998) compararam a neurorrafia látero-terminal com e sem lesão de epineuro e usaram teste eletrofisiológico que não foi capaz de diferenciar os dois grupos, apesar de outros parâmetros também não diferenciarem os grupos.

Yu et al. (2010) em estudo de reinervação nervosa periférica através da neurorrafia látero-terminal usaram os testes eletrofisiológicos com resultados semelhantes aos aqui relatados, ou seja, o grupo experimental no qual se fez a neurorrafia látero-terminal com resultado de latência estatisticamente maior e de amplitude estatisticamente menor quando comparados ao resultado do grupo controle.

Maciel et al. (2013) não conseguiu diferenciar os grupos experimentais do grupo controle através do teste eletrofisiológico realizado nos mesmos moldes desse estudo. Rosa (2013) em estudo sobre o uso de células-tronco derivadas da gordura não conseguiu diferenciar os grupos experimentais quanto à latência e amplitude, apenas constatou que o grupo que usou células-tronco se assemelhou ao grupo controle quanto à latência. Como nos estudos apresentados o teste eletrofisiológico também mostrou baixa sensibilidade para esse estudo.

4.5 Avaliação da marcha pelo teste de “Walking Track”

Para Nichols et al., (2005) os testes funcionais são o melhor e o mais inequívoco método para a demonstração de que um nervo não apenas regenerou mas que fez corretamente a conexão com o órgão-alvo. Os resultados desse estudo comprovam essa opinião.

No Brasil, Gasparini et al. (2007) propuseram o cálculo do índice funcional do ciático através da análise de imagens de vídeo que foram feitas quando o animal (rato) andou por uma passarela. Os pixels foram transformados em milímetros e as fórmulas propostas por Bain e De Medinaceli foram aplicadas. Os autores encontraram correlação entre os dados obtidos manualmente e através das imagens quando a mesma fórmula foi aplicada. Trata-se de uma forma semiautomática de se obter esses índices funcionais. Forma menos trabalhosa de avaliar os mesmos índices.

Há várias maneiras de se avaliar os índices funcionais dos nervos periféricos, desde a forma manual clássica através do “Walking Track”, passando por diversas formas semiautomáticas como a proposta por Gasparini et al. (2007) ou através do “CatWalking” usado nos estudos sobre a regeneração nervos periférica (Borzuk et al., 2008; Cartarozzi et al., 2015). No presente estudo os mesmos índices foram avaliados através do “Walking Track” e do “CatWalk”.

O teste da marcha analisa o modo de andar do animal através do cálculo da expressão, como porcentagem, de perda da função do membro tratado em relação ao contralateral. O teste de marcha foi desenvolvido por De Medinaceli et al. (1982) através do índice funcional do isquiático (IFI) ou índice funcional do ciático (IFC) que avalia a função relacionada ao nervo isquiático; foi aperfeiçoado por Bain et al. (1989), que desenvolveu métodos específicos para o nervo tibial (índice funcional do tibial ou IFT) e para o nervo fibular (índice funcional do fibular ou IFF).

Segundo De Medinaceli et al. (1982), quando o IFC tem porcentagem perto de zero (aceitando-se até o valor de -11%) indica valor normal; e porcentagem perto de -100% (aceitando-se até -118%) indica perda total da função e desnervação.

Como o modelo experimental eleito para essa pesquisa envolve especificamente o nervo fibular, foram usados os índices idealizados por Bain et al.

(1989). Além das medidas do índice funcional do fibular realizaram-se as medidas do índice funcional do nervo tibial - por ser o nervo doador - e do nervo ciático - por ser o nervo que dá origem aos nervos tibial e fibular comum.

Bain et al. (1989) descreveram a dificuldade de medir as distâncias entre o primeiro ao quinto dedo e entre o segundo ao quarto dedo, medidas necessárias para o cálculo dos índices dos nervos tibial e ciático (IFT e IFC). Os autores descreveram uma segunda forma de realizar esta medida: a medida manual, que é realizada segurando-se o animal pela pele de trás do pescoço e o mantendo em pé, os dedos do animal imprimem uma marca em uma folha de acetato e a medida entre os dedos pode ser aferida. Os autores sugerem que esta medida seria semelhante àquela obtida pelo teste da marcha.

De Medinaceli et al. (1982) usaram a medida de 80mm (para a medida do comprimento da pegada deixada pela pata) e 6mm (para as distâncias entre o primeiro e quinto dedo e para a distância entre o segundo e quarto dedo) para quando não fosse possível realizar a medida do comprimento da pata e a distância entre os dedos. Nesse estudo foi possível realizar a medida do comprimento da pegada da pata em todos os animais, no entanto a medida entre os dedos não foi possível em alguns casos, usando-se a medida arbitrária de 6mm para a largura da pata (entre os dedos) por concluir que esta medida usada sempre que não fosse possível realizar a medida real, em todos os casos e em todos os grupos, seria mais adequada do que tentar realizar a medida com o animal mantido em pé, pois esta última forma de medição da pegada da pata estaria sob a possível influência do pesquisador que estaria manipulando o animal.

Avaliação do IFC

Com 30 dias, nenhum dos grupos experimentais mostrou resultados comparáveis estatisticamente ao resultado do grupo 1 (controle, com o melhor resultado). O grupo 2 apresentou resultado estatisticamente semelhante aos resultados dos grupos 4, 5 e 6, os piores resultados. Os resultados dos grupos 2, 3, 4, 5 e 7 não diferiram entre si. Com 60 dias, os resultados dos grupos experimentais de 2 a 7 não diferiram entre si e todos diferiram do resultado do grupo 1 (controle). O mesmo resultado se manteve com 90 dias. Aos 120 dias, os resultados dos grupos

experimentais de 3 a 7 não diferiram entre si, mas já diferiram do resultado do grupo 2, mantendo a diferença estatística do resultado do grupo 1.

Aos 120 dias as avaliações do grupo 4 foram perdidas e portanto não avaliadas.

O mesmo resultado se manteve com 150 dias. Na última avaliação, os resultados de todos os grupos mantiveram-se inferiores ao do grupo 1 (o melhor resultado). Os resultados dos grupos 3, 4 e 5 não diferiram do resultado do grupo desnervado (o pior resultado). Os resultados dos grupos 3, 5, 6 e 7 não diferiram entre si.

Ao final de 180 dias houve recuperação do IFC, sobretudo nos grupos 6 e 7, os únicos grupos com resultados melhores que o observado no grupo desnervado (grupo 2). O nervo ciático não foi lesado, mas os nervos tibial e fibular envolvidos no experimento são ramos do nervo ciático e foi possível avaliar a evolução dos grupos submetidos à neurorrafia também através desse teste, com melhor recuperação dos grupos 6 e 7.

Avaliação do IFT

Com 30 dias, os resultados de todos os grupos de 2 a 7 diferiram estatisticamente do resultado do grupo controle. O grupo 6 (-102,43) apresentou resultado estatisticamente comparável aos resultados dos grupos 2 (desnervado), 4 e 5, os piores resultados. Os resultados dos grupos 2, 3, 4, 5 e 7 não diferiram estatisticamente entre si.

Com 60 dias os resultados de todos os grupos de 2 a 7 diferiram estatisticamente do resultado do grupo 1 (controle, com o melhor resultado) e não diferiram entre si.

Com 90 dias os resultados de todos os grupos diferiram do resultado do grupo 1, os resultados dos grupos de 3 a 7 não diferiram entre si, e apenas os resultados dos grupos 3 e 4 não diferiram estatisticamente do resultado do grupo 2. Com 120 dias o resultado de todos os grupos experimentais avaliados diferiram do resultado do grupo 1 e também do resultado do grupo 2, e não diferiram entre si. Com 150 dias os resultados dos grupos experimentais de 3 a 7 não diferiram entre si, todos os resultados diferiram do resultado do grupo 1 e apenas o resultado do grupo 4 não diferiu estatisticamente do resultado do grupo 2. Com 180 dias, todos os grupos

mantiveram a diferença estatística do grupo controle (o melhor resultado), os resultados dos grupos 6 e 7 não diferiram entre si e apresentaram os melhores resultados dos grupos experimentais de 3 a 7. Os resultados dos grupos 3 e 4 não diferiram estatisticamente do grupo 2 (piores resultados). Nesse momento os resultados do IFT nos grupos 6 e 7 apresentaram a melhor evolução dentre os demais e os grupos 3 e 4 a pior evolução. O índice avalia a função do nervo tibial, que não foi lesado.

Avaliação do IFF

Na avaliação de 30 dias os resultados dos grupos experimentais de 3 a 7 diferiram estatisticamente do resultado do grupo controle e apenas o resultado do grupo 4 não diferiu estatisticamente do resultado do grupo 2 (piores resultados). Com 60 dias, os resultados dos grupos experimentais de 3 a 7 não diferiram entre si e foram inferiores ao resultado do grupo controle. Os resultados dos grupos 3 e 4 não diferiram do resultado do grupo 2 (piores resultados). Com 90 dias os resultados dos grupos experimentais de 3 a 7 diferiram do resultado do grupo 1 (melhor resultado) e do resultado do grupo 2 (pior resultado), os grupos 3, 5, 6 e 7 não diferiram entre si, o resultado do grupo 4 não diferiu dos resultados dos grupos 3 e 5, mas foi pior que os resultados dos grupos 6 e 7.

Com 120 dias os resultados de todos os grupos diferiram do resultado do grupo 2 (pior resultado), o resultado do grupo 7 não diferiu do resultado do grupo 1 (melhor resultado), e os grupos experimentais de 3 a 7 não diferiram entre si. Com 150 dias, este resultado se manteve. Com 180 dias, os resultados de todos os grupos de 3 a 7 diferiram do resultado do grupo 2 (pior resultado), o resultado do grupo 7 não diferiu do resultado do grupo 1 (melhor resultado), os demais grupos experimentais apresentaram resultados inferiores ao observado no grupo 1. O resultado do grupo 7 não diferiu dos resultados dos grupos 5 e 6 e mostrou resultado superior aos resultados dos grupos 3 e 4,

Assim, na avaliação do IFF, todos os grupos experimentais mostraram recuperação funcional, mas apenas o grupo 7 mostrou resultado comparável estatisticamente ao resultado do grupo 1.

Aos 120 dias as avaliações do grupo 4 foram perdidas e portanto não foram avaliados os índices funcionais dos nervos ciático, fibular comum e tibial para esse grupo nesse período de observação.

Desde que foi descrito, o teste de avaliação da marcha, “Walking Track”, foi usado por diversos autores e teve sua reprodutibilidade e confiabilidade confirmadas, sendo considerado indispensável nas avaliações de reinervação nervosa periférica (Liu et al., 1999; Monte-Raso et al., 2006; Lopes et al. 2006; Braga-Silva 2006; Shimizu et al., 2007; Gasparini et al., 2007; Chem et al., 2007; Papalia et al., 2007; Walsh e Midha, 2009).

Testes funcionais na neurografia látero-terminal são considerados excelentes testes de avaliação por muitos autores por mostrar a capacidade da regeneração nervosa e muscular além da readaptação muscular e a neuroplasticidade cerebral, quando se usam nervos antagonistas na reinervação (Nichols et al., 2005; Papalia et al., 2007).

O nervo tibial inerva o músculo gastrocnêmio que é um músculo flexor, o nervo fibular comum inerva o músculo tibial cranial, um músculo extensor, assim estes nervos transmitem informações antagônicas. A secção do nervo fibular comum causa flexão plantar da pata, podendo o animal andar sobre o dorso do pé. A lesão do nervo tibial causa eversão da pata, podendo o animal andar com o apoio dos dedos mediais e com elevação do quinto dedo (Here et al. 1992).

Here et al. (1992) e Monte-Raso et al. (2006), assim como nesse estudo, relatam dificuldade na medição dos parâmetros usados na avaliação do índice funcional do ciático nas primeiras semanas, pois os animais pisam com o dorso do pé.

Na neurografia látero-terminal um nervo flexor emitiu axônios para um nervo extensor, no entanto percebeu-se que houve, sim, reinervação com tendência a recuperação da função normal do músculo tibial cranial (extensão) como já constatado por outros autores (Viterbo, 1992; Lundborg et al., 1994; Zhao et al., 1997; Cederna et al., 2001; Papalia et al., 2007; Maciel, 2011).

Para Bozkurt et al. (2008), na avaliação da regeneração de axônios é indispensável o uso de testes que detectem a recuperação funcional do animal, como os testes eletrofisiológicos que demonstram sinais precoces de regeneração funcional dos axônios, mas alertam para limitações metodológicas desses testes.

Para esses autores demonstrações da funcionalidade dos axônios em seus órgãos-alvo são de grande interesse clínico e podem ser feitas com testes comportamentais como o clássico “Walking Track” que tem recebido grande atenção em pesquisas de lesão nervosa periférica em modelos com lesão do nervo ciático em ratos. O presente estudo confirma a importância e algumas dificuldades que o teste ainda nos impõe, sobretudo nas primeiras semanas.

Nesse estudo, alguns animais, em todos os grupos, não tiveram as medidas entre os dedos aferidas, sobretudo os animais do grupo desnervado. Desta forma a introdução da medida de 6mm foi importante para que os grupos pudessem ser comparados quanto aos índices dos nervos ciático e tibial.

Na literatura outros estudos comprovaram reinervação através de testes funcionais em períodos de observação semelhantes ao usado do presente estudo: Papalia et al. (2007) realizaram neurografia látero-terminal de nervo mediano ao nervo radial e através de teste funcional observaram recuperação motora de 42% da função normal na trigésima semana; Yu et al. (2010) conseguiram detectar reinervação após neurografia látero-terminal no quinto mês de observação através do “grooming test” que analisa o quanto a pata anterior pode se elevar e flexionar, através de um score;

O presente estudo observou diferenças funcionais no sexto mês, através do IFF.

Lopes et al. (2006) e Frattini et al. (2012) estudaram a influência de células-tronco removidas da medula óssea na regeneração nervosa periférica em ratos, através do uso de um tubo preenchido com células do estroma da medula óssea interpostos em defeitos do nervo ciático. Constataram que a melhora funcional através do índice funcional do ciático foi mais rápida e mais significativa no grupo que recebeu as células-tronco da medula óssea quando comparadas ao grupo que não as recebeu.

Chen et al. (2006) através de testes funcionais, conseguiram melhores resultados em grupo experimental em que se usou células-tronco derivadas da medula óssea para defeito de nervo periférico na quarta e quinta semanas de observação.

Hundepool et al. (2014) em estudo de meta-análise sobre o uso de células-tronco em regeneração nervosa periférica concluiu que o efeito positivo das células-tronco na regeneração nervosa periférica demonstrado por diversos artigos através

do “Walking Track” é uma forte evidência que confirma o papel positivo das células tronco na regeneração nervosa periférica.

Nesse presente estudo, o teste de “Walking Track” conseguiu detectar diferenças entre os grupos experimentais de 3 a 7 e, sobretudo demonstrou a progressão na recuperação funcional em todos esses grupos em tempo de observação de 6 meses.

4.6 Avaliação da marcha pelo teste de “CatWalk”

O “CatWalk” é um sistema de análise automatizado da marcha. Trata-se de uma passarela de vidro iluminada, por onde o animal anda, acoplada a uma câmera que filma as pegadas impressas no vidro e um sistema que analisa as pegadas quanto a diversos parâmetros e permite a comparação entre os grupos de estudo. O controle da velocidade estabelece o tempo no qual os animais devem cumprir o percurso e a aquisição de dados é automatizada. Quando o animal anda mais rápido que o estabelecido para a caminhada ou para durante a caminhada, esses dados não são considerados na comparação. Portanto apenas caminhadas dentro do padrão estabelecido são consideradas.

Os índices funcionais dos nervos ciático, tibial e fibular foram avaliados também por este sistema aos 180 dias de observação, e apenas neste momento, pois o acesso ao equipamento se deu apenas no final da observação dos animais.

Quanto ao índice funcional do ciático

Quando o cálculo do IFC foi feito apenas com os dados fornecidos pelo “CatWalk”, poucos animais foram avaliados em cada grupo, pois a medida intermediária entre os dedos foi possível de ser aferida em poucos animais. Desta forma não se observa diferença estatística entre os resultados dos grupos 1, 4, 5, 6 e 7. Para os grupos 2 e 3 não foi possível aferir a medida da distância entre os dedos intermediários em nenhum dos animais. Quando a medida entre os dedos foi substituída pelo valor 0,6 cm, como no “Walking Track”, o IFC foi calculado em todos os grupos e os resultados mostraram que os grupos de 2 a 7 não apresentaram diferenças entre si e apenas o grupo 7 mostrou resultado estatisticamente semelhante ao grupo 1. Este resultado foi diferente daquele obtido pelo “Walking Track”, no qual nenhum dos

grupos se comparou ao grupo controle. Os resultados dos grupos 3, 5, 6 e 7 não diferiram entre si e apenas os resultados dos grupos 6 e 7 foram superiores ao do grupo 2 (desnervado). O único resultado semelhante obtido pelos dois testes foi que todos os grupos de 2 a 6 diferiram do grupo controle. Talvez o teste do “CatWalk” tenha sido mais sensível em detectar valores estatisticamente semelhantes entre os grupos 1 e 7.

Quanto ao índice funcional do nervo tibial

Quando o cálculo do IFT foi feito apenas com os dados fornecidos pelo “CatWalk”, poucos animais foram avaliados em cada grupo, pois a medida intermediária entre os dedos foi possível de ser aferida apenas em poucos animais. Para os grupos 2 e 3 este cálculo não foi possível pois nenhum animal teve a distância entre os dedos aferida. Os grupos 1, 4, 5, 6 e 7 não diferiram estatisticamente entre si. Mas quando a medida entre os dedos foi substituída por 0,6cm os resultados mostraram que os grupos de 2 a 7 não diferiam entre si e todos diferiam do grupo 1 (melhor resultado). Este mesmo índice avaliado pelo “Walking Track” mostrou que todos os grupos diferiram do grupo 1 (melhor resultado) e que o grupo 7 só não diferiu do 6. Os grupos 3 e 4 não diferiram do grupo 2 (pior resultado) e os demais grupos apresentaram melhores resultados que o grupo 2. O único resultado obtido pelos dois testes foi que todos os grupos (2 a 7) diferiram do grupo controle.

Quanto ao índice funcional do nervo fibular

Quanto ao índice funcional do nervo fibular, os grupos de 3 a 7 não mostraram diferença estatística entre si, os grupos 5, 6 e 7 não mostraram diferença estatística com o grupo 1 (controle) e apenas o grupo 6 e 1 diferiram estatisticamente do grupo 2 (desnervado). Estes resultados controversos são devidos ao grande desvio padrão. Na avaliação do “Walking Track” para o IFF, apenas o grupo 7 mostrou resultados semelhantes estatisticamente ao grupo 1 e todos os grupos experimentais diferiram estatisticamente do grupo 2. Resultado mais esperado e condizente com os resultados dos outros testes. Os resultados dos dois testes permitiram afirmar que o grupo 7 alcançou resultados estatisticamente comparáveis ao grupo 1, salientando que no “CatWalk” os grupos 3, 5, 6 e 7 também alcançaram

resultados estatisticamente semelhantes ao grupo 1 (controle). Na avaliação do IFF, o teste de “CatWalk” pode ter sido mais sensível que o “Walking Track”.

Cartarozzi et al. (2015) investigaram a eficácia de células-tronco mesenquimais removidas da medula óssea na regeneração de nervos periféricos. O resultado funcional através do “CatWalk” mostrou que o grupo que usou células-tronco mostrou melhor recuperação da função motora na sétima e oitava semana após a lesão. Essa diferença não foi mostrada antes, pois os autores ressaltaram que o teste do IFF (calculado pela fórmula de Bain et al. 1989) medido através do “CatWalk” é baseado na pressão exercida pela pata e não apenas pela marca da pegada como no teste da passarela. Cartarozzi et al. (2015) também sugerem que esse teste seja mais sensível que o “Walking Track”.

Segundo Bozkurt et al. (2008), o índice funcional do ciático através do “Walking Track”, proposto há cerca de duas décadas, apresenta algumas limitações:

1. O IFC pode diminuir significativamente através de dificuldades no controle da velocidade de locomoção do animal.
2. A paresia da pata afetada dificulta a identificação das medidas da pegada, necessárias ao cálculo do índice. No presente estudo houve grande dificuldade de aferir estas medidas, sobretudo nas primeiras semanas.
3. O processamento dos dados é muito trabalhoso, sobretudo quando o estudo reúne grande número de animais, opinião compartilhada durante o desenvolver desse estudo.

Quando se comparam os resultados obtidos no “Walking Track” com aqueles obtidos no “CatWalk”, quanto aos índices funcionais, os resultados sugerem que o “CatWalk” possa ser mais sensível.

Outros parâmetros foram avaliados por meio desse sistema. Segundo Bozkurt et al. (2008), os resultados das análises dos diversos parâmetros devem ser expressos como uma relação entre a pata traseira direita (afetada) e a contralateral esquerda (normal) sempre que possível.

Quase todos os resultados abaixo foram expressos como porcentagem em relação ao membro posterior normal (esquerdo), pois essa relação é apresentada como resultado dado pelo programa do “CatWalk”, ou seja, o resultado foi a porcentagem do resultado da pata direita sobre a pata esquerda. Se o resultado foi 50, a pata direita obteve 50% do resultado da pata esquerda.

Parâmetros avaliados

1) Índice de regularidade - Tabela 18: reflete o quanto a marcha é coordenada em relação à ordem das colocações das patas. Expressa o número de sequências normais de passos em relação ao total de passos dados naquela corrida. Quanto ao índice de regularidade, não se observou diferença estatística entre os grupos experimentais de 3 a 7 e nem entre esses grupos e o grupo 1. Os grupos 3 e 4 apresentaram resultados estatisticamente semelhantes ao do grupo 2.

2) Intensidade máxima - Tabela 19: a medida da intensidade das patas reflete a intensidade média de todos os pixels que contribuem para a área de impressão máxima da pata em análise, dando uma média da pressão exercida pela pata durante a marcha. Este parâmetro foi estudado usando-se a relação entre o resultado da pata estudada com a pata normal (%). Os grupos de 3 a 7 não diferiram estatisticamente entre si. Apenas o grupo 6 não diferiu estatisticamente do grupo 1 e apresentou resultado melhor que o observado no grupo 2. Os grupos 1 e 2 diferiram entre si. Apesar de melhores resultados observados no grupo 6, esse não diferiu estatisticamente dos outros grupos experimentais.

3) “Stand” ou fase de apoio - Tabela 20: é a duração de contato da pata com o vidro. Este parâmetro foi calculado usando-se a relação entre o resultado da pata estudada com a pata normal (%). Não houve diferença entre os grupos estudados (3 a 7) e nem entre estes e os grupos 1 e 2. A única diferença detectada foi entre os grupos 1(controle) e 2(desnervado). No grupo desnervado o tempo de contato da pata desnervada com o vidro foi cerca de metade do tempo de apoio da pata normal. O teste foi pouco sensível.

4) “Stand index” ou índice da fase de apoio - Tabela 21: se refere à velocidade em que a pata perde o contato com o vidro. Este parâmetro foi estudado usando-se a relação entre o resultado da pata estudada com a pata normal (%). Não houve diferença entre todos os grupos estudados (de 1 a 7).

Quanto aos resultados acima, ou os testes não foram sensíveis o suficiente, ou esses parâmetros não são alterados pela desnervação do músculo tibial cranial.

5) Parâmetros relacionados a cada pata:

- a) **Área de impressão do contato - Tabela 22:** é o tamanho da impressão da pata. Este parâmetro foi estudado usando-se a relação entre o resultado da pata estudada com a pata normal (%). Não houve diferença entre os grupos de 3 a 7, e não houve diferença entre os grupos de 3 a 7 com os grupos 1 e 2. A única diferença detectada foi entre os grupos 1 (controle, com o melhor resultado) e 2. O teste foi pouco sensível.
- b) **Área do contato máximo - Tabela 23:** reflete o tamanho da impressão da pata no momento em que ela tem contato máximo com a passarela de vidro durante a fase de apoio. Este parâmetro foi estudado usando-se a relação entre o resultado da pata estudada com a pata normal (%). Não houve diferença estatística entre os grupos de 3 a 7, e não houve diferença entre os grupos de 3 a 7 com o grupo 1. Apenas o grupo 6 apresentou resultado melhor que o resultado do grupo 2, e o grupo 1 apresentou resultado melhor que o resultado do grupo 2 (desnervado). O teste foi pouco sensível.
- c) **Intensidade máxima no contato máximo - Tabela 24:** Este parâmetro foi estudado usando-se a relação entre o resultado da pata estudada com a pata normal (%). Não houve diferença estatística entre os grupos de 3 a 7, e não houve diferença entre os grupos de 3 a 7 com o grupo 1, apenas o grupo 6 apresentou resultado melhor que o resultado do grupo 2, e o grupo 1 apresentou resultado melhor que o grupo 2 (desnervado). O teste foi pouco sensível.
- d) **Intensidade média no contato máximo - Tabela 25:** Este parâmetro foi estudado usando-se a relação entre o resultado da pata estudada com a pata normal (%). Não houve diferença estatística entre os grupos de 3 a 7, e não houve diferença entre os grupos de 3 a 7 com o grupo 1, apenas o grupo 6 apresentou resultado melhor que o resultado do grupo 2, e o grupo 1 apresentou resultado melhor que o grupo 2 (desnervado). O teste foi pouco sensível.

6) Parâmetros dinâmicos:

a) **Duração da fase “swing” ou de balanço - Tabela 26:** é o período em que a pata não está em contato com a pista de vidro durante cada ciclo de passos. Este parâmetro foi estudado usando-se a relação entre o resultado da pata estudada com a pata normal (%). Os grupos de 3 a 7 não mostraram diferença estatística entre si e os grupos de 1 a 6 não mostraram diferença entre si. O grupo 7 apresentou o maior valor para esse parâmetro e foi o grupo no qual a pata estudada permaneceu maior tempo no ar, sem contato com a pista de vidro. Trata-se de resultado isolado e sem diferença estatística entre os grupos experimentais.

b) **Velocidade da fase “swing” ou de balanço - Tabela 27:** é a velocidade da pata durante o swing. Este parâmetro foi estudado usando-se a relação entre o resultado da pata estudada com a pata normal (%). Não houve diferença entre os grupos de 3 a 7, e não houve diferença entre os grupos de 3 a 7 com os grupos 1 e 2. A única diferença detectada foi entre os grupos 1 (controle, com o melhor resultado) e 2 (com o pior resultado, grupo desnervado). O teste foi pouco sensível.

c) **Distância das pegadas de uma mesma pata - Tabela 28:** este parâmetro foi estudado usando-se a relação entre o resultado da pata estudada com a pata normal (%). Não houve diferença estatística entre os grupos de 3 a 7 e nem entre os grupos de 2 a 5. Os grupos 6 e 7 apresentaram resultado estatisticamente semelhante ao do grupo 1 e numericamente superior ao do grupo 2 (desnervado). Nos grupos 6 e 7 a pata direita se movimentou com distância entre as pegadas estatisticamente semelhante aos valores da pata normal.

d) **“Step cycle” - Tabela 29:** tempo (em segundos) entre dois contatos de uma mesma pata. Este parâmetro foi estudado usando-se a relação entre o resultado da pata estudada com a pata normal (%). Não houve diferença entre os grupos de 1 a 7.

e) “Duty Cycle” - Tabela 30: expressa a fase de apoio como porcentagem do ciclo de passo. Este parâmetro foi estudado usando-se a relação entre o resultado da pata estudada com a pata normal (%). Não houve diferença entre os grupos de 1 a 7.

f) “Print positions” - Tabela 31: este parâmetro não usou, como o resultado, a relação entre os valores da pata estudada com a pata normal como em parâmetros anteriores. É a distância entre a posição da pata posterior e a posição da pata dianteira previamente colocada do mesmo lado do animal e no mesmo passo. Um valor positivo indica que a pata posterior foi colocada atrás da pata dianteira. Um valor negativo indica que a pata traseira foi colocada anteriormente a pata dianteira (forma errada de andar). Avaliando o lado esquerdo de cada grupo, não houve diferença estatística entre os grupos de 1 a 7, resultado esperado dado que o lado esquerdo de todos os animais em todos os grupos é o lado normal. Comparando o lado direito dos grupos, os grupos experimentais não diferiram entre si e não diferiram do grupo 1 (controle) e nem do grupo 2 (desnervado), apenas o grupo 6 diferiu do grupo 2.

Quanto aos parâmetros “step cycle”, “duty cycle” e “print positions”, os resultados mostram que os testes foram pouco sensíveis para esse estudo ou os parâmetros não são modificados por esse modelo experimental.

g) Base of suport - Tabela 32: é a largura ou distância média entre as patas dianteiras e traseiras. Nas lesões medulares as patas dianteiras tendem a manter a distância e as traseiras a aumentar esta distância. Este parâmetro também não usou, como o resultado, a relação entre os valores da pata estudada com a pata normal. Nos grupos examinados, quando se compara apenas as distâncias entre as patas dianteiras, não houve diferença estatística entre os grupos. Quando se compara as distâncias entre as patas traseiras dos grupos, verifica-se que o grupo 2, desnervado, mostrou uma média de distância (6,32 mm) maior estatisticamente que a média de distância entre as patas traseiras do grupo 1, controle (5,23 mm). Os grupos 3, 5 e 7 não diferiram do grupo 1, mas também não diferiram do grupo desnervado. Os grupos 4 e 6 diferiram do grupo controle e foram estatisticamente

semelhantes ao grupo desnervado. Os grupos experimentais de 3 a 7 não diferiram estatisticamente entre si. O teste foi pouco sensível.

Segundo as orientações de uso do “CatWalk”, para a interpretação dos dados da corrida é importante que a velocidade de locomoção não difira significativamente entre os grupos. Por esta razão, estabeleceu-se um tempo limite para todas as corridas de 8 segundos para que os animais percorressem a passarela de vidro. Esse tempo foi estabelecido após se avaliar corridas de todos os animais, como um treinamento, antes das medidas usadas nesse estudo. Para que o peso não interferisse em algumas medidas como a intensidade, a pata contralateral sempre foi tomada como o controle para a pata afetada e os resultados expressos em porcentagem do resultado da pata afetada sobre o resultado da pata normal.

Segundo Monte-Raso et al. (2006) a maioria dos estudos em lesões nervosas periféricas empregam métodos histomorfométricos e eletrofisiológicos na análise de seus grupos. Esses autores afirmam que embora sejam importantes, esses métodos são aplicados no final da pesquisa e não são capazes de dar nenhuma informação quanto à evolução ou recuperação da função motora no decorrer da pesquisa. A observação dessa evolução é de grande interesse. Os resultados obtidos pelo “Walking Track” do presente estudo deixam clara a evolução na regeneração nervosa dos grupos experimentais de 3 a 7, sobretudo a boa evolução do grupo em que se usou células-tronco. Esses resultados sobre a evolução da regeneração nervosa poderiam ser confirmados pelo “CatWalk” se essa forma de avaliação tivesse sido usada desde o início do estudo.

O cálculo dos índices funcionais através do “Walking Track” é de aplicação extremamente fácil e barata, confiáveis e reprodutíveis, apesar de trabalhosa. Provavelmente por essas razões sejam ainda tão largamente usados e citados (Monte Raso et al., 2006; Hundepool et al., 2014). No presente estudo a análise manual para o cálculo dos índices funcionais foi trabalhosa, mas mostrou resultados claros.

A grande vantagem do “CatWalk” é a possibilidade de avaliar parâmetros dinâmicos além dos parâmetros estáticos em modelos de neurotmease através de dados apresentados de forma menos trabalhosa (Deumens et al, 2007). Os índices funcionais dos nervos foram os parâmetros que mostraram diferenças entre os

grupos, sendo os parâmetros mais importantes de serem avaliados em estudos sobre a reinervação nervosa periférica. Os outros parâmetros avaliados nesse estudo não foram sensíveis o suficiente para diferenciar os grupos ou esses parâmetros não sofreram alteração pelo método.

4.7 Força máxima de contração do músculo tibial cranial

Quando o estímulo foi feito diretamente no nervo fibular comum, antes da neurorrafia, ou nos casos de desnervação (grupo 2) quando foi aplicado no coto distal do nervo fibular comum, os grupos 3, 4, 6 e 7 responderam com força máxima de contração estatisticamente semelhante àquela do grupo 1 (controle). O grupo 5 apresentou resultado inferior estatisticamente ao do grupo 1, mas superior ao resultado do grupo 2. O grupo 2 teve o pior resultado na comparação. O teste mostra que em todos os grupos houve reinervação e a força muscular foi conservada, com pior resultado visto no grupo 5.

No estímulo diretamente no músculo tibial cranial, o grupo 4 teve o melhor resultado, melhor até que o grupo controle. Os grupos 1, 3, 5, 6 e 7 mostraram força de contração máxima estatisticamente semelhantes e melhor que o resultado do grupo 2.

Comparando os resultados das duas formas de estímulo, constatou-se que o grupo 4 mostrou melhor resultado com o estímulo direto no músculo, enquanto que os grupos 3, 4, 6 e 7 mostraram os melhores resultados com o estímulo no nervo fibular comum. Portanto o grupo 4 se apresenta com resultados semelhantes ao grupo controle nas duas modalidades de estímulo.

Estatisticamente, o grupo 4 se sobressaiu nesse teste. Os demais grupos apresentaram sempre resultado superior ao observado no grupo desnervado, demonstrando que a reinervação do músculo tibial cranial foi a responsável pela manutenção da força de contração.

Considerando os resultados da perimetria, talvez o grupo 4 tenha apresentado maior trofismo que os outros, ou seja, talvez os animais desse grupo fossem maiores e mais fortes, mesmo sabendo que na avaliação da massa final dos animais não houve diferença estatística entre os grupos. É possível que o aperfeiçoamento deste teste possa mostrar diferenças entre os grupos em estudos posteriores.

O teste de força máxima ou de contração tetânica, com estímulo de 100Hz de frequência e 100mA, foi idealizado por Maciel (2011), após vários testes nesse modelo experimental (neurorrafia látero-terminal do nervo fibular comum ao nervo tibial). Com esses parâmetros o autor conseguiu contração tetânica do músculo tibial cranial, ou seja, contração máxima. Maciel (2011) usou esse mesmo modelo com

estímulo apenas no músculo e conseguiu diferenciar os grupos experimentais: encontrou que no grupo em que se fez neurografia látero-terminal e se realizou estimulação elétrica durante períodos determinados, a força de contração foi maior que no grupo em que não se realizou a eletroestimulação. Os resultados desta pesquisa foram inesperados, sugerindo apenas maior trofismo no grupo 4, não diferenciando os demais grupos.

Issacs et al. (2005) realizaram o teste de força apenas com estímulo no nervo, permitindo observar a passagem da corrente pela neurografia. A realização do estímulo diretamente no músculo permitiu avaliar a força de contração independente da neurografia, mas constata a reinervação e conservação de fibras musculares que permitiram a contração.

O modelo utilizado para este experimento foi muito semelhante ao usado por Waitayawinyu et al. (2007) que compararam a medida de força máxima entre duas formas de condutores (ácido poliglicólico e colágeno tipo I) e auto enxerto de nervo substituindo defeitos de nervos ciático em ratos. O modelo de medição da força máxima foi eficiente na diferenciação dos grupos experimentais nesse estudo, os grupos que usaram o colágeno tipo I ou o auto enxerto apresentaram força de contração superior.

Tham e Morrison (1998), em estudo sobre neurografia látero-terminal, usaram o nervo fibular como receptor e o nervo tibial como doador, tendo o músculo gastrocnêmio como músculo-alvo. Os autores realizaram teste de força nos grupos experimentais e observaram força de contração do músculo gastrocnêmio no grupo experimental menor que no grupo controle.

Liu et al. (1999) compararam três grupos: neurografia látero-terminal do nervo fibular ao nervo tibial com e sem janela de epineuro e neurografia término-terminal. Dentre outros parâmetros usaram a medida de contração do músculo extensor longo dos dedos (teste de força) e concluíram que houve reinervação nas duas formas de neurografia e que na neurografia término-terminal o resultado de força de contração muscular foi melhor. Resultado diferente foi visto com Kalliainen et al. (1999) que relataram em estudo experimental que os músculos reinervados após neurografia término-lateral apresentaram força motora do músculo-alvo semelhante ao grupo no qual a neurografia foi término-terminal.

Arino et al. (2008) em estudo experimental usaram a medida da força de contração muscular tetânica em estudo que visava avaliar a influência de células de Schwann em enxertos de tendões para o reparo de nervos periféricos. Não encontraram diferenças entre os grupos. Os exames histológicos também não mostraram diferenças entre os grupos.

Portanto o teste de força tem sido usado como parâmetro de comparação entre modelos experimentais para estudos em reinervação periférica há algum tempo. O aprimoramento desses modelos é importante para que se possa comparar os diversos estudos. No presente estudo houve diferença entre os grupos, sobretudo quando o estímulo foi aplicado no nervo fibular comum.

4.8 Análise histológica e morfométrica de músculos e nervos

Músculos tibiais craniais direito e esquerdo

A coloração pela hematoxilina e eosina foi ideal para a análise das fibras musculares, com boa nitidez e qualidade para a análise das lâminas. A possibilidade de escanear a lâmina possibilitou maior agilidade ao processo de análise das lâminas, que antes eram fotografadas.

Quanto à morfologia do músculo tibial cranial nota-se a reinervação nos grupos de 3 a 7, pois há grande diferença entre esses grupos e a imagem mostrada no grupo 2 (desnervado). Nos grupos reinervados as fibras são poligonais como no grupo controle, um pouco menores e mais afastadas que no grupo controle. A quantidade de tecido conjuntivo é menor que a observada no grupo desnervado e um pouco maior que observada no grupo controle. Aspectos semelhantes aos observados por Maciel (2011) em seu estudo sobre neurografia látero-terminal.

Medidas no músculo tibial cranial

O diâmetro mínimo das fibras musculares é a medida mais confiável para a comparação dos grupos na análise das fibras musculares do músculo tibial cranial, pois esse parâmetro não sofre interferência da inclinação do corte transversal das fibras musculares (De Sá et al., 2004) afirmação compartilhada por outros autores (Romão et al., 2007 e Maciel et al., 2011).

Para o diâmetro mínimo, perímetro e área das fibras musculares do lado direito os grupos de 3 a 7 não mostraram diferença entre si, com resultados superiores ao observado no grupo 2. Portanto houve reinervação e manutenção do trofismo muscular. No entanto nenhum dos grupos apresentou resultado semelhante ao observado no grupo 1 quanto ao diâmetro mínimo e área. Resultado semelhante ao encontrado em outros estudos (Viterbo et al., 1998; Zhang et al., 1998; Yu et al., 2010).

Avaliando o perímetro das fibras musculares do músculo tibial cranial do lado direito, os melhores resultados foram vistos nos grupos 4, 5 e 7 que foram estatisticamente semelhantes ao resultado do grupo 1 (controle de normalidade).

Quanto aos três parâmetros usados na análise do músculo tibial cranial: diâmetro mínimo, perímetro e área, quando se comparam os lados direito e

esquerdo no mesmo grupo, os grupos 6 e 7 mostraram comportamento semelhante ao grupo 1, sem diferença estatística entre os lados. Os grupos 6 e 7 evoluíram melhor que os grupos 3, 4 e 5 quando as comparações são feitas entre os lados direito e esquerdo.

A área das fibras musculares do músculo-alvo tem sido parâmetro de comparação entre os grupos experimentais em estudos de neurografia látero-terminal por alguns autores (Viterbo et al., 1998; Yu et al., 2010), com resultados semelhantes aos encontrados no presente estudo, ou seja, sem conseguir diferenciar os grupos experimentais entre si.

Romão et al. (2007) em estudo sobre a interferência da eletroestimulação em nervo periférico usaram atributos relacionados ao músculo tibial cranial (contagem no número das fibras musculares, área, diâmetro mínimo e diâmetro máximo das fibras musculares) e concluíram que a análise desses atributos não diferenciou os grupos experimentais entre si, apenas os diferenciou do grupo desnervado, resultado semelhante ao observado no presente estudo.

Em 2011, Maciel realizou estudo da interferência da eletroestimulação em neurografia látero-terminal. Na análise morfométrica do músculo tibial cranial (área, perímetro e diâmetro mínimo do corte transversal do músculo) verificou que os resultados de todos os grupos foram superiores ao resultado do grupo desnervado e semelhantes entre si, inclusive o resultado do grupo controle. No entanto, quando comparou os grupos quanto à área, perímetro e diâmetro mínimo da fibra muscular do músculo tibial cranial, encontrou que os resultados nos grupos experimentais foram inferiores estatisticamente ao resultado do grupo controle. Apesar disso, concluiu que o grupo que recebeu eletroestimulação apresentou resultado estatisticamente superior ao que não recebeu e ao desnervado. Esse resultado mostrou que a eletroestimulação foi eficiente e houve diferença entre os grupos experimentais.

O presente estudo mostrou que as células-tronco não conseguiram influenciar positivamente no trofismo das fibras musculares na reinervação nervosa usando a neurografia látero-terminal quando se compara com os outros grupos experimentais, mas a neurografia látero-terminal foi eficiente na reinervação quando se compara com o grupo desnervado.

Segmento distal do nervo fibular comum (N1)

No grupo controle há uma grande quantidade de fibras nervosas, todas regulares, com camada de mielina espessa em todas as fibras e pouco tecido conjuntivo entre as fibras. No grupo desnervado (grupo 2) não se vê fibras nervosas regulares. As poucas fibras observadas estão em degeneração, são irregulares e há muito tecido conjuntivo que substitui a arquitetura normal do nervo. Nos grupos experimentais de 3 a 7, há organização semelhante à vista no grupo controle, no entanto, se vê menos fibras, com camada de mielina algumas vezes menos espessa e sempre mais irregular que aquela vista no grupo controle, além de um pouco mais de tecido conjuntivo. No entanto todos os grupos apresentaram imagens muito mais semelhantes às imagens encontradas no grupo controle do que as imagens encontradas no grupo desnervado.

Quanto ao número de fibras nervosas no segmento N1

Quanto ao número de fibras nervosas apenas o grupo 7 se assemelhou estatisticamente ao grupo 1 (controle), embora o grupo 7 não tenha sido estatisticamente diferente dos grupos 3, 4 e 6.

O número de fibras nervosas tem sido parâmetro de comparação entre os grupos experimentais em estudos de neurografia látero-terminal por alguns autores (Viterbo et al., 1992; Viterbo et al., 1998; Zhang et al., 1998; Jaber et al., 2003; Papalia et al., 2007; Yu et al., 2010, Viterbo et al., 2012)

Jaber et al. (2003) encontraram menor número de fibras nervosas no grupo experimental onde se realizou neurografia látero-terminal comparado com o grupo normal ou controle.

Viterbo et al. (2012) encontraram menor número de fibras nervosas no nervo peroneiro que havia sido suturado no nervo tibial de forma látero-terminal do que no grupo controle.

Papalia et al. (2007), em estudo sobre neurografia látero-terminal mostraram que o número de fibras nervosas no segmento após a neurografia foi menor que aquele observado no grupo controle.

Yu et al. (2010), em estudo experimental sobre neurografia látero-terminal do nervo musculocutâneo ao nervo ulnar, analisaram o número de axônios e o diâmetro dos axônios sob o mesmo aumento de 400X usado por esse estudo. No grupo

controle os axônios se apresentaram em maior número e possuíam maior diâmetro que no grupo em que se realizou a neurografia látero-terminal.

Lopes et al. (2006) avaliaram a interferência de células-tronco na reinervação nervosa periférica. A análise quantitativa dos nervos regenerados mostrou que o número de fibras mielinizadas e a área da mielina foram significativamente maiores no grupo experimental que usou as células tronco do que no grupo que foi submetido ao mesmo procedimento e não usou células-tronco. Frattini et al (2012) em estudo semelhante com células-tronco derivadas da medula óssea interpostas entre cotos do nervo ciático encontraram resultado semelhante, com um aumento significativo no número de fibras mielinizadas no grupo que recebeu as células-tronco.

Cartarozzi et al. (2015) em estudo sobre o uso de células-tronco mesenquimais da medula em reinervação nervosa periférica não encontraram diferença entre os grupos experimentais quanto ao número de axônios.

No presente estudo, os grupos de 3 a 6 apresentaram número de axônios inferior ao encontrado no grupo controle e apenas o grupo 7 apresentou número estatisticamente semelhante ao grupo controle. Resultado que remete à possível influência das células-tronco no número de axônios, posto que na maioria dos estudos sobre neurografia látero-terminal o número de fibras nervosas é normalmente inferior ao observado no grupo controle.

Medidas na fibra nervosa

Quanto à área da fibra nervosa e quanto ao diâmetro mínimo da fibra nervosa do segmento N1, o grupo 6 apresentou o melhor resultado dentre os grupos de 3 a 7 e nenhum se assemelhou ao grupo controle (grupo 1).

Quanto ao diâmetro mínimo da fibra nervosa, nenhum dos grupos apresentou resultado estatisticamente semelhante ao do grupo 1 (controle), dentre os grupos de 3 a 7 o melhor resultado foi o do grupo 6.

Portanto quanto aos parâmetros usados para a fibra nervosa de N1, o grupo 6 apresentou os melhores resultados entre os grupos de 3 a 7.

O diâmetro das fibras nervosas têm sido usado por alguns autores. Papalia et al., (2007), em estudo sobre neurografia látero-terminal mostraram que o diâmetro da

fibras nervosas no segmento após a neurografia foi menor que aquele observado no grupo controle. Resultado semelhante ao encontrado nesse estudo.

Medidas no axônio

Analisando a área do axônio do segmento N1, o grupo 1 (controle) apresentou o melhor resultado seguido pelos grupos 5, 6 e 7. O grupo 7 apresentou resultado estatisticamente semelhante aos resultados dos grupos de 3 a 6.

Analisando o diâmetro mínimo do axônio no segmento N1, o grupo 1 (controle) apresentou o melhor resultado. Os grupos de 3 a 7 não mostraram diferença estatística entre si. Esse parâmetro mostrou pouca sensibilidade nesse estudo.

O diâmetro do axônio foi usado como parâmetro de comparação em outros estudos sobre neurografia látero-terminal (Yu et al., 2010) com resultado semelhante. O número e diâmetro de axônios no nervo receptor abaixo da neurografia foram menores que o controle de normalidade e maior que o desnervado, ou seja o grupo controle se mostrou superior ao grupo no qual se realizou a neurografia látero-terminal.

Medidas na bainha de mielina

Analisando a área da bainha de mielina do segmento N1, o grupo 1 (controle da normalidade) apresentou o melhor resultado seguido pelos grupos 6 e 3 que não diferiram entre si. Os grupos 3, 4, 5 e 7 apresentaram resultados estatisticamente semelhantes entre si.

Analisando a espessura da bainha de mielina, os grupos experimentais de 3 a 7 não diferiram estatisticamente entre si e não alcançaram o resultado obtido pelo grupo controle.

Em resumo, o grupo 7 foi o único grupo a apresentar resultado semelhante estatisticamente ao grupo controle quanto ao número de fibras nervosas.

Lopes et al. (2006), estudaram a influência de células-tronco removidas da medula óssea na regeneração nervosa periférica em ratos, através do uso de um tubo de colágeno absorvível preenchido com células do estroma da medula óssea na proporção de 1×10^5 células-tronco por animal. Constataram que a melhora funcional foi mais rápida e que o número de fibras mielinizadas e a área de mielina

nestas fibras foram significativamente maiores no grupo que recebeu as células do estroma da medula óssea quando comparadas ao grupo que não as recebeu, resultados semelhantes aos encontrados no presente estudo quanto à melhora funcional e quanto ao número de fibras nervosas.

Cartarozzi et al. (2015) investigaram a eficácia de células-tronco mesenquimais removidas da medula óssea na regeneração de nervos periféricos em ratos adultos. O defeito foi reconstruído com um tubo de policaprolactona. Quanto à área das fibras nervosas não houve diferença estatística entre o grupo experimental que usou e o que não usou células-tronco, o grupo controle sempre se mostrou estatisticamente superior, resultado semelhante ao resultado do presente estudo. Os autores examinaram os segmentos de nervos nos tubos através do número de axônios por área de $50.000\mu\text{m}^2$ (densidade), espessura da bainha de mielina (diâmetro da fibra nervosa - diâmetro do axônio/2) e “g ratio” (diâmetro do axônio / diâmetro da fibra nervosa). Concluíram que a contagem e análise morfológica dos nervos mostraram que o grupo no qual se usou células-tronco levou a um maior grau de compactação das fibras nervosas (densidade) combinadas com uma tendência de aumento da espessura da bainha de mielina em comparação com outros grupos experimentais. Quando os grupos foram comparados quanto ao número de fibras regeneradas e quanto à espessura da bainha de mielina não houve diferença entre os grupos experimentais. Resultados muito semelhantes aos encontrados no presente estudo.

Romão et al. (2007) analisaram o nervo fibular comum após esmagamento quanto à área, menor e maior diâmetro da fibra nervosa e encontraram que o grupo em que se fez eletroestimulação três vezes por semana mostrou pior recuperação que o grupo que recebeu eletroestimulação diária. O teste conseguiu diferenciar os grupos experimentais entre si. O grupo controle sempre foi superior aos grupos experimentais em todos os parâmetros examinados.

Maciel et al. (2013) publicaram estudo da interferência da eletroestimulação em neurografia látero-terminal, e, na análise morfológica dos nervos (área, número e diâmetro mínimo de fibras nervosas, área e espessura da bainha de mielina) verificaram que apenas na comparação quanto à área da fibra nervosa os grupos experimentais foram estatisticamente semelhantes entre si. O grupo que recebeu a estimulação elétrica foi superior ao que não recebeu.

Portanto, nos dois estudos acima, a eletroestimulação influenciou positivamente na recuperação morfológica do segmento pós neurorrafia ou esmagamento. O grupo controle sempre foi superior aos grupos experimentais em todos os parâmetros examinados. No presente estudo os parâmetros não foram sensíveis na diferenciação entre os grupos experimentais, ou não há diferença entre eles, exceto pelo número de fibras nervosas, que é o parâmetro mais usado pelos estudos, dentre os parâmetros usados para a análise do nervo pós neurorrafia.

Quanto à razão G não houve diferença entre os grupos 1, 3, 4, 5, 6 e 7. A razão G é um parâmetro relacionado com a velocidade de condução do impulso nervoso. Segundo Passos e Teodori (2006) a maioria dos axônios mielínicos deve apresentar razão G entre 0,6-0,7. Valores acima de 0,7 indicam bainha de mielina fina e portanto desmielinização, enquanto aqueles abaixo de 0,6 indicam bainha de mielina espessa indicando atrofia axonal (Passos e Teodori 2006 apud Ansselin et al., 1997).

Segundo Chomiak e Hu (2009) mielinização é o único processo celular que pode impactar fortemente na estrutura e fisiologia de um axônio e seu meio, pois a espessura da bainha de mielina altera as propriedades funcionais dos axônios. A razão G tem sido largamente usada como um índice funcional e estrutural de mielinização ótima, no entanto os autores atentam para o fato de que a equação que divide o diâmetro do axônio pelo diâmetro da fibra nervosa não leva em consideração outros importantes fatores que podem influenciar na velocidade de condução além da espessura da bainha de mielina, como a resistência e o aumento do volume total da fibra que demandaria maior gasto de energia para que o impulso atravessasse o axônio. Os autores relacionam valores da razão G para diferentes fibras nervosas do sistema nervoso central e periférico. Concluem que há uma razão G ideal para cada fibra nervosa dependendo do nervo a que pertence e concluem que o aumento da bainha de mielina melhora a condução até um pico a partir do qual não há melhora funcional ou maior velocidade da condução e sim piora.

Segundo Chomiak e Hu (2009), na revisão de literatura que fizeram, para o nervo ciático a razão G encontrada foi uma média de 0,55 a 0,68 μm , para o nervo sural a média encontrada foi de 0,47 a 0,6 μm , não há menção à média da razão G no nervo fibular. Os resultados do presente estudo não mostraram diferença estatística entre os grupos 1, 3, 4, 5, 6 e 7 e a razão G em cada grupo está entre as médias dos nervos sural e ciático apontadas no estudo de Chomiak e Hu (2009),

portanto dentro do esperado. O resultado mais importante quanto à razão G é semelhança estatística entre os grupos, mostrando que houve recuperação e remielinização nos grupos experimentais de 3 a 7.

Histologia do coto proximal do nervo fibular comum direito (N2)

A análise histológica do coto proximal do nervo fibular comum nos grupos de 2 a 7 permitiu observar a existência de neuroma de amputação e que, portanto, não houve crescimento em direção ao coto distal evitando assim a reconexão ou contaminação motora para N1. Assim, levar o coto proximal até a superfície do músculo bíceps femoral e fixá-lo com fio de náilon 4.0 foi uma técnica adequada que não permitiu a reinervação do nervo fibular comum a partir de seu coto proximal em nenhum dos animais desse estudo. Viterbo et al. (2004b) e Maciel et al. (2013) demonstraram o neuroma do coto proximal usando o mesmo procedimento de isolamento do coto proximal.

Histologia do segmento da neurorrafia (N3) pelo HE.

As lâminas coradas pela HE permitiram identificar a migração de axônios do nervo tibial para o nervo fibular comum direito. Dependendo do nível do corte realizado na região da neurorrafia pode-se observar a migração com maior ou menor clareza. Trata-se de método barato e facilmente aplicável, que permite a observação da migração dos axônios.

Observando as lâminas coradas pela HE, os grupos de 3 a 7 não mostraram diferença estatística entre si quanto à hemorragia, edema e inflamação que foram analisados através de um “score” previamente estabelecido. Quanto à quantidade de vasos observados nesse segmento (N3) o grupo 7 se assemelhou estatisticamente ao grupo 3 que não diferiu dos demais grupos. O grupo 7 mostrou resultado superior aos grupos 4, 5 e 6.

Histologia do segmento da neurorrafia (N3) pela Imunoistoquímica.

O número de animais reduzido para o estudo imunoistoquímico se justifica pelo alto custo do processamento das lâminas e dos marcadores. O estabelecimento de um “score” permitiu menor subjetividade.

O anticorpo proteína S100 é utilizado rotineiramente para evidenciar a célula de Schwann. Nesse caso, foi usado para avaliar a presença de células de Schwann e não a função da célula. O local de observação foi intra nervos e na região da neurorrafia. O grupo 7 mostrou resultado superior ao observado no grupo 6 e semelhante aos outros grupos. Portanto quanto a esse marcador o grupo que usou células-tronco não se mostrou superior aos outros grupos.

Muitos estudos têm observado a diferenciação de células-tronco em células de Schwann ou células tipo Schwann (Martins & Siqueira, 2005; Pan et al., 2006; Chen et al., 2006; Braga-Silva et al., 2006; Chen et al., 2007; Johnson et al., 2008; Arino et al., 2008; Lago et al., 2009; Walsh & Midha, 2009).

Frattini et al. (2012) estudaram a influência de células-tronco removidas da medula óssea na regeneração nervosa periférica em ratos. Constataram pela imunistoquímica que algumas células transplantadas assumiram um fenótipo de células de Schwann, como evidenciado pela sua expressão da proteína S-100.

Cartarozzi et al. (2015) usaram o marcador S100 para identificar células de Schwann em estudo sobre a influência de células-tronco mesenquimais da medula óssea em defeito no nervo ciático em ratos. Quanto aos anticorpos S100 e ao colágeno tipo IV presente na membrana basal das células de Schwann não houve diferenças entre os grupos e nem entre os grupos e o lado controle. A mesma localização dos marcadores S100 e pt75NTR mostrou que as células de Schwann devam ser as responsáveis pela produção de fatores neurotróficos no local da regeneração nervosa.

O resultado é semelhante ao encontrado neste estudo, quanto à análise isolada do marcador S100 pois não houve diferença entre os grupos. O presente estudo não analisou a função das células de Schwann. Os autores fizeram a análise da função das células de Schwann através da análise de dois anticorpos para imunistoquímica: pt75NTR e BDNF. A análise por imunistoquímica do BDNF mostrou que algumas células estavam possivelmente secretando o BDNF após 60 dias de implantadas. BDNF é um dos reguladores endógenos da produção de mielina e tem sido citado como um importante fator auxiliar na produção de mielina mediado pelo pt75NTR.

Talvez a maior importância das células-tronco mesenquimais seja a produção de fatores neurotróficos e não sua transdiferenciação em células de Schwann como

sugerido por Cartarozzi et al. (2015) e pelo presente estudo, pois não houve diferença entre os grupos quanto à análise por imunoistoquímica pelo marcador S100, mas há outros elementos que apontam para o benefício das células-tronco mesenquimais no auxílio para a reinervação nervosa periférica.

O marcador CD90 foi usado na tentativa de identificar células-tronco mesenquimais. O local de observação foi toda a região da neurorrafia que esteve envolta por células-tronco no grupo 7 e a mesma região nos demais grupos. O marcador CD90 foi observado no interstício, em poucas células e em uma célula de vaso sanguíneo (um caso). Quanto ao CD90 os melhores resultados foram observados nos grupos 5 e 7. Não houve diferença quanto à quantidade de células-tronco marcadas pelo CD90 comparando os grupos que usaram o gel de plaquetas e fásia (grupo 5) e o grupo no qual se usou células-tronco e o gel de plaquetas (grupo 7). O resultado do grupo 5 foi semelhante aos resultados dos grupos 3, 4 e 6.

Talvez o efeito inicial tenha sido importante e o resultado da análise desses parâmetros (através da imunoistoquímica) fosse diferente se alguns desses animais tivessem sido sacrificados nas primeiras semanas do experimento.

Esses resultados correspondem aos resultados encontrados por Erba et al. (2010) que afirmaram que o número de células-tronco mesenquimais derivadas da gordura havia diminuído muito em número após 14 dias de implantadas em defeito de nervo ciático em ratos. O número de células-tronco transplantadas no experimento, após cultura, foi de 1×10^6 células. Os autores constataram que as células-tronco foram eficazes na indução da proliferação de células de Schwann e houve crescimento dessas através do defeito (com condutor interposto) até o coto distal, essa conclusão foi feita medindo-se a extensão do marcador S100.

No presente estudo, o número de células de Schwann também não foi maior no grupo no qual se implantou células-tronco conforme demonstrado pelo marcador S100. O intuito foi avaliar a influência das células-tronco mesenquimais na neurorrafia látero-terminal, não foi possível identificar as células-tronco mesenquimais na neurorrafia através do anticorpo CD90 e não foi possível observar a diferenciação dessas células em células de Schwann através da pesquisa da proteína S100, pois estatisticamente os grupos foram semelhantes.

O marcador CD34 foi usado para avaliar a vascularização existente em cada amostra, a sua presença foi observada na região da neurorrafia e intra nervo fibular comum após a neurorrafia.

O marcador CD105 foi usado para avaliar a formação de neovasos. A sua presença foi observada na região da neurorrafia e intra nervo fibular comum após a neurorrafia.

Na observação dos marcadores CD34 e CD105 perineurorrafia, não houve diferença entre os grupos.

Na observação dos marcadores CD34 e CD105 intra nervo fibular comum, os melhores resultados foram vistos nos grupos 7, 4 e 5. Os grupos 3 e 6 apresentaram resultados piores que o observado no grupo 7, mas não diferiram dos resultados dos grupos 4 e 5. Portanto não houve superioridade de um dos grupos quanto a esses marcadores.

O aumento da vascularização foi observado em todos os grupos. Considerando os resultados da observação das lâminas coradas por hematoxilina e eosina e as lâminas coradas pelos marcadores CD34 e CD105, não houve um grupo que fosse superior aos outros quanto à vascularização peri ou intraneurorrafia. Pois uma possibilidade era que o aumento da vascularização pudesse estar associado à melhora na reinervação nervosa periférica por influência das células-tronco. Essa suposição não foi confirmada nesse estudo.

Na identificação de células-tronco mesenquimais pela imunoistoquímica há menos anticorpos para estudo quando comparado à citometria de fluxo, são anticorpos inespecíficos para células-tronco mesenquimais e a interpretação dos resultados merece atenção e confronto com outros dados.

A peroxidase proveniente das hemácias sempre ficou muito corada pelos marcadores da imunoistoquímica. Mesmo bloqueada pelo processo normal da técnica da imunoistoquímica, ainda havia muita peroxidase proveniente das hemácias contidas nas lâminas, talvez pelo processo de dissecação do segmento N3. Foi difícil avaliar algumas lâminas por essa marcação ou coloração exagerada de fundo.

A presença de linfócitos e plasmócitos sugeriu inflamação crônica na maioria das lâminas. Em uma lâmina houve predomínio de neutrófilos e eosinófilos

sugerindo infecção aguda que poderia ser justificada pela possibilidade de uma infecção local.

A presença de granuloma foi um fator analisado e o resultado não mostrou diferença entre os grupos.

Em resumo

Quanto à massa dos animais, massa dos músculos, perimetria e eletroneuromiografia não se pode estabelecer superioridade de um dos grupos experimentais de 3 a 7. No entanto houve evidência de reinervação e manutenção do trofismo muscular através desses índices.

Quanto aos índices funcionais do nervo ciático e tibial, o grupo 7 foi o que mais se aproximou do grupo 1, embora tenha sido estatisticamente inferior a esse grupo. Quanto ao índice funcional do nervo fibular comum o grupo 7 foi o único grupo que se assemelhou estatisticamente ao grupo 1, sem diferença estatística dos grupos 5 e 6. Os mesmos índices funcionais foram medidos pelo “CatWalk”. Quanto ao índice funcional do ciático, apenas o grupo 7 apresentou resultado semelhante estatisticamente ao grupo 1, mas quanto aos índices funcionais do nervo tibial e fibular comum não se pode estabelecer uma superioridade de um dos grupos de 3 a 7. O nervo tibial foi o doador e o nervo ciático não foi lesado, mas pode-se ver que os índices funcionais desses nervos são afetados em todas as avaliações, sobretudo no grupo em que o nervo fibular comum foi seccionado (grupo desnervado).

Quanto à força máxima de contração do músculo tibial cranial direito, o grupo 4 apresentou os melhores resultados, talvez por melhor trofismo muscular nesse grupo.

Quanto à análise histológica dos músculos tibiais craniais não se pode estabelecer a superioridade de um grupo, mas ficou constatada a reinervação em todos os grupos de 3 a 7 pela diferença estatística que todos apresentam quando comparados ao grupo 2.

Na análise histológica dos nervos fibulares comuns, quanto ao número de fibras musculares, o grupo 7 foi o único grupo a atingir número de fibras estatisticamente semelhante ao observado no grupo 1, mas sem diferença estatística dos grupos 3, 4 e 6. O grupo 6 apresentou melhores resultados quanto à área e diâmetro mínimo das fibras nervosas, mas não foi estatisticamente semelhante ao observado no grupo 1. Nos outros parâmetros usados (área e diâmetro mínimo do axônio, espessura e área da bainha de mielina) nenhum dos grupos de 3 a 7 se assemelhou ao grupo 1 e não houve superioridade de um grupo específico. Como o grupo 2 não pode ser avaliado pela extrema degeneração não

foi possível a comparação. Comparando a morfologia das lâminas fica clara a reinervação em todos os grupos de 3 a 7.

Nas análises de imunoistoquímica não se pode afirmar a superioridade de um dos grupos experimentais de 3 a 7. O aumento da vascularização foi uma observação constante em todos os grupos.

Portanto o grupo 7 apresentou valores semelhantes ao observado no grupo 1 quanto aos índices funcionais dos nervos ciático e fibular comum, também apresentou número de fibras nervosas semelhante estatisticamente ao grupo 1. Em nenhum dos outros parâmetros usados um dos grupos de 3 a 7 se assemelhou estatisticamente aos valores observados no grupo 1.

Outros estudos usando células-tronco removidas da medula óssea em diferentes modelos experimentais de lesão nervosa periférica observaram melhores resultados no grupo que usou células-tronco frente aos outros grupos quanto à melhora da função da marcha (Braga-Silva et al., 2006; Chen et al., 2007), maior número de axônios regenerados ou fibras mielinizadas (Lopes et al., 2006; Braga-Silva et al., 2006; Chen et al., 2007), processo regenerativo mais rápido (Braga-Silva et al., 2006; Lopes et al., 2006; Colomé et al., 2008), menor perda muscular (Chen et al., 2007), área de mielina maior (Lopes et al., 2006) e menor degeneração Walleriana (Colomé et al., 2008). Arino et al. (2008) em estudo sobre a influência de células de Schwann em regeneração nervosa periférica usaram os seguintes parâmetros de comparação: peso e força de contração muscular, número de fibras nervosas e densidade axonal, “G-ratio” (diâmetro do axônio/ diâmetro da fibra nervosa) e área da mielina nos nervos envolvidos na neurografia. Não houve diferença estatística entre os grupos tratados e não tratados com células de Schwann. O presente estudo se comprada aos estudos apresentados acima quanto a dois dos parâmetros citados: melhora funcional e quanto ao maior número de fibras nervosas.

Hundepool et al., (2014) realizaram estudo de meta-análise sobre o uso de células-tronco na regeneração de defeitos de nervos periféricos e confirmam a influencia positiva das células-tronco mesenquimais removidas da gordura e da medula óssea. Segundo os autores, o efeito regenerativo das células-tronco foi demonstrado, sobretudo, através de análises da massa dos músculos estudados, testes eletrofisiológicos e testes da marcha (exame funcional).

Segundo Monte-Raso et al., (2006), não é sempre possível estabelecer uma correlação clara entre os resultados encontrados por diferentes métodos em uma mesma investigação ou entre resultados encontrados por um mesmo método empregado em diferentes pesquisas.

No presente estudo ficou claro que a neurorrafia látero-terminal foi eficaz como forma de reparo da lesão nervosa periférica. Embora usadas em número menor que o possivelmente obtido por uma cultura, as células-tronco mesenquimais removidas do tecido adiposo apontam para melhores resultados que os grupos de 3 a 6 por apresentar valores semelhantes aos encontrados no grupo 1 em dois parâmetros (Índice funcional do nervo fibular comum e número de fibras nervosas), o que não aconteceu com nenhum outro grupo nos outros parâmetros estudados.

6. Conclusão

O grupo em que se usou células-tronco removidas da gordura apresentou índice funcional do nervo fibular comum, avaliado pelo “Walking Track”, e número de fibras nervosas no nervo fibular comum semelhante ao grupo controle de normalidade.

7. Referências

Al-Qattan MM. Terminolateral neurorrhaphy: review of experimental and clinical studies. *J Reconstr Microsurg*. 2001;17(2):99-107.

Arino H, Brandt J, Dahlin LB. Implantation of Schwann cell in rat tendon auto grafts as a model for peripheral nerve repair: Long term effects on functional recovery. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg*. 2008;42:281-185.

Babcock WW. Standard technique for operation of peripheral nerve with especial reference for closure of large gaps. *Surg Gynecol Obstet*. 1927;45:364-78.

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):129-36.

Ballance CA, Ballance HÁ, Steeart P. Remarks on the operative treatment of chronic facial palsy of peripheral origin. *Br Med J*. 1903;2:1009-13.

Bertelli JA, Ghizoni MF. Nerve repair by end-to-side coaptation or fascicular transfer: a clinical study. *J Reconstr Microsurg*. 2003;19:313-8.

Beris A, Lykissas M, Korompilias A, Mitsionis G. End-to-side nerve repair in peripheral nerve injury. *Journal of neurotrauma*. 2007;24(5):909-916.

Bora WF. Peripheral nerve repair in cats: the fascicular stitch. *J. Bone Joint Surg. Am*. 1967;49:659-66.

Bozkurt A, Deumensb R, Scheffela J, O'Deya DM, Weisb J, Joostenc EA, Führmannb T, Brookb GA, Palluaa N. CatWalk gait analysis in assessment of functional recovery after sciatic nerve injury. *Journal of Neuroscience Methods*. 2008;173:91–98.

Braga-Silva J, Gehlen D, Roman JA, Menta C, Atkinson EA, Machado DC, Viezzer C, Barbosa GL, Baes CVW, Silva VD, Costa JC. Efeitos das células-tronco adultas de medula óssea e do plasma rico em plaquetas na regeneração e recuperação funcional nervosa em um modelo de defeito agudo em nervo periférico em rato. *Acta Ortop Bras.* 2006;14(5):273-75.

Braun RM. Epineurial nerve suture. *Clin Orthop Relat Res.* 1982;163:50-6.

Brenner MJ, Dvali L, Hunter DA, Myckatyn TM, Mackinnon SE. Motor neuron regeneration through end-to-side repair is a function of donor nerve axotomy. *Plast Reconstr Surg.* 2007;120(1):215-23.

Brunelli G; Monini L; Brunelli F. La neurotisation musculaire directe. *Ann Chir Main.* 1990;9(4):290-5.

Brunelli GA, Brunelli GR. Direct muscle neurotization. *J Reconstr Microsurg.* 1993;9:81-90.

Bunge RP. Tissue culture observations relevant to the study of axon-Schwann cell interactions during peripheral nerve development and repair. *J Exp Biol.* 1987;132:21-34.

Cartarozzi LP, Spejo AB, Ferreira RS Jr, Barraviera B, Duek E, Carvalho JL, Góes AM, Oliveira AL. Mesenchymal stem cells engrafted in a fibrin scaffold stimulate Schwann cell reactivity and axonal regeneration following sciatic nerve tubulization. *Brain Res Bull.* 2015 Mar;112:14-24.

Cederna PS, Kalliainen LK, Urbanchek MG, Rovak JM, Kuzon WM. "Donor" Muscle Structure and Function after End-to-Side Neurorrhaphy. *Plast and Reconstr.* 2001;107(3):789-96.

Chen X, Wang X, Chen G, Lin W, Yao J, Gu X. Study of in vivo differentiation of rat bone marrow stromal cells into Schwann cell-like cells. *Microsurgery.* 2006;26:111-5.

Chen C, Ou Y, Liao S, Chen W, Chen S, Wu C, Wang C, Wang W, Huang Y, Hsu S. Transplantation of bone marrow stromal cells for peripheral nerve repair. *Experimental Neurology*. 2007;204:443-53.

Chomiak T, Hu B. What is the optimal value of the g-ratio for myelinated fibers in the rat CNS? a theoretical approach. *Plos One* [periódico na Internet]. 2009 [acesso em 2015 dez 12];4(11):e7754. Disponível em: <http://journals.plos.org/plosone/articleid=10.1371/journal.pone.0007754>.

Chiu DT, Autogenous venous nerve conduits. A review. *Hand Clin*. 1999;15:667-71.

Chunzheng G, Shengzhong M, Yinglian J, Je W, Jianmin L. Sciatic nerve regeneration in rats stimulated by fibrin glue containing nerve growth factor: an experimental study. *Injury*. 2008;39(12):1414-20.

Colomé LM, Gomes C, Crosignani N, Paz AH, Lugo AA, Guimarães KM, Foerström LP, Tessari JP, Calomé LM, Graça DL, Meurer L, Passos EP, Pippi NL, Contesini EA, Lima EOC. Utilização de células-tronco autólogas de medula óssea na regeneração do nervo tibial de coelho mediante técnica de tubulação com prótese de silicone. *Ciência Rural Santa Maria*. 2008;38(9):2529-34.

Covas, DT. Células Tronco Mesenquimais. In: Zago, Marco Antônio; Covas, Dimas Tadeu. *Células-tronco: a nova fronteira da medicina*. São Paulo: Atheneu, 2006. p. 27.

Cuevas P, Carceller F, Dujovny M, Garcia-Gómez I, Cuevas B, González-Corrochano R, Diaz-González D, Reimers D. Peripheral nerve regeneration by bone marrow stromal cells. *Neurol Research*. 2002;24(7):634-8.

De Medinaceli L, Freed WJ, Wyatt RJ. An index of the functional conduction of rat sciatic nerve based on measurements made from walking tracks. *Exp Neurol*. 1982;77:634-43.

Deumens R; Jaken RJP; Marcus MAE; Joosten EAJ. The CatWalk gait analysis in assessment of both dynamic and static gait changes after adult rat sciatic nerve resection. *J Neurosci Meth.* 2007;164(1):120-130.

De Sá JMR, Mazzer N, Barbieri CH, Barreira AA. The end-to-side peripheral nerve repair functional and morphometric study using the peroneal nerve of rats. *J Neurosci Methods.* 2004;136(1):45-53.

Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop Dj, Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2006;8(4):315-7.

Ellis JC, McCaffrey TV. Animal model for peripheral nerve grafting. *Otolaryngol Head Neck Sur.* 1984;92(5):546-50.

Erba P, Mantovani C, Kalbermatten DF, Piere G, Terenghi G, Kingham PJ. Regeneration potential and survival of transplanted undifferentiated adipose tissue-derived stem cells in peripheral nerve conduits. *J Plast Reconstr Aesthet Surg.* 2010;63:811-17.

Estatuto do COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação – COBEA). Comissão de Ética no uso de animais CEUA. [homepage na internet]. Araraquara: UNESP – Campus de Araraquara. [atualizada em 2016 jan 3; acesso em 2011 jun 10]. Disponível em: <http://www2.fcfar.unesp.br/Home/ComitedeEtica/estatudo%20do%20cobeapdf>.

Everts PAM, Knape JTA, Weibrich G, Schönberger JPAM, Hoffmann, JJHL, Overdevest EP, Box HAM, van Zundert A. Platelet rich plasma and platelet gel: A review. *J Extra Corpor Techn.* 2006;38:174-87.

Ferreira AS. Lesões nervosas periféricas. Santos: Livraria Editorial Santos;1999.

Frattini F, Lopes FR, Almeida FM, Rodrigues RF, Boldrini LC, Tomaz MA, Baptista AF, Melo PA, Martinez AM. Mesenchymal stem cells in a polycaprolactone conduit promote sciatic nerve regeneration and sensory neuron survival after nerve injury. *Tissue Eng Part A*. 2012 Oct;18(19-20):2030-9.

Friedenstein A, Piatetzky-Shapiro I, Petrakova K. "Osteogenesis in Transplants of Bone Marrow Cells." *Journal of Embryology and Experimental Morphology*. 1996;16:381–90.

Fullerton A. On the use of a sleeve of vein in nerve suture. *British Medical Journal*. 1915;320.

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.

Gatta R. Sulla anastomosi latero-terminale dei tronchi nervosa. *Arch Ital Chir*. 1938;48:155-71.

Gratama, J.W., D'Hautcourt, J.L., Mandy, F., Rothe, G., Barnett, D., Janossy, G., Papa, S., Schmitz, G. and Lenkei, R. Flow cytometric quantitation of immunofluorescence intensity: problems and perspectives. *Cytometry*. 1998;33:166-78.

Giordani G, Westphal Filho RJ, Hornos AP, Santos FM, Moreia N, Segatto FA, Vasconcelos C, Franciosi LFN. Tratamento da paralisia facial por neurotização. *Acm Arq Catarin Med*. 2009;38(Suppl):152-4.

Hall S. Axonal regeneration through acellular muscle grafts. *J Anat*. 1997;190:57-71.

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

Harris L, Low VM. On the importance of accurate muscular analysis in lesions of the brachial plexus and the treatment of Erb's palsy and infantile paralysis of the upper extremity by cross-union of nerve roots. *Br Med J*. 1903;24:1035.

Hayashi A, Yanai A, Komuro Y, Nishida M, Inoue M, Seki T. Collateral sprouting occurs following end-to-side neurorrhaphy. *Plast Reconstr Surg*. 2004;114(1):129-137.

Hundepool CA, Nijhuis THJ, Mohseny B, Selles RW, SER Hovius. The effect of stem cells in bridging peripheral nerve defects: a meta-analysis. *J Neurosurg*. 2014;121:195-209.

Jaberi FM, Abbas BP, Nezhad ST, Tanideh N. End-to-side neurorrhaphy: an experimental study in rabbits. *Microsurgery* 2003;23:359-62.

Jiao H, Yao J, Yang Y, Chen X, Lin W, Li Y, Gu X, Wang X. Chitosan/polyglycolic acid nerve grafts for axon regeneration from prolonged axotomized neurons to chronically denervated segments *Biomaterials*. 2009;30:5004-18.

Jaeger MRO, Braga-Silva J, Gehlen D, Pereira-Filho GA, Zettler CG, Souza MAL, Veas JR, Sebben A. End-to-end versus end-to-side motor and sensory neurorrhaphy in the repair of the acute muscle denervation. *Annals of Plastic Surg*. 2011;67(4):391-96.

Johnson EO, Charchanti A, Soucacos PN. Nerve repair: experimental and clinical evaluation of neurotrophic factor in peripheral nerve regeneration. *Injury*. 2008;39 Suppl 3:S37-52.

Kalliainen LK, Cederna PS, Kuzon WM. M.. Mechanical function of muscle reinnervated by end-to-side neurorrhaphy. *Plast Reconstr Surg*. 1999;103(7):1919-27.

Karpov AA, Uspenskaya YK, Minasian SM, Puzanov MV, Dmitrieva RI, Bilibina AA, Anisimov SV, Galagudza MM. The effect of bone marrow- and adipose tissue-derived mesenchymal stem cell transplantation on myocardial remodelling in the rat model of ischaemic heart failure. *Int J Exp Path.* 2013;94:169–77.

Kayıkçioğlu A, Karamürsel S, Ağaoğlu G, Keiçik A, Çeliker R, Çetin A. End-to-side neurorrhaphies of the ulnar and median nerves at the wrist: report of two cases without sensory or motor improvement. *Ann Plast Surg.* 2000;45:641-3.

Koeppen AH. Wallerian degeneration: history and clinical significance. *J Neurol Scienc.* 2004;220:115-7.

Korbling M, Estrov Z. Adult stem cells for tissue repair - a new therapeutic concept? *N Engl J Med.* 2003;349:570-82.

Lago N, Cassas C, Muir EM, Rogers J, Navarro X. Effects of Schwann cell transplants in an experimental nerve ampute model. *Restorative Neurology and Neuroscience.* 2009;27:67-78.

Liu K, Chen L, Seaber AV, Goldner RV, Urbaniak JR. Motor Functional and Morphological findings following End-To-Side Neurorrhaphy in the Rat Model. *J Orthop Res.* 1999;17(2):293-300.

Lopes FRP, Campos LCM, Corrêa JD, Balduino A, Lora S, Langone F, Borojevic R, Martinez AMB. Bone marrow stromal cells and resorbable collagen guidance tubes enhance sciatic nerve regeneration in mice. *Experimental Neurology.* 2006;198:457-68.

Lundborg G, Dahlin LB, Danielsen N, Gelberman RH, Logo FM, Powwill HC, Varon S. Nerve regeneration in silicone chambers: influence of gap length and of distal stump components. *Exp Neurol.* 1982;76:361-75.

Lundborg G, Dahlin LB, Danielsen N, Nachemson AK. Tissue specificity in nerve regeneration. *Scand J Plast Reconstr.* 1986;20:279-83.

Lundborg G. Nerve regeneration and repair, a review. *Acta orthop scand*.1987;58:145-69.

Lundborg G, Zhao Q, Kanje M, Danielsen N, Kerns JM. Can sensory and motor collateral sprouting be induced from intact peripheral nerve by end-to-side anastomosis? *J Hand Surg*. 1994;19(3):277-82.

Lundborg G, Sweden M. A 25-year perspective of peripheral nerve surgery: involving neuroscientific concepts and clinical significance. *J Hand Surg*. 2000;25:391-431.

Lutz BS, Chuang DCC, Hsu JC, Ma SF, Wei FC. Selection of donor nerves – an important factor in end-to-side neurorrhaphy. *Brith Journal Of Plastic Surgery*. 2000;53:149-54.

Lykissas MG, Sakellariou E, Vekris MD, Kontogeorgakos VA, Batistatou AK, Mitsionis GI, Beris AE. Axonal regeneration stimulated by erythropoietin: an experimental study in rats. *Journal of Neuroscience Methods*. 2007;164:107-115.

Maciel, Fábio Oliveira. Efeito da estimulação do músculo tibial cranial após neurorrafia término-lateral do nervo fibular em ratos. 2011. 110 f. Dissertação [Mestrado] - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina de Botucatu, 2011. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/98123>>.

Maciel FO; Viterbo F; Chuvukian LF; Souza BM. Effect of electrical stimulation of the cranial tibial muscle after end-to-side neurorrhaphy of the peroneal nerve in rats. *Acta Cir Bras*. 2013;28(1):39-47.

Mackinnon SE. New directions in peripheral nerve surgery. *Ann Plast Surg*. 1989;22(3):257-73.

Mackinnon SE, Mclean A, Hunter DA. Direct muscle neurotization recovers gastrocnemius muscle function. *J Reconstr Microsurg*.1993;9(2):77-80.

Marciano L, Garbino JA. Comparação de técnicas de monitoração da neuropatia hanseniana: teste de sensibilidade e estudo de condução nervosa. *Hansen Int.* 1994;19(2):5-10.

Martins RS, Siqueira MG. Utilização de células-tronco no tratamento das lesões traumáticas de nervos. *Arq Bras Neurocir* 2005;24(2):67-72.

Matsumoto M, Hata Y, Matsuka K, Ito O, Battal NM. Schwann cells can induce collateral sprouting intact axons: experimental study of end-to-side neurorrhaphy using a Y-chamber model. *J Reconstr Microsurg.* 1999;15:281-86.

McCallister WV, Tang P, Trumble TE. Is end-to-side neurorrhaphy effective? A study of axonal sprouting stimulated from intact nerves. *Journal of Reconstructive Microsurgery.* 1999;15(8):597-604.

Millesi H. Reappraisal of nerve repair. *Surg Clin North Am.* 1981;61:321-40.

Monte-Raso VV, Barbieri CH, Mazzer N. Sciatic functional index in smashing injuries of rats' sciatic nerves. Evaluation of method reproducibility among examiners. *Acta Ortop Bras.* 2006;14(3):133-6.

Moraes LHR. A Reinervação do músculo extensor longo dos dedos (EDL) de ratos (*Rattus norvegicus*) seria influenciada pelo uso do laser de baixa potência e do tecido adiposo na técnica de tubulização? 2009. 91 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de PósGraduação da Faculdade de Odontologia de Bauru – Universidade de São Paulo, Bauru.

Nichols CM, Myckatyn TM, Rickman SR, Fox IK, Hadlock T, Mackinnon SE. Choosing the correct functional assay: a comprehensive assessment of functional tests in the rat. *Behav Brain Res.* 2005;163(2):143-58.

Nunes e Silva D, Antoniolli da Silva ACMB, Aydos RD, Viterbo F, Pontesil ERJC, Odashiro DN, Castro RJ, Augusto DG. Nerve growth factor with fibrin glue in end-to-side nerve repair in rats. *Acta Cir Bras.* 2012;27(4):325-32.

Oğün TC, Ozdemir M, Senaran H, Ustün ME. End-to-side neurorrhaphy as a salvage procedure for irreparable nerve injuries. Technical note. *J Neurosurg*. 2003;99:180-5.

Ohta M, Suzuki Y, Noda T, Kataoka K, Chou H, Ishikawa N, Kitada M, Matsumoto N, Dezawa M, Suzuki S, Ide C. Implantation of neural stem cells via cerebrospinal fluid into the injured root. *Neuroreport*. 2004;15(8):1249-53.

Okuda K, Kawase T, Momose M, Murata M, Saito Y, Suzuki H, Wolff LF, Yoshie H. Platelet-rich plasma contains high levels of platelet-derived growth factor and transforming growth factor-beta and modulates the proliferation of periodontally related cells in vitro. *J Periodontol*. 2003 Jun;74(6):849-57.

Oliveira IAC, Sponchiado G, Adam ML. Conceitos e aplicações de células-tronco em medicina regenerativa: uma revisão. *RUBS* 2006;2(2):32-42.

Ozmen S, Latifoglu O, Ayhan S, Yavuzer R, Nurlu G, Sezer C, Atabay K. Impact of epineurial excision of the distal recipient nerve in termino-lateral neurorrhaphy. *J Reconstr Microsurg*. 2004;20:385-97.

Palhares A, Viterbo F, Cardoso RG. Enxerto de músculo como substituto de nervo periférico em ratos. *Acta Cir Bras*. 2009;24(3):221-5.

Pan H, Yang D, Chiu Y, Lai S, Wang Y, Chang M, Cheng F. Enhanced regeneration in injured sciatic nerve by human amniotic mesenchymal stem cell. *Journal of Clinical Neuroscience*. 2006;13:570-75.

Pannucci C, Myckatyn TM, Mackinnon SE, Hayashi A. End-to-side nerve repair: review of the literature. *Restorative Neurology and Neuroscience*. 2007(25):45-63.

Papalia I, Lacroix C, Brunelli F, D'Alcontres FS. Direct muscle neurotization after end-to-side neurorrhaphy. *J Reconstr Microsurg*. 2001;17, 237-46.

Papalia I, Cardaci A, D'alcontre FS, Lee JM, Tos P, Geuna S. Selection of donor nerve for end-to-side neurorrhaphy. *J Neurosurg*. 2007;107:378-82.

Piskin A, Kaplan S, Aktas A, Ayyildiz M, Raimondo S, Aliç T, Bozkurt HH, Geuna S. Platelet gel does not improve peripheral nerve regeneration: an electrophysiological, stereological and electron microscopic study. *Microsurgery*. 2008;29(2):144-153.

Pondaag W, Gilbert A. Results of end-to-side nerve cooptation in severe obstetric brachial plexus lesion. *Neurosurgery*. 2008(62(3):656-63.

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

Passos RSD, Teodori RM. Estudo morfométrico de fibras nervosas regeneradas após esmagamento do nervo isquiático e estimulação elétrica muscular 2006. [Monografia na internet]. Piracicaba. Universidade Metodista de Piracicaba. [acesso em 2016 jan 3]. Disponível em:

<http://www.unimep.br/phpg/mostraacademica/anais/4mostra/pdfs/347.pdf>.

Rodrigues AC, Silva MD. Inside-out versus standard artery graft to repair a sensory nerve in rats. *Microsurgery*. 2001;21:102-7.

Romão AM, Viterbo F, Stipp E, Garbino JA, Rodrigues JA. Eletroestimulação do músculo tibial cranial após esmagamento do nervo fibular comum: estudo neurofisiológico e morfométrico no rato. *Rev Bras Ortop*. 2007;42(3):41-46.

Romão, Adriana Maria. Lesão do nervo fibular comum. Avaliação neuronal, muscular e funcional após neurotmeze parcial: estudo no rato. Tese [doutorado] - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Medicina de Botucatu; 2011. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/99894>>.

Roque, JS. Enxerto venoso ao avesso e normal, preenchidos com plasma rico em plaquetas em nervo misto de rato. Tese [Doutorado] – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Paulista Júlio de Mesquita Filho; 2007.

Roque, DD. Enxerto venoso ao avesso e normal com ou sem preenchimento de músculo, em regeneração nervosa de ratos. Tese [Doutorado] – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Paulista Júlio de Mesquita Filho; 2008.

Rosa Júnior, Geraldo Marco. Reparo de nervo periférico utilizando a veia jugular como tubo associado à cultura de células-tronco extraídas de tecido adiposo. Estudo no rato. Tese [doutorado] - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Medicina de Botucatu; 2013. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/108402>>.

Rouleau M, Crepeau J, Tetreault L, Lamarche J Facial nerve sutures: epineural versus perineural sutures. J Otolaryngol. 1981;10:338-42.

Roytta M, Salonen V. Long-term endoneurial changes after nerve transection. Acta Neuropathol. 1988;76:35-45.

Salibian AA, Widgerow AD, Abrouk M, Evans GRD. Stem cells in plastic surgery: a review of current clinical and translational applications. Arch Plast Surg. 2013;40(6):666-75.

Seddon HJ. Three types of nerve injury. Brain. 1943;66:237.

Sherren I. Some points in the surgery of the peripheral nerves. Edin Med J. 1906;20:297.

Shimizu S, Kitada M, Ishikawa H, Itokazu Y, Wakao S, Dezawa M. Peripheral nerve regeneration by the in vitro differentiated-human bone marrow stromal cells with Schwann cell property. Biochem Biophys Res Commun. 2007;359:915-20.

Siemionow M, Sonmez E. Nerve allograft transplantation: a review. J Reconstr Microsurg. 2007;23:511-20.

Somazz MC. Reparo da lesão de nervo ciático através de autotransplante de músculo esquelético em ratos: retalhos obtidos com injeções intramusculares de anestésicos locais. Tese [Doutorado] - Universidade de Campinas, Faculdade de Odontologia; 1994.

Stopiglia AJ, Erhart EA. Utilização de técnica microcirúrgica na neurografia de animais domésticos. Estudo experimental da reparação fascicular no nervo ulnar de cão (*canis familiaris*). Rev Fac Méd Vet Zootec Univ S Paulo. 1987;24(2):193-208.

Sunderland S. Nerves and nerves injuries. Baltimore: Williams and Wilkins Co.1968.

Summa PG, Kingham PJ, Raffoul W, Wiberg M, Terenghi G, Kalbermatten DF. Adiposederived stem cells enhance peripheral nerve regeneration. J Plast Reconstr Aesthet Surg. 2010;63:1544-52.

Sunderland S. Nerves and nerves injuries. Baltimore: Williams and Wilkins Co.;1968

Swanson AN, Wolf SW, Khazzam M, Feinberg J, Ehteshami J, Doty S. Comparision of neurotization versus nerve repair in animal model of chronically denervated muscle. JHS. 2008;33:1093-99.

Tang JB. Vein conduits with interposition of nerve tissue for peripheral nerve defects. J Reconstr Microsurg. 1995;11:21-26.

Tapp H, Deepe R, Ingram JA, Kuremsky M, Hanley Jr EN, Gruber HE. Adipose-derived mesenchymal stem cells from the sand rat: transforming growth factor beta and 3D coculture with human disc cells stimulate proteoglycan and collagen type I rich extracellular matrix. Arthritis Research & Therapy 2008. Disponível em: <http://arthritisresearch.com/content/10/4/R89>.

Terzis JK, Karypidis D. Blink restoration in adult facial paralysis. Plast Reconstr Surg. 2010;126(1):126-39.

Tham SK, Morrison WA. Motor collateral sprouting through an endo-to-side nerve repair. *J Hand Surg.* 1998;23A:844-51.

Toby EB, Meyer BM, Schwappach J, Alvine G, City K. Changes in the structural properties of peripheral nerves after transection. *J Hand Surg.* 1996;21(6):1086-1090.

Tsuji W, Rubin JP, Marra KG. Adipose-derived stem cells: implications in tissue regeneration. *World Stem Cells.* 2014;6(3):312-21.

Urbanchek MG, Ganz DE, Aydin MA, van der Meulen JH, Kuzon WM Jr. Muscle-nervemuscle neurotization for the reinnervation of denervated somatic muscle. *Neurological research.* 2004 Jun;26(4):388-94.

Vasconcelos ZAA, Vasconcelos JJA, Bins-Ely J, D'Eça NR. Uso da técnica “ulnar-bíceps” (Oberlin) em paralisias altas do plexo braquial. Estudo funcional de 20 casos. *Arq Catarin Med.* 2007;36 suppl 1:132-7.

Verkis MD, Beris AE, Pafilas D, Lykissas MG, Xenakis TA, Soucacos PN. Shoulder reanimation in postraumatic brachial plexus paralysis. 2010;41(3):312-8.

Vieira S, Hossne WS. Metodologia Científica para a área da saúde. 2. ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2015.

Viterbo F. Neurorrafia Látero-terminal, estudo experimental no rato. Tese [Doutorado em Bases Gerais da Cirurgia] - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina; 1992.

Viterbo F, Trindade JC, Hoshino K, Mazzoni Neto A. A Lateral-terminal neurorrhaphy without removal of the epineural sheath: experimental study in rats. *Rev Paul Med.* 1992;110:267-75.

Viterbo F. A new method for treatment of facial palsy: the cross-face nerve transplantation with end-to-side neurorrhaphy. *Rev Soc Bras Cir Plást Estét e Reconstr.* 1993;8:29-35.

Viterbo F, Palhares A, Franciosi LF. Restoration of sensitivity after removal of the sural nerve. A new application of latero-terminal neurorrhaphy. *São Paulo Med J.* 1994a;112(4):658-9.

Viterbo F, Trindade JC, Hoshimo K, Netto AM. End-to-side neurorrhaphy with removal of epineural sheath; an experimental study in rats. *Plast Reconstr Surg.* 1994b;94(7):1038-47.

Viterbo F, Trindade JC, Hoshino K, Neto AM. Two end-to-side neurorrhaphies and nerve graft with removal of the epineural sheath: experimental study in rats. *Br J Plast Surg.* 1994c;47:75-80.

Viterbo F, Teixeira E, Hoshino K, Padovani CR. End-to-side neurorrhaphy with and without perineurium. *São Paulo Med J.* 1998;116(5):1808-14.

Viterbo F, Faleiros HRP. Técnicas de Neurorrafia. In: Mélega, JM ed. *Cirurgia Plástica: Fundamentos e Arte.* Rio de Janeiro: Medsi; 2002. p. 477-83.

Viterbo F. Neurorrafia término-lateral. In: Tatagiba M, Mazzer N, Aguiar PHP, Pereira CU eds. *Nervos periféricos. Diagnóstico e tratamento clínico e cirúrgico.* Rio de Janeiro: Revinter; 2003. p. 85-7.

Viterbo F, Salvio AG, Griva BL, Maciel FO. The embracing end-to-side neurorrhaphy in rats. *Acta Cir Bras.* 2012;27(3):260-265.

Voche P, Ouattara D. End-to-side neurorrhaphy for defects of palmar sensory digital nerves. *Br J Plast Surg.* 2005;58:239-44.

Yarak S, Okamoto OK. Células-tronco derivadas de tecido adiposo humano: desafios atuais e perspectivas clínicas. *An Bras Dermatol.* 2010;85(5):647-56.

Yu Q, Lin ZK, Ding J, Wang T, Chi YL, Gao WY. Functional motor nerve regeneration without motor-sensory specificity following endo-to-side neurorrhaphy : an experimental study. J Hand Surg. 2011;36A:2010-16.

Waitayawinyu T, Parisi D M, Miller B, Luria S, Morton HJ, Chin SH, Trumble TE. A comparison of polyglycolic acid versus type 1 collagen bioabsorbable nerve conduits in a rat model: an alternative to autografting. The journal of Hand Surgery. 2007;32(10):1521-9.

Walsh S & Midha R. Practical considerations concerning the use of stem cells for peripheral nerve repair. Neurosurg. 2009;26(2):1-8.

Weinstein SM, Herring AS. Nerve problems and compartment syndromes in the hand, wrist and forearm. Clin Sport Med. 1992;11(1):161-88.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística [homepage na internet]. Análise da disponibilidade domiciliar de alimentos e do estado nutricional no Brasil [acesso em 27 mar 2005]. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br>

Pennsylvania State University. Penn State New Kensington [homepage na internet]. [acesso em 20 março 2015]. Biology 129 - Review of Rat Muscles. Disponível em: <http://www.personal.psu.edu/users/d/y/dys100/anatomy/rat/>

Universidade de São Paulo [homepage na internet]. Biotério de produção e experimentação, animais, Wistar Hannover [acesso em 20 dez 2015]. Disponível em: <http://www.bioterio.fm.usp.br>

Zago MA. Células-tronco embrionárias e clonagem terapêutica. In: Zago, Marco Antônio; Covas, Dimas Tadeu. Células-tronco: a nova fronteira da medicina. São Paulo: Atheneu; 2006. p. 27.

Zhang F, Cheng C, Chin BT, Ho PR, Weibel TJ, Lineaweaver WC, Buncke HJ. Results of termino-lateral neurorrhaphy to original and adjacente nerves. Microsurgery. 1998;18:276-81.

Zhang F, Fischer KA. End-to-side neurorrhaphy. *Microsurgery*. 2002;22(3):122-7.

Zhao J, Chen Z, Chen T. Nerve regeneration after termino-lateral neurorrhaphy. *J Reconst Microsurg*. 1997;13(1):31-7.

Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Furtrel JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH. Multilineage Cells from Human Adipose Tissue: Implications for Cell-Based Therapies. *Tissue Engineering*. 2001;7(2): 211-28.

8. APÊNDICE

Quadro 1 – Resumo de resultados de massa dos animais, dos músculos tibiais craniais e perimetria do membro posterior direito.

Grupos	Massa do animal		Massa do MTC		Perimetria à direita	
	Inicial	Final	Direito	Esquerdo	Acordado	Anestesiado
G1 Controle	276,95 A	461,00 B	0,94 A a	0,90 A a	45,02 Aa	49,22 ABa
G2 Desnervado	265,28 A	464,80 B	0,24 C a	0,89 A b	37,03 Ba	37,50 Da
G3 Neurorrafia	279,90 A	467,27 B	0,55 B a	0,87 A b	41,44 Aa	42,23 CDa
G4 Fásia	271,05 A	490,18 B	0,64 B a	0,89 A b	46,96 Aa	49,84 Aa
G5 Gel de plaquetas	279,25 A	492,45 B	0,58 B a	0,89 A b	47,58 Aa	45,40 ABCa
G6 Gel e fásia	273,95 A	483,32 B	0,62 B a	0,87 A b	41,44 Aa	42,46 CDa
G7 Células tronco	271,30 A	495,55 B	0,68 B a	0,88 A b	46,96 Aa	44,30 BCa

Quadro 2 – Resumo dos resultados da eletroneuromiografia.

Grupos	Nervos Mantidos		Secção do Tibial		Secção do Sural		Força máxima à direita	
	Latência	Amplitude	Latência	Amplitude	Latência	Amplitude	Estímulo - nervo	Estímulo - músculo
G1 Controle	2,26 A	10,60 A	2,17 CD	9,87 A	2,02 C	9,66 A	1,04 AB	0,96 B
G2 Desnervado	3,90 B	1,37 C	4,34 A	1,25 B	5,62 A	0,91 C	0,45 D	0,60 C
G3 Neurorrafia	1,94 A	8,93 AB	3,22 B	7,93 A	2,34 B	8,93 AB	0,91 AB	0,96 B
G4 Fásia	2,24 A	8,95 AB	1,92 D	8,78 A	1,96 C	8,86 AB	1,06 A	1,24 A
G5 Gel de plaquetas	2,09 A	6,97 AB	2,56 BC	7,16 A	2,60 B	7,37 AB	0,69 C	0,90 B
G6 Gel e fásia	1,99 A	5,84 B	2,78 B	6,69 A	2,66 B	6,99 AB	0,90 B	0,99 B
G7 Células tronco	2,06 A	6,14 B	2,31 CD	6,20 A	2,30 BC	5,67 B	1,04 A	1,08 B

Quadro 3 – Resumo dos índices funcionais dos nervos ciático, tibial e fibular pelo “Walking Track” e “CatWalk” e da força de contração do músculo tibial cranial direito com estímulos no nervo e no próprio músculo.

Grupos	“Walking Trak” 180 dias			“CatWalk” - 180 dias		
	IFC	IFT	IFFC	IFC	IFT	IFFC
G1 Controle	-3,35 A	-3,77 A	-15,21 A	9,18 A	13,22 A	38,07 A
G2 Desnervado	-79,66 D	-94,76 D	-154,86 D	-52,82 B	-56,47 B	-156,14 C
G3 Neurorrafia	-59,50 BCD	-68,38 CD	-75,16 C	-35,13 B	-36,63 B	-86,47 ABC
G4 Fásia	-65,55 CD	-76,16 CD	-82,85 C	-30,15 B	-33,35 B	-116,86 BC
G5 Gel de plaquetas	-59,27 BCD	-67,45 C	-70,83 BC	-59,98 B	-68,36 B	-47,50 ABC
G6 Gel e fásia	-45,13 BC	-50,39 BC	-66,18 BC	-35,74 B	-48,65 B	-23,03 AB
G7 Células tronco	-36,70 B	-38,22 B	-31,48 AB	-28,41 AB	-35,39 B	-34,75 ABC

Quadro 4 – Resumo das avaliações histológicas feitas nas fibras musculares do músculo tibial cranial direito e esquerdo.

Avaliações histomorfológicas nas fibras musculares do músculo tibial cranial direito e esquerdo							
Grupos	Diâmetro mínimo à direita	Diâmetro mínimo à esquerda	Perímetro à direita	Perímetro à esquerda	Área das fibras à direita	Área das fibras à esquerda	
G1 Controle	46,91 Aa	47,83 Aa	234,68 Aa	239,26 Aa	3275,48 Aa	3346,61 Aa	
G2 Desnervado	23,44 C a	46,09 ABb	117,24 Ca	224,01 ABb	870,48 Ca	3108,06 ABb	
G3 Neurorrafia	41,32 Ba	45,91 ABb	204,59 Ba	223,91 ABb	2547,94 Ba	3077,27 ABb	
G4 Fásia	42,01 Ba	46,82 ABb	217,56 ABa	241,89 Ab	2702,79 Ba	3413,74 Ab	
G5 Gel de plaquetas	41,57 Ba	46,32 ABb	212,69 ABa	235,64 ABb	2634,43 Ba	3284,25 ABb	
G6 Gel e fásia	41,4 Ba	43,16 Ba	205,81 Ba	212,36 ABa	2559,75 Ba	2718,2 Ba	
G7 Células tronco	42,15 Ba	43,93 ABa	214,06 ABa	225,11 ABa	2675,17 Ba	2973,3 ABa	

Avaliações histológicas no segmento N1 do nervo fibular comum direito								
Grupos	Medidas na fibra nervosa			Medidas no axônio		Medidas na mielina		Razão G
	Número de fibras	Área	Diâmetro mínimo	Área	Diâmetro mínimo	Área	Espessura	
G1 Controle	1909,67 A	72,49 A	7,48 A	20,16 A	3,60 A	50,51 A	2,11 A	0,48 A
G2 Desnervado								
G3 Neurorrafia	1154,56 BC	32,98 C	4,96 C	9,79 C	3,55 B	23,19 BC	1,28 B	0,47 A
G4 Fásia	1015,61 BC	30,25 C	4,49 D	9,07 C	2,46 B	21,16 C	1,17 B	0,48 A
G5 Gel de plaquetas	905,20 C	31,85 C	4,89 C	10,03 B	4,99 B	21,82 C	1,23 B	0,51 A
G6 Gel e fásia	1210,50 BC	39,08 B	5,44 B	11,98 B	3,60 B	27,09 B	1,37 B	0,49 A
G7 Células tronco	1437,44 AB	30,36 C	4,75 CD	10,01 BC	0,64 B	20,36 C	1,21 B	0,49 A

Quadro 6 – Resumo das avaliações histológicas por imunistoquímica e HE feitas na área da neurografia (N3).

S100	CD90			CD34			CD105			CD105	Hemorragia	Edema	Infamação	Vasos
	Int.	Ext.	Int.	Ext.	Int.	Ext.	Int.	Ext.						
	Int.	Ext.	Int.	Ext.	Int.	Ext.	Int.	Ext.	Ext.					
G3	2 AB	2 AB	0 B	0 B	2 A	3 A	3 A	0,5 B	0,5 B	1 A	1 A	2 A	2AB	
G4	2 AB	2 AB	0 B	0 B	1A	2A	1A	2 AB	2 AB	1 A	1A	1A	2 B	
G5	2 AB	2 AB	0 AB	0 AB	2 A	2 A	2 A	1,5AB	1,5AB	2 A	1 A	1A	2 B	
G6	2 B	2 B	0 B	0 B	2 A	2 A	2 A	1 B	1 B	2 A	1A	1A	2 B	
G7	3A	3A	2 A	2 A	2 A	3 A	3 A	3 A	3 A	1 A	1A	0A	4A	

Quadro 7: resumo das tabelas e dados mais relevantes.

Grupos	Massa MTC		Perimetria à direita	Eletrofisiologia			Walking Track	CatWalk		Força máxima	
	Seção do Sural			Amplitude	IFC	Nervo		Estímulo			
	Direito	Esquerdo	Anestesiado				Latência	IFF	Músculo		
G1	0,94 A a	0,90 A a	49,22 AB	2,02 C	9,66 A	-15,21 A	9,18 A	1,04 AB	0,96 B		
G2	0,24 C a	0,89 A b	37,50 D	5,62 A	0,91 C	-154,86 D	-52,82 B	0,45 D	0,60 C		
G3	0,55 B a	0,87 A b	42,23 CD	2,34 B	8,93 AB	-75,16 C	-35,13 B	0,91 AB	0,96 B		
G4	0,64 B a	0,89 A b	49,84 A	1,96 C	8,86 AB	-82,85 C	-30,15 B	1,06 A	1,24 A		
G5	0,58 B a	0,89 A b	45,40 ABC	2,60 B	7,37 AB	-70,83 BC	-59,98 B	0,69 C	0,90 B		
G6	0,62 B a	0,87 A b	42,46 CD	2,66 B	6,99 AB	-66,18 BC	-35,74 B	0,90 B	0,99 B		
G7	0,68 B a	0,88 A b	44,30 BC	2,30 BC	5,67 B	-31,48 AB	-28,41 AB	1,04 A	1,08 B		
Morfometria em N1											
Morfometria do MTC à direita											
Razão G											
Mielina N1											
Axônio N1											
Área da fibra											
Diâmetro mínimo											
Área											
Diâmetro mínimo											
Espessura											
G1	1909 A	72,49 A	7,48 A	20,16 A	3,60 A	50,51 A	2,11 A	0,48 A	46,91 Aa	234,68 Aa	3275,48 Aa
G2									23,44 C a	117,24 Ca	870,48 Ca
G3	1154 BC	32,98 C	4,96 C	9,79 C	3,55 B	23,19 BC	1,281 B	0,47 A	41,32 Ba	204,59 Ba	2547,94 Ba
G4	1015 BC	30,25 C	4,49 D	9,07 C	2,46 B	21,16 C	1,17 B	0,48 A	42,01 Ba	217,56 ABa	2702,79 Ba
G5	905 C	31,85 C	4,89 C	10,03 B	4,99 B	21,82 C	1,227 B	0,51 A	41,57 Ba	212,69 ABa	2634,43 Ba
G6	1210 BC	39,08 B	5,44 B	11,98 B	3,60 B	27,09 B	1,37 B	0,49 A	41,4 Ba	205,81 Ba	2559,75 Ba
G7	1437 AB	30,36 C	4,75 CD	10,01BC	0,64 B	20,36 C	1,21 B	0,49 A	42,15 Ba	214,06 ABa	2675,17 Ba

Em Hilight (amarelo) os valores estatisticamente semelhantes ao grupo controle (grupo 1) ou os melhores resultados.

Em Hlight (amarelo) os valores estatisticamente semelhantes ao grupo controle (grupo 1) ou os melhores resultados.

Quadro 8 - Marcadores adquiridos para Imunofenotipagem das células tronco, por citometria de fluxo *versus* marca, concentração, nº de catálogo, lote, classe da imunoglobulina e data de vencimento.

Dados referentes aos produtos						
Marcadores Adquiridos para Imunofenotipagem das Células Tronco por Citometria de Fluxo	Marca™	Concentração	Nº catálogo	Lote	Imunoglobulina	Data de vencimento
Cd11b-FITC	BD	0,5mg/ml	554982	3004531	IgA kappa	30/11/2018
CD31-PE	BD	0,2mg/ml	555027	3113793	IgG1K	31/03/2019
CD34-FITC	Biorbyt	0,5mg/ml	Orb15295	A9875	IgG	20/02/2014
CD40-FITC	BD	0,5mg/ml	553723	3030554	IgM K	31/12/2018
CD 44-RPE	Abd Serotec	0,5mg/ml	MCA643PE	INN0812	IgG1	Maio /14
CD45-PE	BD	0,2mg/ml	554878	2320837	IgG1K	30/06/2017
CD71-FITC	BD	0,5mg/ml	554890	16996	IgG2a K	30/04/2017
CD73* GAM-IgGH/L-FITC**	BD	0,5mg/0l	551123	25073	IgG1 K	*29/04/19 ** Maio 14
CD90-PE	BD	0,2mg/ll	551401	2347855	IgG1 K	31/10/2018
CD105-PE	Life technology	0,2mg/ml	A16390	LT18703	IgG2a	24/03/2015
CD106-PE	BD	0,2mg/ml	559229	2359714	IgG1K	28/02/2018
GAM-IgGH/L-FITC	Abd Serotec	2,0 mg/ml	51782404	051112	IgG	Maio /14

Fonte: Arquivo pessoal, 2015, Professora Elenice Deffune, Laboratório de Hematologia da UNESP.

Quadro 9 - Características da cola de fibrina *versus* gel de plaquetas obtidos por lisado plaquetário.

Produto	Plasma pré produção da cola de fibrina	Lisado plaquetário pré formação do gel de plaquetas
Fibrinogênio	75g/dL	12 – 18g/dL
Fibronectina	294µg/mL	42µg/mL
PDGF	500pg/mL	60.000pg/mL
VEGF	<100pg/mL	425pg/mL

Fonte: Arquivo pessoal, 2015, Professora Elenice Deffune, Laboratório de Hematologia da UNESP.

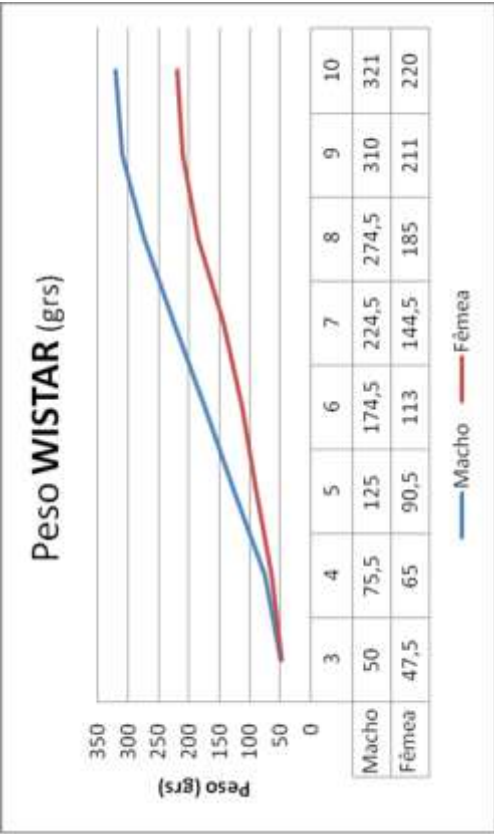
9. Anexo:

Aprovação do projeto pelo Comitê de ética em pesquisa.

 UNESP UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA CAMPUS DE BOTUCATU FACULDADE DE MEDICINA  FMB  CEEA Comissão de Ética em Experimentação Animal  Criada através da Portaria DFM nº 30 de 26/04/99	Certificado	Certificamos que (Protocolo CEEA 878-2011) Células tronco na neurografia látero-terminal. Estudo experimental em ratos, a ser conduzido por Geruza Rezende Paiva, orientada pelo Prof. Dr. Fausto Viterbo de Oliveira Neto, com o apoio técnico de Ednelson Henrique Bianchi, Luiz Carlos Edevalter Bardella e Maria Cecília Salgado Mercadante, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), com a ressalva de que os "ratos" são provenientes de Biotério convencional, sem condições de atestar a Sanidade dos mesmos.	Projeto de Pesquisa aprovado em reunião da CEEA em 28/04/2011.	 Prof.ª Dr.ª Maria Rosa Bet Moraes Silva Presidente da CEEA	 Alberto Santos Capejuppi Secretário da CEEA
---	----------------------	--	---	---	---

Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu - S.P. CEP: 18.618-970 Fone/Fax: (0xx14) 3811-6143 e-mail secretaria: capejuppi@fmb.unesp.br

Peso/Idade Ratos WISTAR			
IDADE (semanas)	PESO Macho(gramas)	PESO Fêmea(gramas)	PESO Fêmea(gramas)
3	50	45 / 50	
4	51 / 100	50 / 80	
5	101 /149	81 / 100	
6	150 /199	101 /125	
7	200 /249	120 /169	
8	250 /299	170 /200	
9	300 /320	201 /220	
10	Acima de 321	Acima de 220	



Retirado de:

Diretoria Técnica de Apoio ao Ensino e Pesquisa Centro de Bioterismo da FMUSP
http://www.bioterio.fm.usp.br/index.php?mpg=03.00.00&tip=RATO&id_animal=17&pes_idade=sim