

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE  
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: CLÍNICA CIRÚRGICA**

**EDUARDO GOLDANI**

**EFEITO DO TACROLIMUS (FK506) APLICADO EM MINIBOMBAS DE  
INFUSÃO OSMÓTICA NA REGENERAÇÃO DO NERVO CIÁTICO DE RATOS  
WISTAR**

**ORIENTADOR: PROF. DR. JEFFERSON BRAGA SILVA**

**PORTO ALEGRE  
2014**

**EDUARDO GOLDANI**

**EFEITO DO TACROLIMUS (FK506) APLICADO EM MINIBOMBAS DE  
INFUSÃO OSMÓTICA NA REGENERAÇÃO DO NERVO CIÁTICO DE  
RATOS WISTAR**

Tese apresentada como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Medicina pelo Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS).

Orientador: Prof. Dr. Jefferson Braga Silva

PORTO ALEGRE

2014

### DADOS DE CATALOGAÇÃO

**G618e** Goldani, Eduardo

Efeito do tacrolimus (FK506) aplicado em minibombas de infusão osmótica na regeneração do nervo ciático de ratos wistar / Eduardo Goldani. Porto Alegre: PUCRS, 2014.

101 f.: il.: tab. Inclui artigo científico submetido para publicação.

**Orientador:** Prof. Dr. Jefferson Braga Silva

Tese (Doutorado) – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde. Área de concentração: Clínica Cirúrgica.

1. LESÃO NERVO PERIFÉRICO. 2. FK506. 3. MINIBOMBA OSMÓTICA. 4. TUBULIZAÇÃO. 5. ESTUDO EXPERIMENTAL, CONTROLADO, COMPARADO E CEGO. I. Silva, Jefferson Braga. II. Título.

**CDD** 612.81

**CDU** 611.98-018.8:599.323.4(043.2)

**NLM** WL 400

EDUARDO GOLDANI

**EFEITO DO TACROLIMUS (FK506) APLICADO EM MINIBOMBAS DE  
INFUSÃO OSMÓTICA NA REGENERAÇÃO DO NERVO CIÁTICO DE  
RATOS WISTAR**

Tese apresentada como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor pelo Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS).

Aprovada em 29 de agosto de 2014.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Luciano Cabral Albuquerque

Profa. Dra. Maria Elisa Calcagnotto

Prof. Dr. Lucas Marques Colomé

Dr. Dyeison Antonow

Orientador: Prof. Dr. Jefferson Braga Silva

PORTO ALEGRE

2014

“Tudo o que um sonho precisa para ser realizado é alguém que acredite que ele possa ser realizado.”

*Roberto Shinyashiki*

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. Dr. Jefferson, pela confiança, apoio e orientação durante todas as etapas desse projeto.

À minha extensa equipe de trabalho através dos (as) alunos (as) de Medicina da PUCRS Alice Cardoso Pellizzari, Cedália Rosane Campos dos Santos, Mariana Dias Curra, Thaís Mariel Andara Beuren, Laura Pletsch Borba e Andressa de Medeiros Pulcherio Tosetto e também da Biomédica Juliana Oliveira Rangel. Sem a participação de vocês, esse projeto certamente não teria chegado ao fim.

Aos acadêmicos de Medicina da UFCSPA Marco Antônio Smiderle Gelain e Thomaz Monteiro Cardoso, também integrantes da equipe de trabalho e responsáveis por todos os procedimentos cirúrgicos. Vocês demonstraram, até precocemente, uma invejável capacidade técnica e conduta profissional para quem, na época, ainda estava no primeiro ano da graduação. Sem a destreza de vocês nos procedimentos cirúrgicos, esse projeto seria afetado diretamente tanto no aspecto qualitativo como quantitativo. Não tenho dúvidas que o futuro de vocês é altamente promissor. Muito obrigado!

Ao Lucas Colomé, Alessandra Sebben, Martina Lichtenfels e Franciele Dietrich que, muito mais do que colegas de Laboratório, tornaram-se grandes amigos e muito auxiliaram em diversos momentos desse projeto.

Ao Gilmar, funcionário do Laboratório de Habilidades médicas e Pesquisa Cirúrgica, pelo imenso auxílio e prestatividade durante todo o projeto.

À Professora Dra. Maria Martha, pelas contribuições ao projeto.

A meus pais Marco Antonio Goldani e Águeda Goldani, que sempre me incentivaram a estudar dando todo tipo de apoio necessário. Muito obrigado pela confiança.

## **SUMÁRIO**

<b>RESUMO</b>	<b>XV</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>XVII</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>19</b>
<b>2. REFERENCIAL TEÓRICO</b>	<b>22</b>
2.1. Histofisiologia do Sistema Nervoso Periférico	22
2.2. Lesões em Nervos Periféricos	28
2.2.1 Classificação das lesões de nervos periféricos	29
2.3. Reparo de lesões em nervos periféricos	31
2.4. Fatores Neurotróficos	34
2.4.1 NGF (fator de crescimento neural)	35
2.4.2 BDNF (fator neurotrófico derivado do cérebro)	36
2.4.3 GDNF (fator neurotrófico derivado de linhagem de célula glial)	36
2.4.4 CNTF (fator neurotrófico ciliar)	36
2.4.5 IGF (fator de crescimento similar à insulina)	37
2.4.6 VEGF (fator de crescimento endotelial vascular)	37
2.4.7 NT-3 (neurotrofina-3)	38
2.4.8 NT-4/5 (neurotrofina-4/5)	38
2.4.9 FK506 (TACROLIMUS)	39
2.5 Minibombas de infusão osmótica	41
<b>3. JUSTIFICATIVA</b>	<b>43</b>
<b>4. OBJETIVOS: GERAL E ESPECÍFICO</b>	<b>44</b>
<b>5. MATERIAS E MÉTODOS</b>	<b>45</b>
5.1. Delineamento Experimental	45
5.2. Cálculo do tamanho da amostra	45
5.3. Animais	45
5.4. Modelo Experimental	46
5.5. Grupos de experimentação	46
5.6. Protocolo Anestésico	46
5.7. Procedimentos Cirúrgicos	47
5.8 Administração do Tacrolimus (FK506)	49

5.9 Avaliação da Recuperação da Lesão	51
5.9.1 Análise Histomorfométrica	51
5.9.2 Teste de Marcha (Walking Track Analysis)	52
5.10 Eutanásia	54
5.11 Análise Macroscópica	55
5.12 Análise Estatística	55
5.13 Aspectos Bioéticos	55
<b>6. RESULTADOS</b>	<b>56</b>
6.1 Análise Funcional por Teste de Marcha	56
6.2 Análise Macroscópica	58
6.3 Análise Morfométrica	62
6.3.1 Perímetro do nervo	62
6.3.2 Área do nervo	65
6.4 Análise Morfológica	68
<b>7. DISCUSSÃO</b>	<b>73</b>
<b>8. CONCLUSÕES</b>	<b>76</b>
<b>9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>78</b>
<b>ANEXO A – CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA PARA USO DOS ANIMAIS</b>	<b>88</b>
<b>ANEXO B – CARTA DE SUBMISSÃO DO ARTIGO CIENTÍFICO</b>	<b>90</b>
<b>ANEXO C – ARTIGO ORIGINAL</b>	<b>91</b>



## **LISTA DE ABREVIATURAS**

FK506 - Tacrolimus

FC – Fatores de crescimento

SNP - Sistema nervoso periférico

SNC - Sistema nervoso central

MEC - Matriz extracelular

SC - Células de Schwann

CsA – Ciclosporina

CpN – Ciclofilina

CaN - Calcineurina

NF-ATn - componente nuclear das células T ativadas do fator nuclear

NF-ATc - componente citoplasmático das células T ativadas do fator nuclear

IL-2 - Interleucina 2

NGF - Fator de crescimento neural

BDNF - Fator neurotrófico derivado do cérebro

GDNF - fator neurotrófico derivado de linhagem de célula glial

IGF - fator de crescimento similar à insulina

CNTF - fator neurotrófico ciliar

VEGF - fator de crescimento endotelial vascular

NT-3 - neurotrofina-3

NT-4/5 - neurotrofina-4/5

trkB - tirosina quinase B

FKBP-12 - proteína 12 ligadora de FK506

FKBP-52 - proteína 52 ligadora de FK506

SFI – índice de função ciática

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>FIGURA 1.</b> Esquema representativo do neurônio.....	<b>24</b>
<b>FIGURA 2.</b> Esquema representativo da estrutura da fibra nervosa.....	<b>25</b>
<b>FIGURA 3.</b> Esquema de corte transversal de nervos periféricos.....	<b>26</b>
<b>FIGURA 4.</b> Representação esquemática da microvasculatura de nervo periférico.....	<b>27</b>
<b>FIGURA 5.</b> Processo de degeneração e regeneração de uma fibra nervosa após uma lesão.....	<b>28</b>
<b>FIGURA 6.</b> Degeneração Walleriana após a lesão.....	<b>31</b>
<b>FIGURA 7.</b> Processo de regeneração nervosa.....	<b>32</b>
<b>FIGURA 8.</b> Mecanismo de ação da Ciclosporina ou Tacrolimus (FK506)	<b>39</b>
<b>FIGURA 9 –</b> Esquema da bomba de pressão osmótica ALZET.....	<b>43</b>
<b>FIGURA 10.</b> Tubo de silicone de 15mm empregado nos grupos controle e sistêmico.....	<b>48</b>
<b>FIGURA 11.</b> Tubo de silicone de 15mm com cateter adaptado para administração local empregado no grupo local.....	<b>48</b>
<b>FIGURA 12.</b> Minibomba ALZET empregada no grupo sistêmico.....	<b>50</b>
<b>FIGURA 13.</b> Minibomba ALZET com cateter interligado ao tubo de silicone empregada no grupo local.....	<b>50</b>
<b>FIGURA 14.</b> Secções transversais do segmento do nervo operado e das regiões proximal e distal ao defeito.....	<b>52</b>
<b>FIGURA 15.</b> Medida da pegada de um rato não lesado.....	<b>53</b>

<b>FIGURA 16.</b> Passarela do teste de marcha.....	<b>54</b>
<b>FIGURA 17.</b> Índice de função ciática segundo o período de avaliação....	<b>57</b>
<b>FIGURA 18.</b> Índice de função ciática segundo o período de avaliação....	<b>57</b>
<b>FIGURA 19:</b> Segmento de nervo ciático regenerado ainda dentro do tubo (grupo controle) .....	<b>58</b>
<b>FIGURA 20:</b> Segmento de nervo ciático regenerado (grupo controle).....	<b>59</b>
<b>FIGURA 21:</b> Segmento de nervo ciático regenerado (grupo controle).....	<b>59</b>
<b>FIGURA 22:</b> Segmento de nervo ciático regenerado (grupo sistêmico)...	<b>60</b>
<b>FIGURA 23:</b> Segmento de nervo ciático apresentando ausência de regeneração a partir de técnica de tubulização (grupo sistêmico).....	<b>60</b>
<b>FIGURA 24:</b> Segmento de nervo ciático regenerado (grupo local).....	<b>61</b>
<b>FIGURA 25:</b> Segmento de nervo ciático regenerado (grupo local).....	<b>61</b>
<b>FIGURA 26.</b> Relação do perímetro ( $\mu\text{m}$ ) em função dos grupos de estudo e da região do nervo.....	<b>64</b>
<b>FIGURA 27.</b> Medida da área ( $\mu\text{m}^2$ ) em função dos grupos de estudo e da região do nervo.....	<b>67</b>
<b>FIGURA 28.</b> Medida da área ( $\mu\text{m}^2$ ) em função dos grupos de estudo e da região do nervo. ....	<b>67</b>
<b>FIGURA 29.</b> Segmento proximal do nervo ciático do grupo controle após 90 dias. ....	<b>68</b>
<b>FIGURA 30.</b> Segmento medial do nervo ciático do grupo controle após 90 dias. ....	<b>69</b>

<b>FIGURA 31.</b> Segmento distal do nervo ciático do grupo controle após 90 dias. ....	<b>69</b>
<b>FIGURA 32.</b> Segmento proximal do nervo ciático do grupo sistêmico após 90 dias. ....	<b>70</b>
<b>FIGURA 33.</b> Segmento medial do nervo ciático do grupo sistêmico após 90 dias. ....	<b>70</b>
<b>FIGURA 34.</b> Segmento distal do nervo ciático do grupo sistêmico após 90 dias. ....	<b>71</b>
<b>FIGURA 35.</b> Segmento proximal do nervo ciático do grupo local após 90 dias.....	<b>71</b>
<b>FIGURA 36.</b> Segmento medial do nervo ciático do grupo local após 90 dias.....	<b>72</b>
<b>FIGURA 37.</b> Segmento distal do nervo ciático do grupo local após 90 dias.....	<b>72</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1.</b> Classificações de Seddon e Sunderland de lesões nervosas. ....	<b>30</b>
<b>TABELA 2.</b> Distribuição dos grupos experimentais.....	<b>46</b>
<b>TABELA 3.</b> Média ( $\pm$ DP) do índice de função ciática (SFI) para comparação entre os grupos controle, sistêmico e local em 30, 60 e 90 dias pós-operatório.....	<b>56</b>
<b>TABELA 4.</b> Média ( $\pm$ DP) do perímetro para comparação entre os grupos controle, sistêmico e local após 90 dias de pós-operatório.....	<b>62</b>
<b>TABELA 5.</b> Valor médio do perímetro ( $\mu\text{m}$ ) nos grupos controle, sistêmico e local.....	<b>63</b>
<b>TABELA 6.</b> Valor médio do perímetro ( $\mu\text{m}$ ) nos segmentos proximal, medial e distal.....	<b>64</b>
<b>TABELA 7.</b> Média ( $\pm$ DP) da área para comparação entre os grupos controle, sistêmico e local após 90 dias de pós-operatório.....	<b>65</b>
<b>TABELA 8.</b> Valor médio da área ( $\mu\text{m}^2$ ) nos grupos controle, sistêmico e local.....	<b>66</b>
<b>TABELA 9.</b> Valor médio da área ( $\mu\text{m}^2$ ) nos segmentos proximal, medial e distal.....	<b>66</b>

## **LISTA DE ANEXOS**

<b>ANEXO A – CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA PARA USO DOS ANIMAIS.....</b>	<b>88</b>
<b>ANEXO B – CARTA DE SUBMISSÃO DO ARTIGO CIENTÍFICO.....</b>	<b>90</b>
<b>ANEXO C – ARTIGO ORIGINAL.....</b>	<b>91</b>

## RESUMO

**Introdução:** Lesões em nervos periféricos são frequentes na prática clínica sendo responsáveis por problemas graves e muitas vezes permanentes como perda de funções motoras, sensitivas, dor aguda e crônica. Embora as técnicas cirúrgicas, fisioterápicas e de diagnóstico tenham evoluído nas últimas décadas, os desfechos clínicos de recuperação nervosa continuam insatisfatórios, o que estimula diversos pesquisadores a buscarem drogas e dispositivos que possam auxiliar na regeneração (NOBLE *et al*, 1998; OLIVEIRA *et al*, 2004). Diversos fatores tróficos, também conhecidos como fatores de crescimento (FC), são utilizados e testados *in vitro* e *in vivo* como uma tentativa de auxiliar a regeneração de nervos periféricos. Essas proteínas atuam diretamente na proliferação e diferenciação de diversos tipos celulares, sendo capazes de promover reparo tecidual e recuperação funcional (BOYD E GORDON, 2003). Dentre eles, destaca-se o FK506 (Tacrolimus), um ligante de imunofilinas com forte efeito imunossupressor que apresenta potenciais ações neurotróficas e neuroprotetoras. Estudos têm mostrado que o FK506 aumenta a taxa de regeneração axonal e também o nível de reinervação necessária após lesão do nervo periférico, além de melhorar a recuperação após lesões no nervo. **Objetivo:** Avaliar *in vivo* a viabilidade e efeito do FK 506 sobre o reparo de lesão de nervo ciático de ratos **Material e Métodos:** Trinta e seis ratos Wistar, machos, adultos foram randomicamente distribuídos em três grupos (I – controle; II – FK506 sistêmico; III – FK506 local;). Para avaliar o efeito dos diferentes tratamentos, o nervo ciático dos animais foi transeccionado criando um defeito de 10mm e, em seguida, tubulizado com câmara de silicone. No grupo controle, nenhum tratamento adicional foi realizado. No grupo sistêmico, o FK506 (dose 0,1mg/kg/dia) foi administrado sistemicamente via minibomba osmótica ALZET enquanto que no grupo local a administração também ocorreu através da minibomba osmótica ALZET, mas adaptada para liberação dentro da câmara de silicone na mesma dose. O tratamento empregado teve duração de 90 dias. **Resultados:** Os dados do presente estudo sugerem que a droga imunossupressora FK506 possui efeito positivo na melhora funcional nervosa e

o uso de minibombas osmóticas é eficaz na dispensação contínua da droga. O dado mais importante dessa pesquisa é que o grau de recuperação funcional, medido através do índice de função ciática após lesão com perda de substância e reparo através de tubulização, é melhor quando o FK506 é administrado localmente se comparado à administração sistêmica em modelos animais. Não foram encontrados outros trabalhos que tenham usado aplicação local da droga com taxa de liberação constante para efeitos de comparação.

**Palavras-chave:** lesão nervo periférico, FK506, minibomba osmótica, tubulização.



## ABSTRACT

**Introduction:** Injuries in peripheral nerves are common in clinical practice being responsible for serious problems and often permanent as loss of motor, sensitive functions, acute and chronic pain. Although surgical, physiotherapy and diagnostic techniques have evolved in recent decades, the clinical outcomes of nerve recovery still unsatisfactory, which encourages many researchers to seek drugs and devices that may help regeneration (NOBLE *et al*, 1998; OLIVEIRA *et al*, 2004). Various trophic factors, also known as growth factors (GF) are used and tested *in vitro* and *in vivo* in an attempt to assist the regeneration of peripheral nerves. These proteins act directly on the proliferation and differentiation of various cell types, being able to promote tissue repair and functional recovery (BOYD AND GORDON, 2003). Among them, we highlight the FK506 (Tacrolimus), a ligand for immunophilins with strong immunosuppressive effect that has potential neurotrophic and neuroprotective actions. Studies have shown that FK506 increases the rate of axonal regeneration and also the level of necessary reinnervation after peripheral nerve injury, besides enhancing recovery from nerve damage.

**Objective:** Evaluating *in vivo* the availability and effect of FK 506 on the repair of injury of rat sciatic nerve. **Material and Methods:** Thirty-six male adult Wistar rats were randomized into three groups (I - control, II - Systemic FK506 III - FK506 site;). To evaluate the effect of different treatments, the sciatic nerve of animals was transected, creating a defect of 10 mm and then tubulized with the silicone chamber. In the control group, no additional treatment was performed. In systemic group, FK506 (dose 0.1 mg/kg/day) was administered systemically via osmotic minipump ALZET while in the local group the administration also occurred through the ALZET osmotic minipump, but adapted to release into the silicone chamber the same dose. The performed treatment lasted 90 days.

**Results:** Data from the present study suggest that the immunosuppressive drug FK506 has a positive effect on the nervous functional improvement and the use of osmotic minipumps is effective in continuous dispensing of the drug. The most important finding of this research is that the degree of functional recovery,

measured by the rate of sciatic function after injury with loss of substance and repair through tubing, it is better when FK506 is administered locally whether compared to systemic administration in animal models. No other studies have used local application of the drug with constant release rate for comparison were found. **Keywords:** peripheral nerve injury, FK506, osmotic mini-pump, tubulization.

## 1. INTRODUÇÃO

Traumatismos por transecção de nervo periférico são comuns e ocorrem frequentemente na prática clínica sendo responsáveis por problemas graves como dor, morbidade, perda de sensibilidade e motricidade nervosa, além de outras seqüelas muitas vezes permanentes. Dentre os danos que diminuem de maneira substancial a qualidade de vida de pessoas que por eles são acometidas, estão incluídas a incapacitação física e a perda total ou parcial de suas atividades produtivas, o que origina importantes consequências sócio-econômicas (NOBLE *et al*, 1998; RODRIGUEZ *et al*, 2004; CHALFOUN *et al*, 2006). Além do altíssimo custo social gerado pelo aumento nas despesas da saúde pública e previdenciária, é importante ressaltar o impacto que lesões desta dimensão são capazes de provocar sobre o indivíduo, seus familiares e na sociedade como um todo (SEBBEN *et al*, 2011).

As lesões completas, com perda de substância, raramente apresentam recuperação sem intervenção cirúrgica e as técnicas atuais de reparação oferecem resultados aleatórios e frequentemente insatisfatórios. Frente a estas limitações, muitos pesquisadores buscam alternativas terapêuticas, como o uso de biomateriais e fatores tróficos, para aperfeiçoar o reparo de nervos periféricos danificados (OLIVEIRA *et al*, 2004; PABARI, *et al*., 2010, DA SILVA e CAMARGO, 2010).

Atualmente, o transplante autólogo de nervo periférico é considerado o padrão ouro no reparo de transecções com perda de substância nervosa. Embora apresente características de histocompatibilidade e capacidade de guiar o crescimento axonal, o enxerto autólogo demonstra algumas limitações, como a necessidade de realização de dois procedimentos cirúrgicos em locais distintos, maior morbidade e a escassez de sítios doadores, e déficit sensitivo resultante na área doadora. (ICHIHARA *et al*, 2008; LICHTENFELS M., 2012)

Nos casos em que a extensão da lesão impossibilita a simples reunião dos cotos, uma técnica de reparo disponível e vastamente empregada é a tubulização. Estudos demonstraram que o tubo de silicone é ideal para a regeneração nervosa obtendo recuperação motora e sensitiva (DAZA et al, 1993; LINDBORG et al, 1997). Essa técnica é um procedimento cirúrgico em que os cotos nervosos seccionados são introduzidos e fixados dentro de uma prótese tubular, objetivando propiciar um ambiente favorável à regeneração. Proporciona, ainda, o direcionamento do crescimento nervoso das extremidades rompidas ou seccionadas, protegendo as fibras nervosas do tecido cicatricial e evitando a formação de neuroma. A tubulização apresenta outra característica interessante: ela pode ser otimizada com acréscimo de fatores regenerativos (SEBBEN et al, 2011).

Os fatores neurotróficos são superregulados e ativados em situações de traumas, e estão fortemente relacionados à regeneração de nervos periféricos. Estes podem atuar diretamente ou indiretamente no processo regenerativo e exercem seus efeitos separadamente, porém podem apresentar efeitos complementares (LICHTENFELS M., 2012).

Diversos fatores tróficos, também conhecidos como fatores de crescimento (FC) são utilizados e testados *in vitro* e *in vivo* como uma tentativa de auxiliar a regeneração de nervos periféricos (SEBBEN et al, 2011). Essas proteínas atuam diretamente na proliferação e diferenciação de diversos tipos celulares, sendo capazes de promover reparo tecidual e recuperação funcional (BOYD E GORDON, 2003).

Melhorias significativas nas taxas de regeneração nervosa poderiam minimizar mudanças na denervação e melhorar a recuperação funcional em longo prazo após lesões nervosas. A droga imunossupressiva FK-506 (Tacrolimus), um ligante de imunofilinas com forte efeito imunossupressor, tem mostrado ter ações neurotróficas e neuroprotetivas em modelos experimentais através do aumento da alongação do nervo lesionado e da aceleração da taxa de regeneração *in vitro* e *in vivo* (RUSTEMEYER et al, 2009) e também o nível

de reinervação necessária após lesão do nervo periférico, além de melhorar a recuperação após lesões no nervo (UDINA *et al*, 2004; MURAOKA *et al*, 1996). Estudos também indicam que o FK-506 influencia no processo de crescimento em neurônios (GOLD *et al*, 1995).

Sistemas convencionais de liberação de drogas apresentam pouco controle no que diz respeito à liberação da droga e quase nenhum controle sobre a concentração efetiva no sítio alvo. Esse tipo de padrão de dosagem pode resultar em constantes mudanças e concentrações plasmáticas imprevisíveis. Drogas podem ser liberadas em um padrão controlado por um longo período de tempo pelo processo de osmose. Dispositivos osmóticos são os sistemas mais promissores para liberação controlada de drogas (GUPTA *et al*, 2011).

Com isto, a utilização da droga imunossupressiva FK-506, juntamente com a técnica de tubulização e dispositivos osmóticos pode se tornar uma alternativa terapêutica promissora no reparo de lesões com perda de substância de nervos periféricos.

Sabe-se que o reparo de nervos requer uma complexa interação entre células, matriz extracelular e FC, e a presença local de diversos fatores tróficos é importante no controle da sobrevivência, migração, proliferação e diferenciação de vários tipos celulares que estão envolvidos na regeneração nervosa (RODKEY e SHARP, 2007). Terapias que utilizam FC vêm recebendo grande atenção nas últimas décadas, sendo amplamente utilizadas em diferentes áreas médicas. Quando combinados com biomateriais, seus efeitos se tornam potencializados, podendo ser incorporados durante a fabricação de tubos sintéticos absorvíveis ou liberados através de minibombas de infusão (GORDON E FU, 1997; TRIA *et al*, 1994; OYELESE *et al*, 1997).

No entanto, na prática experimental, a simples liberação de fatores de crescimento impede a permanência dos mesmos no sítio de lesão devido à rápida difusão destes nos fluidos extracelulares. Essas proteínas possuem

limitações devido a suas curtas meias-vidas biológicas. A intrincada cinética da expressão de fatores tróficos envolvidos na regeneração de nervos é regulada por múltiplos laços de realimentação. Apesar da complexidade dos eventos moleculares durante o reparo tecidual ainda não estar completamente esclarecida, os conhecimentos existentes sobre os mecanismos da cascata que induz a regeneração após a lesão de nervos periféricos fornecem informações importantes para uma melhor concepção de sistemas de liberação de fatores de crescimento (WONGTRAKUL *et al*, 2002).

Embora as técnicas cirúrgicas tenham evoluído nas últimas décadas, os desfechos clínicos de recuperação de nervos periféricos continuam insatisfatórios, estimulando muitos pesquisadores a buscar alternativas terapêuticas com melhores resultados (OLIVEIRA *et al*, 2004). É nesse sentido que esse projeto busca contribuir para, quem sabe, reduzir as lacunas existentes na relação que envolve a lesão de nervo periférico e regeneração com recuperação motora e sensorial.

## **2. REFERENCIAL TEÓRICO**

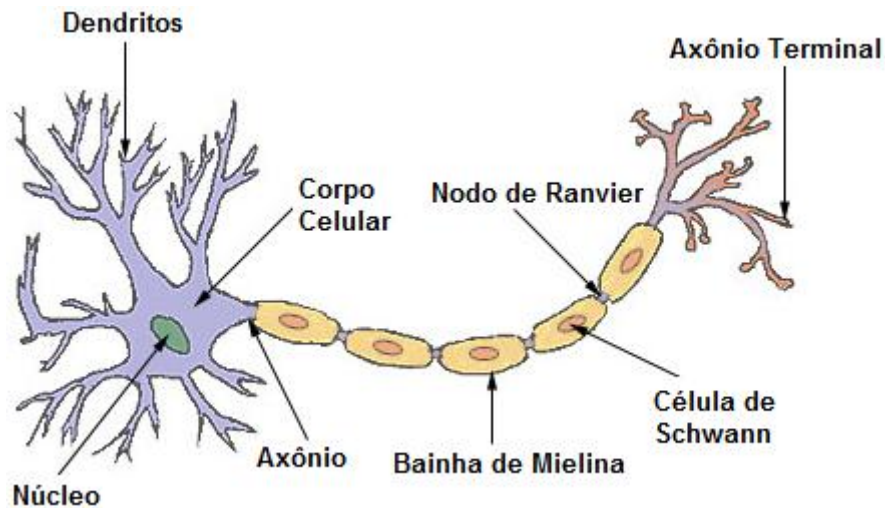
### **2.1. Histofisiologia do Sistema Nervoso Periférico**

O sistema nervoso periférico (SNP) está localizado fora do sistema nervoso central (SNC) e inclui os nervos cranianos, que nascem no encéfalo, os nervos espinhas, que nascem na medula espinhal, e os gânglios associados a eles. Os nervos periféricos são estruturas funcionais responsáveis pela união do sistema nervoso central (SNC) com os órgãos periféricos, constituídas pela união de fibras nervosas motoras, sensitivas e autonômicas, envoltas por tecido conjuntivo ou de sustentação (MACHADO, 1998; MURRAY, 2005). Esta estrutura é capaz de propagar o potencial de ação através da sua extensão, por meio de um complexo conjunto de canais iônicos de membrana (MURRAY, 2005). As informações sensitivas são transmitidas da periferia para o SNC (via aferente), e os sinais de motricidade percorrem o sentido contrário (via eferente) (LANDON E HALL, 1976).

Os nervos do sistema nervoso periférico são formados por axônios, células não-neuronais e componentes da matriz extracelular (MEC). Como componentes da MEC estão o colágeno, fibronectina e laminina, fundamentais para a orientação e crescimento axonal durante o processo de regeneração nervosa, que ocorre do coto proximal em direção ao coto distal. Dentre os vários tipos celulares, as células de Schwann (SC) são as principais constituintes do SNP, sendo raramente encontradas no SNC. Estas células migram da crista neural e apresentam como principal função a mielinização dos axônios (SEIM III, 2002).

O axônio é uma extensão longa e delgada do corpo celular, capaz de transportar informações químicas e elétricas a longas distâncias. Esses podem ser mielinizados ou não-mielinizados. Os axônios mielinizados são envoltos por uma estrutura tubular com múltiplas camadas (bainha de mielina) originadas pelas células de Schwann. As SC estão separadas entre si ao longo dos axônios por intervalos destituídos de mielina e parcialmente cobertos por digitações laterais do seu citoplasma. Tais espaços são denominados Nodos de Ranvier (PETERS *et al*, 1976).

A bainha de mielina é formada pela diferenciação da membrana plasmática da própria SC. Possui como característica estrutural a alta concentração lipídica e poucas proteínas. Tendo-se em vista sua natureza lipídica, esta bainha atua como um isolante, permitindo a rápida propagação dos potenciais de ação dos neurônios (Figura 1) ao órgão alvo. Os axônios não-mielinizados estabelecem ligações com as SC por meio de projeções citoplasmáticas que os envolvem total ou parcialmente, sendo agrupados em números que variam de 5 a 25 axônios. Nesta associação com as SC não há bainha de mielina (GARTNER E HIATT, 2006; LANDON E HALL, 1976).

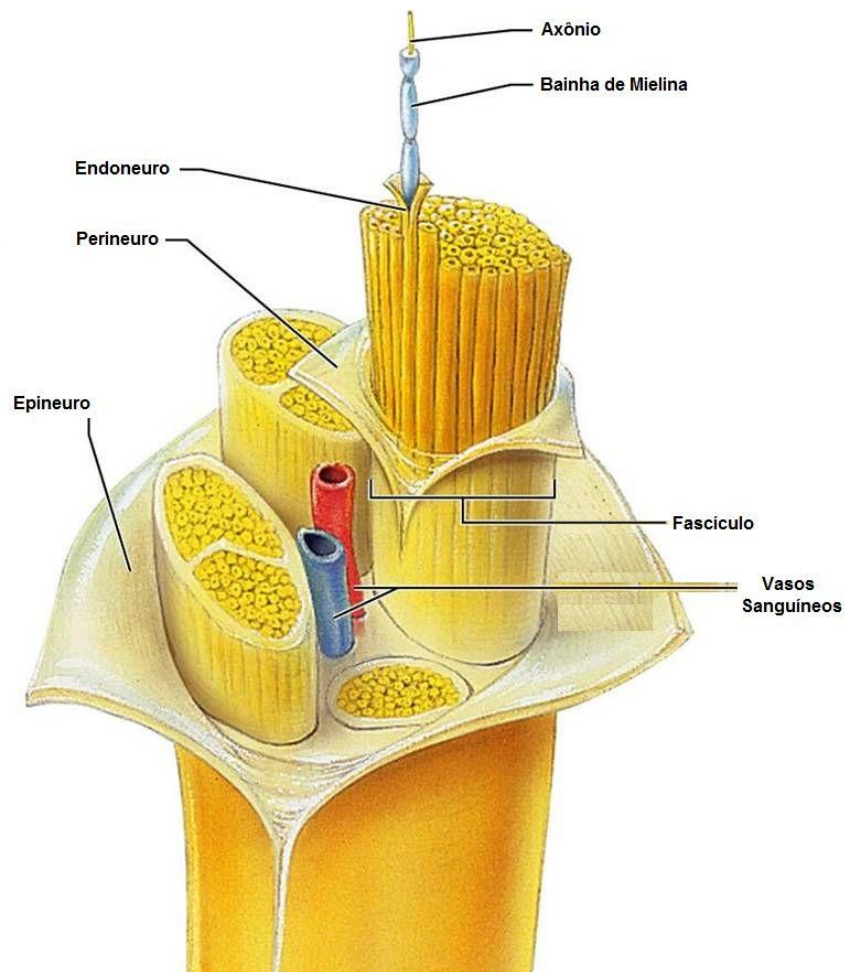


**FIGURA 1.** Esquema representativo do neurônio.

**Fonte:** Adaptado de <http://www.web-books.com/eLibrary/Medicine/Physiology/Nervous/Nervous.htm> Acessado em 03/06/2003.

O axônio, juntamente com a bainha de mielina, constitui a fibra nervosa (Figura 2). Estas fibras são circundadas por três camadas de tecido conjuntivo. A camada mais externa, formada por tecido conjuntivo colagenoso denso não-modelado, é denominada como **epineuro** e possui vasos, fibroblastos e fibras de colágeno tipo I. A camada média – **perineuro** - apresenta células pavimentosas dispostas em camadas concêntricas em relação às fibras nervosas, podendo ser observadas a presença de fibras de colágeno tipo I e III. O perineuro cobre individualmente cada feixe de fibra nervosa (fascículos) e é essencial na manutenção da homeostase do nervo, atuando como uma barreira seletiva ao trânsito de substâncias com alto peso molecular. A camada mais interna de tecido conjuntivo, que reveste individualmente cada fibra nervosa (axônios), é chamada de **endoneuro** e é composta por fibras de colágeno tipo III dispostas longitudinalmente em relação à fibra nervosa. No endoneuro é possível encontrar células residentes como macrófagos, fibroblastos e eventualmente mastócitos (LINDBORG, 1993; PETERS *et al*, 1976; MATTAR JÚNIOR E AZZE, 1999).

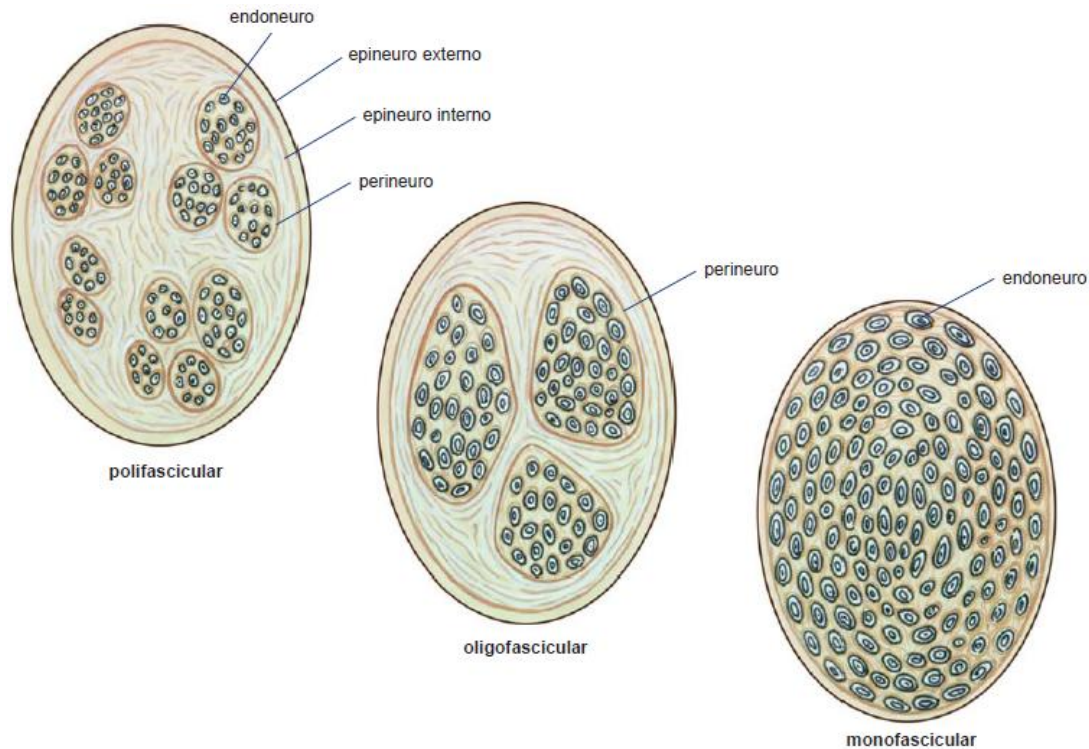




**FIGURA 2.** Esquema representativo da estrutura da fibra nervosa.

Fonte: adaptado de <http://faculty.irsc.edu/FACULTY/TFischer/AP1/nerve%20structure.jpg> Acessado em 08/01/2011.

É importante ressaltar que estas estruturas de tecido conjuntivo que “envelopam” as distintas camadas no nervo periférico apresentam variação ao longo da fibra. Assim, nas regiões proximais ao longo do comprimento do nervo encontra-se geralmente uma estrutura monofascicular (contendo fibras nervosas motoras e sensitivas misturadas), enquanto nas regiões mais distais, próximo ao órgão ou região terminal, observa-se um arranjo polifascicular (com subunidades motoras e sensitivas separadas) (PABARI, et al., 2010; RODKEY e SHARP, 2007) (Figura 3).

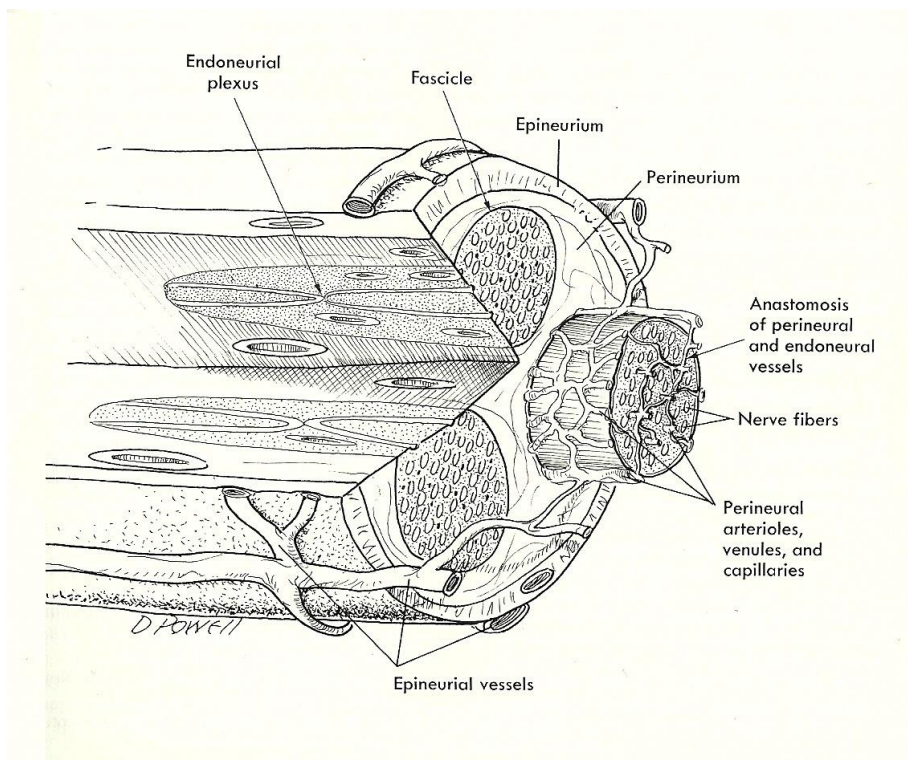


**FIGURA 3.** Esquema de corte transversal de nervos periféricos demonstrando o epineuro externo, epineuro interno, perineuro e endoneuro. Na figura, à esquerda observa-se um nervo polifascicular, na central oligofascicular e na direita monofascicular. Fonte: Mattar Júnior e Azze, 1999.

O suprimento sanguíneo microvascular para os nervos periféricos apresenta-se bem desenvolvido e se origina a partir de veias e artérias vizinhas de grande calibre, bem como dos vasos periosteais e musculares adjacentes. Os ramos desses vasos dividem-se em ascendentes e descendentes e quando alcançam o epineuro fazem anastomose com o sistema intrínseco. Esse sistema é composto por plexos epineurais, perineurais e endoneurais juntamente com seus vasos comunicantes (PABARI, et al., 2010; SHORES, 1996). Esse sistema microvascular possui uma grande capacidade de reserva para compensar a mobilização ou lesão dos vasos regionais locais. No epineuro, vasos orientados longitudinalmente exibem um padrão característico, ou seja, os vasos estão presentes em todas as camadas epineurais, bem como entre os feixes fasciculares e camadas profundas do nervo (Figura 4). A importância da vascularização dos nervos periféricos se deve ao fato dos axônios dos nervos periféricos serem vulneráveis a isquemia pela grande

distância que existe entre o corpo neuronal e a extensão do axônio (PACHIONI, 2006; DURÁN e MARISCANO, 1979).

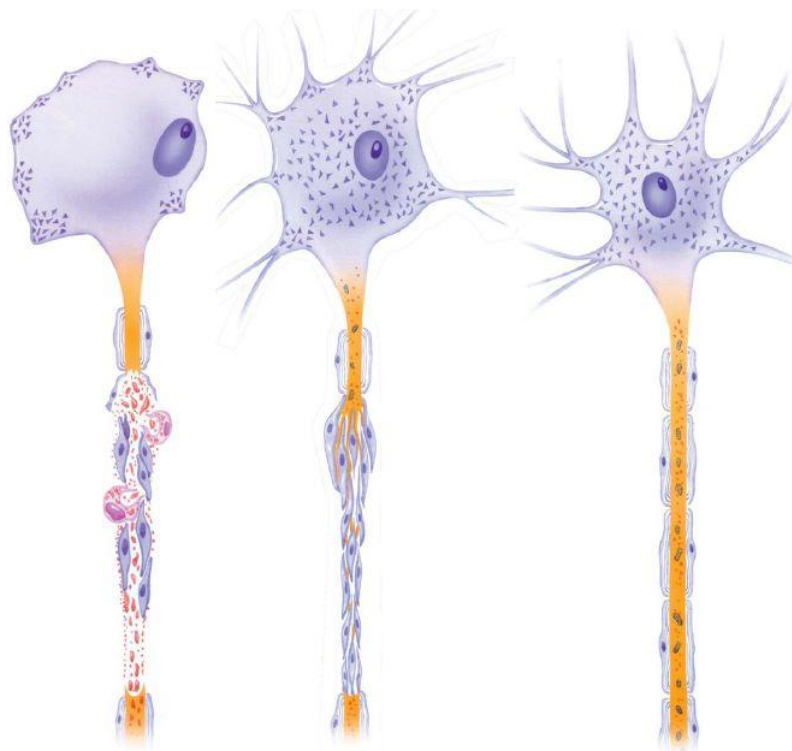
Dentre as estruturas que compõe o sistema nervoso periférico, o ciático apresenta-se como o maior nervo em diâmetro. É um nervo misto (sensitivo e motor) formado pela união das raízes ventrais dos segmentos L4 a S3 em humanos e L6 a S1-S2 em cães (existem mais variações nas outras espécies animais) emergindo da pelve através do forame isquiático maior e continuando seu trajeto entre o trocânter maior do fêmur e a tuberosidade isquiática ao longo da face dorsal da coxa (cranial aos músculos bíceps femoral e semitendinoso) (SHELL, 2008; VICENTE et al., 2007; SEIM III, 2005; VLOKA et al., 2001). Segue seu trajeto até o terço femoral distal onde se divide em dois grandes ramos denominados nervos tibial e nervo fibular comum (FONSECA, 2002; VLOKA et al., 2001). Sua lesão acomete os músculos bíceps femoral, semitendinoso e semimembranoso, levando a perda da sensibilidade na região lateral abaixo do joelho. (TAYLOR, 2006).



**FIGURA 4.** Representação esquemática da microvasculatura demonstrada em corte transeccional e sagital de nervo periférico. Observar a disposição vascular e suas microanastomoses. Fonte: Durán e Mariscano, 1979.

## 2.2 Lesões em Nervos Periféricos

Após uma lesão nervosa, as SC adquirem características proliferativas e fagocíticas, tornando-se vitais no processo de degeneração Walleriana. Em nervos denervados, essas células alinham-se longitudinalmente formando colunas conhecidas como “bandas de Büngner” (Figura 5), constituindo uma lâmina basal que induz e auxilia o crescimento axonal através de fatores neurotróficos. Além da importante função estrutural, atuando como condutores físicos no direcionamento do crescimento axonal, essas células também servem de interface entre os axônios e a MEC, sintetizando elementos como proteoglicanas, colágenos e fatores neurotróficos (MIRSKY E JESSEN, 2001; THOMAS, 1964; ZOCHODNE, 2000).



**FIGURA 5.** Processo de degeneração e regeneração de uma fibra nervosa após uma lesão. Observar o processo de cromatólise no corpo celular, a divisão das células de Schwann e a progressão do cone de crescimento do axônio. Divisão das células de Schwann (bandas de Büngner) (esquerda), Cones de crescimento (centro) e Neurônio regenerado (direita). Fonte: Mattar Júnior e Azze, 1999.

### *2.2.1 Classificação das lesões de nervos periféricos*

O tempo e o sucesso do processo de reparo de nervo depende da extensão da lesão. Clinicamente, um sistema que correlaciona as mudanças microscópicas que ocorrem após uma lesão nervosa e os sintomas do paciente auxiliam na identificação do tipo de lesão. Esses sistemas podem fornecer um prognóstico razoavelmente preciso de um tipo particular de lesão. Existem dois tipos de classificação que são comumente empregadas (Tabela 1) para lesão de nervo periférico. Tais classificações foram propostas por Seddon e Sunderland (OSBOURNE, 2007; CAMPBELL, 2008; LEE E WOLFE, 2000)

Seddon classificou as lesões nervosas em três grandes grupos: neuropraxia, axonotmese e neurotmeze. Na neuropraxia, o nervo está intacto, mas não consegue transmitir impulsos. É caracterizada por dano na bainha de mielina, geralmente devido à compressão. A continuidade do axônio é preservada e o nervo não passa por degeneração distal. Na axonotmese, o axônio é danificado ou destruído, mas grande parte da estrutura do tecido conectivo é mantida. É definida como a perda da continuidade dos axônios com preservação variável dos elementos do tecido conectivo do nervo. Já a neurotmeze, o tronco do nervo é rompido e não há continuidade anatômica. Grande parte da estrutura do tecido conectivo é perdida ou severamente distorcida. É o tipo de lesão mais grave equivalente à ruptura fisiológica de todo o nervo. Pode incluir ou não transecção nervosa (CAMPBELL, 2008; LEE E WOLFE, 2000)

Sunderland, após, refinou essa classificação baseado na realização de que lesões axonotméticas têm diversos prognósticos variáveis. Ele dividiu o grupo axonotmese de Seddon em três tipos, dependendo do grau de envolvimento do tecido conectivo. Neuropraxia equivale à lesão tipo 1 (primeiro grau) de Sunderland. Completa recuperação após a lesão que pode durar de semanas a meses. Na lesão tipo 2 (segundo grau), o endoneuro, perineuro e epineuro ainda estão intactos, mas os axônios estão fisiologicamente rompidos. Devido ao fato de o epineuro ainda estar intacto, os axônios regenerativos são

direcionados ao longo do seu curso original e uma completa recuperação funcional pode ocorrer. O tempo de recuperação depende do nível da lesão, uma vez que o axônio deve ser regenerado distalmente para o órgão final. Na lesão tipo 3 (terceiro grau), o endoneuro também é rompido, mas o perineuro e o epineuro permanecem intactos. A recuperação é incompleta nesse tipo de lesão. Na lesão tipo 4 (quarto grau), somente o epineuro permanece intacto. Lesão neuronal retrógrada e fibrose intrafascicular é intensificada, o que permite apenas uma recuperação mínima. Esse tipo de lesão exige uma excisão do segmento danificado e reparo cirúrgico ou reconstrução do nervo. A neurotmeze (partição completa do nervo) é equivalente à lesão tipo 5 (quinto grau) de Sunderland e a recuperação espontânea é insignificante. Embora a classificação de Sunderland forneça uma descrição concisa e anatômica da lesão nervosa, a utilidade clínica desse sistema é discutível. Muitas lesões não podem ser classificadas em um simples grau. Lesões nervosas combinadas, nas quais todas as fibras são afetadas, mas variando os graus são comuns entre as lesões de nervos periféricos (LEE E WOLFE, 2000).

**TABELA 1.** Classificações de Seddon e Sunderland de lesões nervosas (Adaptado de CAMPBELL, 2008; LEE E WOLFE, 2000).

<b>Seddon</b>	<b>Sunderland</b>	<b>Características Patofisiológicas</b>
Neuropraxia	Tipo 1 (Primeiro grau)	Dano local na mielina geralmente devido à compressão (desmielinização segmentar).
Axonotmeze	Tipo 2 (Segundo grau)	Perda da continuidade dos axônios; endoneuro, perineuro e epineuro intactos (ótimas circunstâncias para regeneração).
Axonotmeze	Tipo 3 (Terceiro grau)	Perda de continuidade dos axônios e endoneuro; perineuro e epineuro intactos (arranjo fascicular preservado).
Axonotmeze	Tipo 4 (Quarto grau)	Perda de continuidade dos axônios, endoneuro; perineuro e fascículos. Epineuro intacto (neuroma em progressão).
Neurotmeze	Tipo 5 (Quinto grau)	Perda de continuidade de todo o tronco do nervo (rompimento fisiológico completo de todo o tronco do nervo).

### 2.3. Reparo de lesões em nervos periféricos

Quando um nervo periférico é seccionado ou comprimido, os axônios do local da lesão são desconectados dos respectivos corpos celulares e começam a degenerar, ocasionando a retração do nervo que passa a apresentar um coto proximal e um coto distal (PETERS *et al*, 1976).

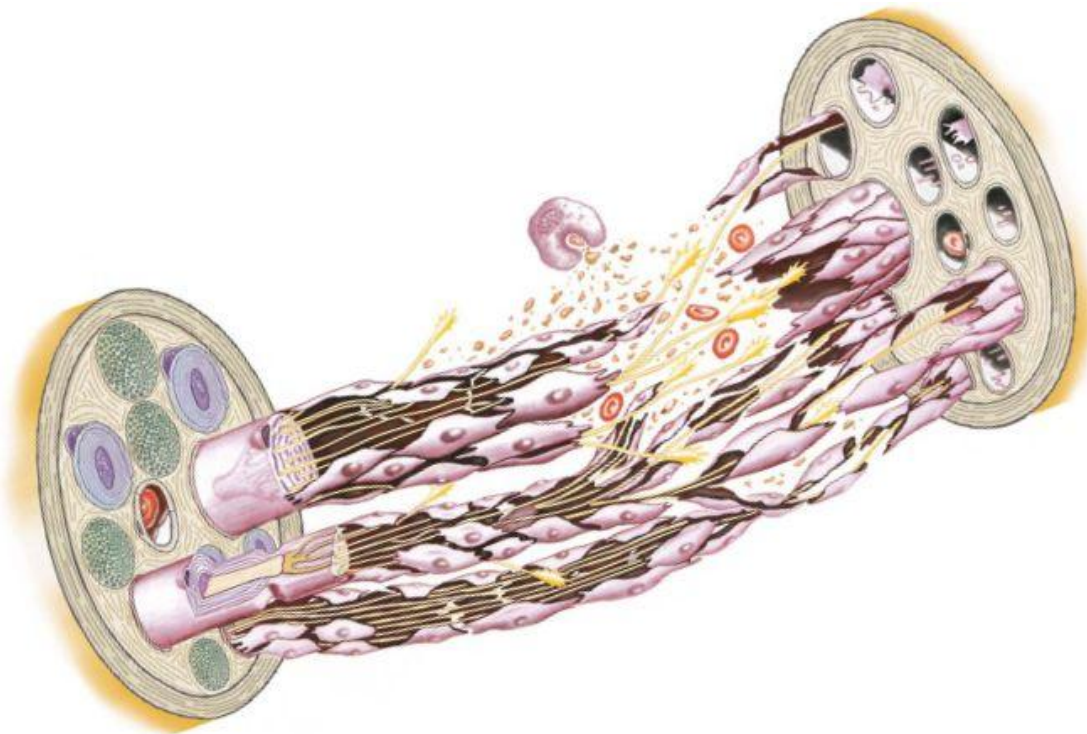
No coto proximal, o corpo celular entra em cromatólise (Figura 6), ou seja, há dissolução dos corpúsculos de Nissl, deslocamento do núcleo para a periferia e aumento do volume do corpo celular. Além disso, há um aumento do retículo endoplasmático rugoso, responsável pela produção de moléculas de reparo (WONGTRAKUL, 2002).



**FIGURA 6.** À esquerda, neurônio normal e, à direita, reação do corpo celular (cromatólise) e degeneração Walleriana após a lesão. Fonte: Mattar Júnior e Azze, 1999.

No coto distal ocorre um processo conhecido como degeneração Walleriana. Devido à interrupção do contato com o corpo celular, a ausência de

suporte trófico e o aumento da entrada de íons cálcio ( $\text{Ca}^{+2}$ ) nas fibras axoniotomizadas, inicia o processo de degeneração do coto distal com a fragmentação da bainha de mielina e dos axônios (LUNN *et al*, 1990). As SC e os macrófagos que são recrutados para o local da lesão, atuam na fagocitose dos fragmentos de mielina e de neurofilamentos dos axônios em degeneração, o que proporciona um microambiente favorável ao crescimento e orientação axonal, fundamental ao processo regenerativo (Figura 7).



**FIGURA 7.** Processo de regeneração nervosa. Observar a divisão das células de Schwann formando as bandas de Büngner, a fagocitose por células do sistema retículo endotelial (macrófagos), brotamento axônico e os cones de crescimento. Fonte: Mattar Júnior e Azze, 1999.

Durante a degeneração Walleriana, as SC liberam citocinas como interleucina (IL) IL-1, IL-6 e IL-8, intimamente envolvidas no recrutamento de leucócitos. Os macrófagos também secretam fatores de crescimento e citocinas como IL-1, IL-6 e IL-12, que agem como fatores quimiotáticos para as SC (ZOCHODNE, 2000; KIEFER *et al*, 2001; RUTKOWSKI *et al*, 1999). As SC, macrófagos e fibroblastos passam a apresentar características relacionadas à proliferação e migração celular tanto no coto proximal quanto no distal (CHENG E ZOCHODNE, 2002).



Há casos em que, apesar da grande capacidade regenerativa do SNP, a extensão da lesão impossibilita a simples reunião dos cotos. Uma técnica de reparo disponível e frequentemente empregada nessa situação é a tubulização (BRAGA-SILVA, 1999), que pode ser otimizada com a adição de fatores neurotróficos e componentes da MEC. A literatura especializada cita numerosas alternativas cirúrgicas passíveis de serem empregadas na reparação de nervo periférico. Dentre elas, ressalta-se a neurorrafia epineural, a neurorrafia fascicular, a neurorrafia epineural-fascicular combinada, os enxertos nervosos (SHORES, 1996), a aplicação de adesivos de fibrina, a utilização de células-tronco autólogas de medula óssea (COLOMÉ, 2008), a utilização do plasma rico em plaquetas (BRAGA-SILVA *et al*, 2006; SARIGUNEY *et al*, 2008) e as técnicas de tubulização com câmaras constituídas a partir de diferentes materiais (OLIVEIRA *et al*, 2004; ELY e CALTEUX, 1983; LABRADOR *et al*, 1998; PINEDO, 2001).

Nos casos em que há perda de substância nervosa, a técnica mais indicada é o transplante de enxerto autólogo, sendo considerado o padrão ouro. Entretanto, este apresenta limitações como a necessidade de uma segunda intervenção cirúrgica no paciente, morbidade e escassez de sítios doadores de nervo, além do déficit sensitivo resultante no local de retirada (ICHIHARA *et al*, 2008).

Diversos biomateriais e novas moléculas são constantemente pesquisados e utilizados para auxiliar a regeneração nervosa. O foco principal destas pesquisas está na busca por alternativas que ofereçam os mesmos benefícios do enxerto autólogo, porém livre de suas desvantagens. Com base nos princípios da bioengenharia, que conceituam o processo de reparo nervoso como um conjunto de interações que envolvem uma série de elementos celulares e mediadores químicos, a utilização de câmaras de orientação, conectadas às extremidades proximal e distal do nervo lesado para direcionar a regeneração axonal, apresenta-se como uma alternativa terapêutica promissora para o reparo de nervos periféricos. Essas câmaras de orientação podem ser feitas de materiais biológicos ou sintéticos. Quando é de natureza

sintética, o biomaterial pode ser não absorvível (tubo de silicone) ou biodegradável, sendo este último vantajoso, pois nenhum resíduo do material permanece no organismo do hospedeiro após ter desempenhado sua função (SCHMIDT E LEACH, 2003).

Quando os biomateriais são polímeros combinados com fatores neurotróficos, podem fornecer um microambiente que estimula o processo de regeneração nervosa (LEE *et al*, 2003).

#### 2.4. Fatores Neurotróficos

Fatores neurotróficos (ou fatores de crescimento) são polipeptídios que melhoram e sustentam o crescimento e reparo de células nervosas e fibras. Seus efeitos na regeneração dos sistemas nervosos periféricos e central vêm sendo amplamente estudados nos últimos anos (BOYD E GORDON, 2003; The Neural Repair Institute, 2013). Os fatores neurotróficos podem ser classificados em duas classes. A primeira classe inclui a família das neurotrofinas como, por exemplo, o fator de crescimento neural (NGF), fator de crescimento derivado do cérebro (BDNF), neurotrofina-3 (NT-3) e neurotrofina-4/5 (NT-4/5). Na segunda classe estão outros fatores igualmente importantes como o fator neurotrófico derivado de linhagem de célula glial (GDNF), fator neurotrófico ciliar (CNTF), e fator de crescimento ácido e básico de fibroblastos (aFGF, bFGF) (The Neural Repair Institute, 2013). Os nervos degenerados são uma fonte importante destes fatores, assim como as SC. (BOYD E GORDON, 2003).

O sucesso da regeneração de nervo periférico requer as melhores condições possíveis tanto no macroambiente como no microambiente. Muitos métodos vêm sendo usados para melhorar o macroambiente para a regeneração nervosa. Entretanto, sabe-se pouco sobre o microambiente e, em particular, as complexas interações neuroquímicas envolvidas. Diversos fatores neurotróficos têm mostrado desempenhar um papel trófico importante no

desenvolvimento, manutenção e regulação da função neuronal (Yin *et al.*, 1998).

Fatores neurotróficos também afetam as células de Schwann no coto distal do nervo, incluindo a promoção da migração de células de Schwann (YOSHINORI, 2012). A presença local dos FC é importante no controle da sobrevivência, migração, proliferação e diferenciação de vários tipos celulares que estão engajados no reparo de nervos. Por esses motivos, a utilização de terapias baseadas em FC tem aumentado nas últimas décadas. A entrega de fatores de crescimento para regeneração de nervos pode ser idealmente combinada com condutos nervosos (SEBBEN *et al*, 2011).

Embora esteja claro que os fatores neurotróficos possam promover uma grande variedade de respostas neurais, respostas *in vivo* podem ser afetadas significativamente pela técnica de liberação empregada (The Neural Repair Institute, 2013).

Abaixo serão listados alguns desses fatores e os motivos que levam a serem empregados em estudos envolvendo regeneração nervosa

#### 2.4.1 NGF (fator de crescimento neural)

O primeiro fator de crescimento neuronal a ser descoberto, e o protótipo para o conceito de fatores neurotróficos, é o NGF (do inglês *nerve growth factor* – NGF), que é específico para um subconjunto de neurônios sensoriais primários e para neurônios do sistema nervoso simpático (TERENGHI, G. 1999).

O fator de crescimento neural é o fator mais pesquisado, devido à sua ação na proliferação e diferenciação de neurônios e por auxiliar o reparo e a recuperação funcional de nervos injuriados. Quando combinado com biomateriais e com liberação controlada, seu efeito pode ser potencializado. Em estudos experimentais confirmou-se a capacidade do NGF de promover a recuperação funcional após lesão (SEBBEN *et al*, 2011).

#### 2.4.2 BDNF (fator neurotrófico derivado do cérebro)

O fator neurotrófico derivado do cérebro (do inglês *Brain-derived neurotrophic factor* - BDNF) é um membro da família das neurotrofinas e tem um papel importante na manutenção e formação de sinapses neuronais no cérebro. Células gliais expressam e reagem ao estímulo do BDNF favorecendo a percepção do seu papel crucial em neuroproteção. O BDNF ajuda a manter o tamanho do neurônio cortical e a estrutura do dendrito, além de potencializar a regeneração axonal *in vitro* e promover o brotamento axonal a partir da extremidade proximal de nervos seccionados para dentro de cotos dos nervos denervados. Células de Schwann modulam o nascimento axonal liberando BDNF, promovendo assim a regeneração nervosa. BDNF é uma molécula sinalizadora crucial entre a microglia e neurônios em dores neuropáticas (YOSHINORI, 2012; YATES *et al*, 2004).

#### 2.4.3 GDNF (fator neurotrófico derivado de linhagem de célula glial)

O fator neurotrófico derivado de linhagem de célula glial (do inglês *glial cell line-derived neurotrophic factor* – GDNF) é considerado o fator mais protetor para neurônios motores (HENDERSON *et al*, 1994), sendo fundamental na sua formação, assim como de neurônios sensitivos durante o processo de regeneração (HOKE *et al*, 2003). O GDNF tem sua expressão elevada em modelos experimentais de neuropatias motoras em ratos, várias neuropatias humanas e em nervos humanos traumatizados (HOKE *et al*, 2003).

#### 2.4.4 CNTF (fator neurotrófico ciliar)

O fator neurotrófico ciliar é uma citocina neuroativa que se sobrepõe consideravelmente com a neurotrofina em termos de especificidade neuronal, embora sua localização celular, estrutura de receptores e caminhos de sinalização sejam distintos daqueles da família das neurotrofinas. O CNTF encontra-se presente de maneira abundante em nervos periféricos normais,

sendo localizado principalmente no citoplasma de células de Schwann mielinizadas. O mecanismo de liberação do fator neurotrófico ciliar a partir das células de Schwann ainda não está claro uma vez que a proteína carece da sequência de sinal geralmente associada com proteínas secretadas. O papel do CNTF permanece desconhecido e vem sendo especulado que o CNTF pode agir como um “fator de lesão”, sendo liberado pelas células gliais em resposta à lesão (TERENGHI, G. 1999).

#### 2.4.5 IGF (fator de crescimento similar à insulina)

De modo semelhante, o fator de crescimento similar à insulina (do inglês *insulin-like growth factor* – IGF) também auxilia na regeneração de nervos. O IGF-1 está presente em vários estágios do desenvolvimento do sistema nervoso periférico, exercendo uma grande variedade de funções, dentre elas a promoção da regeneração dos axônios sensitivos e motores. Evidências sugerem que níveis elevados de IGF em músculo denervado podem estimular a regeneração com brotamento do nervo (SEBBEN *et al*, 2011).

#### 2.4.6 VEGF (fator de crescimento endotelial vascular)

O fator de crescimento endotelial vascular (do inglês *vascular endothelial growth factor* – VEGF), além de atuar essencialmente no tecido vascular, também auxilia a regeneração de nervos, devido à estreita relação existente entre as fibras nervosas e os vasos sanguíneos durante esse processo. A adição de VEGF aumenta significativamente a infiltração de vasos sanguíneos em câmaras de condução nervosa, estando relacionada ao aumento da regeneração axonal e migração de SC. Além disso, o VEGF atua como neuroprotetor em neurônios *in vitro* após lesão isquêmica. Em trabalho experimental o uso de VEGF demonstrou efeito sobre o suprimento vascular, com um aumento significativo da regeneração axonal e de SC, estimulando a regeneração nervosa (SEBBEN *et al*, 2011).

#### 2.4.7 NT-3 (neurotrofina-3)

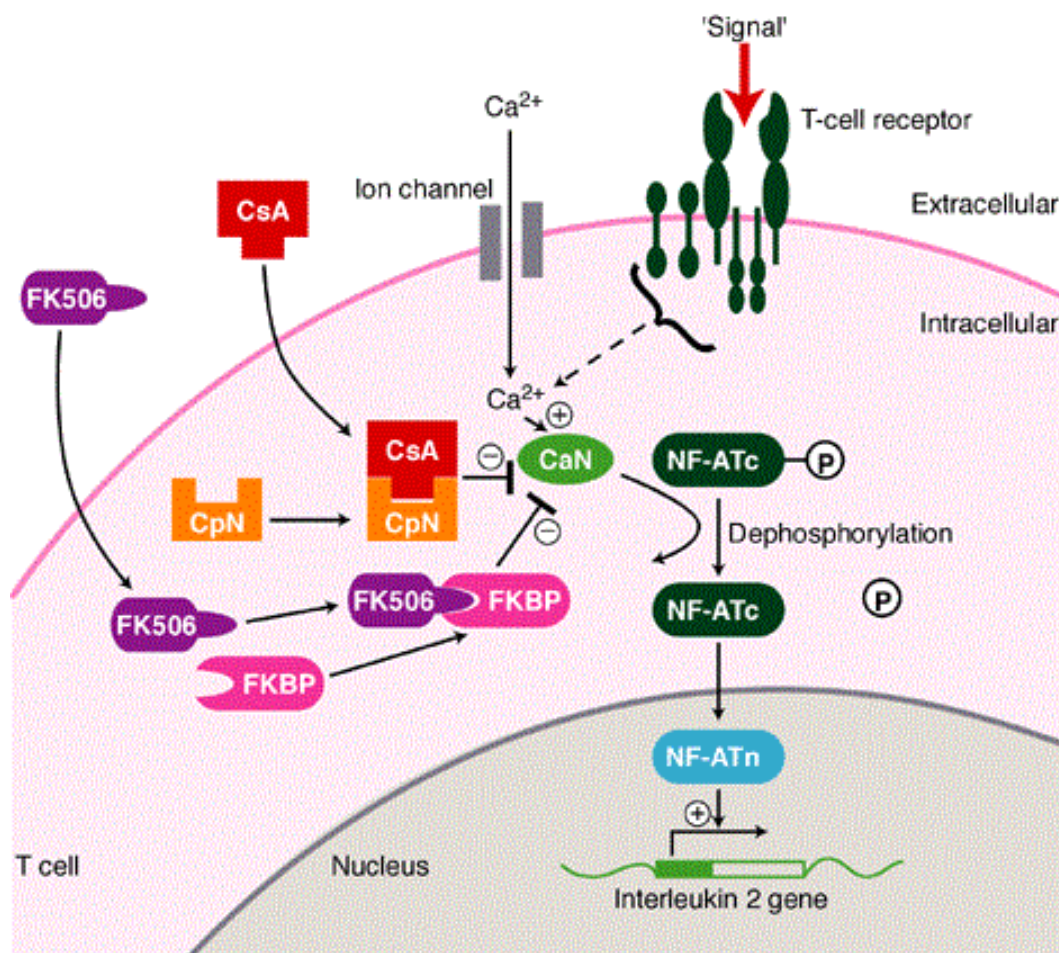
A neurotrofina-3 (NT-3) tem mostrado vários efeitos na regeneração nervosa motora, incluindo a diferenciação de motoneurônios a partir de células progenitoras do tubo neural de aves e sobrevivência de motoneurônios adultos e neonatais *in vitro* e motoneurônios neonatais *in vivo*, embora a evidência seja, às vezes, contraditória. Em motoneurônios embrionários, a NT-3 melhora o número e o comprimento de neurônios, a densidade de placas terminais por músculo da fibra, e a quantidade de inervação muscular. A NT-3 também desenvolve um papel na maturação funcional de sinapses neuromusculares e regula o fenótipo colinérgico de motoneurônios em desenvolvimento. Além do mais, a NT-3 é internalizada e retrogradamente transportada a partir da periferia para corpos celulares motoneuronais. Sendo assim, há evidências experimentais e circunstanciais que sugerem que a NT-3 pode desempenhar um papel em motoneurônios adultos, embora dados *in vivo* do efeito de sobrevivência da NT-3 em motoneurônios adultos ainda não existam (STERNE *et al*, 1997).

#### 2.4.8 NT-4/5 (neurotrofina-4/5)

O crescimento de axônios em regeneração é drasticamente comprometido se o ambiente através do qual eles devem crescer for deficiente tanto em BDNF quanto a neurotrofina 4/5 (NT-4/5). Aplicação de ambas moléculas no momento do reparo cirúrgico de nervos periféricos seccionados resulta em uma melhora do crescimento desses axônios. O caminho de sinalização da neurotrofina poderia sustentar esse argumento. O RNA<sub>m</sub> tanto para o BDNF quanto para a NT-4/5 é regulado nas células de Schwann no coto distal, mas não no coto proximal, uma semana após a transecção nervosa, e eles podem promover a regeneração axonal ligando-se aos receptores trkB (tirosina quinase B) nos neurônios em processo de regeneração (ENGLISH *et al*, 2006).

### 2.4.9 FK506 (TACROLIMUS)

FK506 é uma molécula aprovada pelo FDA (*Food and Drug Administration*) que normalmente é utilizada como imunossupressora para a prevenção de rejeição em aloenxertos. A FK506 sozinha é inativa e necessita ligar-se a uma proteína 12 ligadora de FK506 (FKBP-12) para ser ativada (Figura 8). Esse complexo FK506-FKBP inibe a atividade da calcineurina (ou serina/treonina proteína fosfatase 2B), base da ação imunossupressora da FK506. A FK506 atravessa a barreira hematoencefálica, e a descoberta de que há imunofilinas (como a FKBP-52) presentes no sistema nervoso introduz um novo nível de complexidade na regulação da função neuronal (RUSTEMEYER *et al*, 2010; JIFENG *et al*, 2010; GOLD, 1997, YU *et al*, 2009).



**FIGURA 8.** Mecanismo de ação da Ciclosporina ou Tacrolimus (FK506). No citoplasma, a ciclosporina (CsA) liga-se à sua imunofilina, ciclofilina (CpN), formando um complexo entre a ciclosporina e a CpN. O complexo ciclosporina-CpN liga-se e bloqueia a função da enzima calcineurina (CaN), que tem uma atividade serina/treonina fosfatase. Como resultado, a CaN falha na

desfosforilação do componente citoplasmático das células T ativadas do fator nuclear (NF-ATc) e, assim, no transporte de NF-ATc para o núcleo e a ligação do NF-ATc ao componente nuclear das células T ativadas do fator nuclear (NF-ATn). O complexo NF-ATc–NF-ATn liga-se ao promotor do gene interleucina 2 (IL-2) e inicia a sua produção. Consequentemente, as células T não produzem IL-2, que é necessária para a sua completa ativação. Tacrolimus (FK506) liga-se à proteína ligadora de FK506 (FKBP), formando o complexo FK506-FKBP, que liga-se e bloqueia a CaN. O complexo FK506–FKBP–CaN inibe a ativação de NF-ATc, prevenindo, dessa forma, a sua entrada dentro do núcleo. Embora a ciclosporina e o FK506 ligam-se a diferentes moléculas-alvo, ambas drogas inibem a ativação das células T da mesma maneira. Fonte: Stanislaw M. Stepkowski, Expert Reviews in Molecular Medicine © Cambridge University Press ISSN 1462-3994 (Disclaimer and copyright); acessado em 20 de fevereiro de 2014 no sítio <http://totalpict.com/b/cyclosporine/2/99642>)

A FK506 revela ações neuroprotetoras e neurotróficas em modelos experimentais por aumentar o alongamento nervoso e por acelerar a taxa de regeneração nervosa *in vivo* e *in vitro*. A administração sistêmica dose-dependente de FK506 também provou acelerar a resposta funcional em ratos pós-esmagamento de nervo ciático. O efeito parece resultar de uma taxa aumentada de regeneração axonal. A propriedade nervo-regenerativa dessa classe de agentes é independente da sua ação imunossupressora porque os compostos relacionados ao FK506 que ligam à FKBP-12, mas não inibem calcineurina, são os capazes de aumentar regeneração nervosa. Portanto, a habilidade da FK506 em aumentar a regeneração nervosa se origina via um mecanismo independente da calcineurina (e não envolvendo um aumento na fosforilação de GAP-43) (RUSTEMEYER *et al*, 2010; JIFENG *et al*, 2010; GOLD, 1997; YU *et al*, 2009).

Esse efeito bimodal da FK506 (imunossupressão e regeneração nervosa) varia de acordo com espectro, de maneira que há experimentos em regeneração de nervo periférico de rato que utilizam dosagens que apresentam efeitos positivos significativos no que diz respeito à regeneração nervosa ao passo que outros estudos utilizando dosagens diferentes não apresentaram diferenças na regeneração em comparação ao controle (RUSTEMEYER *et al*, 2010; JIFENG *et al*, 2010; GOLD, 1997; YU *et al*, 2009). De acordo com a hipótese em estudo, uma baixa dose (0,1 ou 0,5 mg/kg/dia, por exemplo) de FK506 pode causar efeito neuroregenerativo por ativar a imunofilina FKBP-52,



por ser parte do complexo receptor esteróide incluindo proteína de choque térmico 90 (HSP-90) e por liberar fator de crescimento nervoso (NGF) e proteína associada ao crescimento (GAP), tudo isso sem ativar a imunofilina FKBP-12 e mediar um efeito imunossupressor. Em dosagens mais elevadas (como aquelas normalmente utilizadas para imunossupressão), poderia ocorrer uma priorização da ligação da FK506 à FKBP-12, levando a uma imunossupressão superior e a uma redução do efeito neuroregenerativo (RUSTEMEYER *et al*, 2010; JIFENG *et al*, 2010; GOLD, 1997; YU *et al*, 2009).

Já foi descrito que a afinidade da FK506 é dependente de concentração. Ainda assim, os efeitos do espectro efetivo não são completamente conhecidos, mas há conclusões de que a administração intramuscular de baixa dose de FK506 após o transplante de enxerto nervoso pode fornecer regeneração nervosa funcional e morfométrica superior à verificada em isoenxertos ou aloenxertos sem tratamento com FK506 e quase comparável àquela em animais não-operados (RUSTEMEYER *et al*, 2010; JIFENG *et al*, 2010; GOLD, 1997; YU *et al*, 2009).

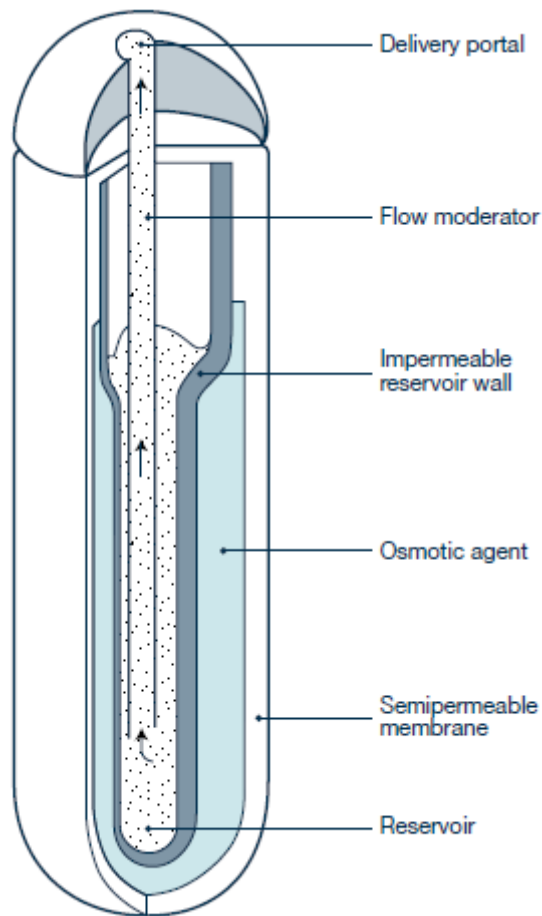
## 2.5 Minibombas de infusão osmótica

Sistemas convencionais de liberação de drogas (injeção) apresentam pouco controle acerca da liberação e quase nenhum controle sobre a concentração efetiva no sítio-alvo. Esse tipo de padrão de dosagem pode resultar em mudanças constantes, concentrações plasmáticas imprevisíveis. Drogas podem ser liberadas em um padrão constante durante um longo período de tempo pelo processo de osmose. Dispositivos osmóticos são a estratégia mais promissora e confiáveis para a liberação controlada de drogas.

Osmose refere-se ao processo de passagem de moléculas de solvente de um meio menos concentrado para um mais concentrado através de uma membrana semipermeável. Osmose é o fenômeno que faz com que um sistema de liberação controlada de drogas seja uma realidade. A pressão osmótica criada devido à absorção de fluido do ambiente externo regula a

liberação da droga a partir do dispositivo osmótico. A taxa de liberação de drogas a partir de uma bomba osmótica é diretamente proporcional à pressão osmótica desenvolvida devida à absorção de fluidos. Pressão osmótica é uma propriedade coligativa da solução na qual a magnitude da pressão osmótica da solução é independente do número de espécies de soluto presente na solução. Por isso, a taxa de liberação de drogas a partir dos dispositivos de dispensação osmótica depende da solubilidade, do peso molecular e coeficiente de atividade do soluto (GUPTA *et al*, 2011).

As minibombas de pressão osmótica ALZET (Figura 9) liberam continuamente drogas, hormônios e outros agentes de teste em taxas controladas de 1d até 42d sem a necessidade de conexões externas ou manuseio frequente. As bombas ALZET podem ser usadas para administração sistemática quando implantadas subcutaneamente ou intraperitonealmente. Ainda, podem ser anexadas a um cateter para liberação intravenosa ou intra-arterial ou pode ser usada para liberação em um sítio específico no qual os efeitos da droga estão localizados em um tecido ou órgão particular através do cateter. As bombas ALZET têm sido empregadas em milhares de estudos voltados à liberação controlada de uma grande variedade de agentes experimentais incluindo peptídeos, fatores de crescimento, citosinas, materiais genéticos, quimioterapêuticos, hormônios, esteroides, e anticorpos. Devido ao seu mecanismo único, compostos de qualquer conformação molecular podem ser liberados previsivelmente em taxas controladas, independente das suas propriedades físicas e químicas. (ALZET Osmotic Pumps, DURECT Corporation, Cupertino, CA)



**FIGURA 9** – Esquema da bomba de pressão osmótica ALZET.

### 3. JUSTIFICATIVA:

O interesse pelo estudo da regeneração em nervos periféricos vem crescendo continuamente nas últimas décadas. Diversos fatores têm contribuído para o aumento do número de pesquisas nessa área como, por exemplo, o impacto socioeconômico causado pelo trauma e suas diferentes formas de incapacitação, além do impacto psicológico causado por dores, desconforto, e perda das funções motoras e sensoriais.

Embora as primeiras tentativas de reparo em nervos injuriados tenham sido reportadas no século 17, e, com o passar dos anos, diversas técnicas microcirúrgicas e materiais inovadores como, por exemplo, os biomateriais, tenham surgido, a recuperação funcional apresenta índices muito aquém do

necessário para devolver ao paciente condições mínimas para levar uma vida sem ou com poucas restrições.

Diversas substâncias vêm sendo testadas com o intuito de colaborar com as novas tecnologias e tornar esse desafio clínico, que depende de vários fatores como idade do paciente, grau da lesão, tempo de atendimento após a lesão, tipo de tratamento empregado, etc., em uma solução permanente. Nesse contexto aparecem os fatores neurotróficos e drogas que, à caráter, apresentam outras indicações, mas que têm mostrado serem aliadas na busca da regeneração de nervos periféricos. A molécula de FK506, originalmente empregada em transplantes, vem ganhando destaque nos últimos anos por revelar ações neuroprotetoras e neurotróficas e por acelerar a taxa de regeneração nervosa *in vivo* e *in vitro*.

Tendo em vista que a aplicação local do FK506 através de dispositivos de dispensação contínua ainda não foram testados, estas respostas podem ser importantes para o planejamento de pesquisas futuras visando melhorias na regeneração nervosa e recuperação funcional do paciente acometido por uma lesão com perda de substância.

#### **4. OBJETIVOS:**

##### **Objetivo geral:**

Avaliar *in vivo* a viabilidade e efeito do FK 506 sobre o reparo de lesão de nervo ciático de ratos;

##### **Objetivos específicos:**

1 – Analisar se a via de aplicação (sistêmica ou local), para uma concentração constante, interfere na regeneração de nervo periférico de ratos;

2 – Avaliar a efeito do emprego de Minibombas osmóticas (Alzet, Cupertino, CA) na regeneração de nervos via sistêmica e local;

3 – Avaliar se a dose de FK506 empregada demonstra ser adequada para regeneração.

## 5. MATERIAS E MÉTODOS

### 5.1. Delineamento Experimental

Estudo experimental, controlado, comparado e cego.

### 5.2. Cálculo do tamanho da amostra

O cálculo amostral foi realizado através do *software* Epi-Info 6.0 Plus (DOS) considerando nível de significância de 5%, poder de 90%, proporção entre os grupos de 1:1, desvio-padrão de 1,0 e tamanho do efeito padronizado<sup>1</sup> (diferença entre grupos) de 2,1. Através desse cenário, chegou-se à um “n” igual a 12 considerando-se uma possível perda de até dois animais frente aos procedimentos anestésicos e cirúrgicos.

### 5.3. Animais

Foram utilizados 36 ratos Wistar (*Rattus Novergicus Albinus*), machos adultos, pesando entre 250 e 300 gramas de massa corporal. Todos os animais são provenientes do vivário do Laboratório de Habilidades Médicas e Pesquisa Cirúrgica da Faculdade de Medicina da PUCRS, com controle de luz (ciclo claro-escuro de 12h), à temperatura controlada de  $22 \pm 1^{\circ}\text{C}$ , com água e alimentação *ad libitum*, estando o presente estudo conforme Lei Arouca 2008,

---

<sup>1</sup> O objetivo de reportar o tamanho de efeito é auxiliar o leitor a entender melhor a importância do resultado que foi obtido no estudo. Mantendo todas as variáveis iguais, quanto maior o tamanho de efeito, maior é o impacto que a variável central do experimento está causando e mais importante se torna o fato dela ter uma contribuição para a questão que está sendo analisada. Valores superiores ou iguais a 0,8 representam tamanho de efeito grande (Lindenau e Guimarães, 2008).

nº 11.794/08 que regulamenta o inciso VII do § 1º do art. 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais, revogando a Lei nº 6.638, de 8 de maio de 1979; e dá outras providências.

#### 5.4. Modelo Experimental

O modelo de lesão com perda de substância do nervo ciático foi provocado acessando a região lateral da coxa direita. Após incisão da pele, subcutâneo e fáscia lata, os músculos vasto lateral e bíceps femoral foram afastados e o nervo ciático liberado de suas inserções fasciais. Um segmento do nervo foi ressecado com tesoura microcirúrgica (terço proximal antes da bifurcação do ciático em nervos tibial e fibular comum) criando um defeito crítico para a espécie de 10 mm. Procedimento de tubulização foi realizado utilizando o tubo de silicone de 15mm e fio de náilon monofilamentar 9-0.

#### 5.5. Grupos de experimentação

Os 36 animais foram randomicamente distribuídos em 3 grupos. Os ratos receberam os tratamentos imediatamente após a realização da lesão (Tabela 2).

**TABELA 2.** Distribuição dos grupos experimentais

<b>Grupos</b>	<b>Descrição</b>	<b>Número de animais</b>
I	Controle (tubo silicone)	12
II	FK506 via Bomba ALZET subcutânea (sistêmico)	12
III	FK506 via Bomba ALZET intratubo (local)	12
<b>TOTAL</b>		<b>36</b>

#### 5.6. Protocolo Anestésico

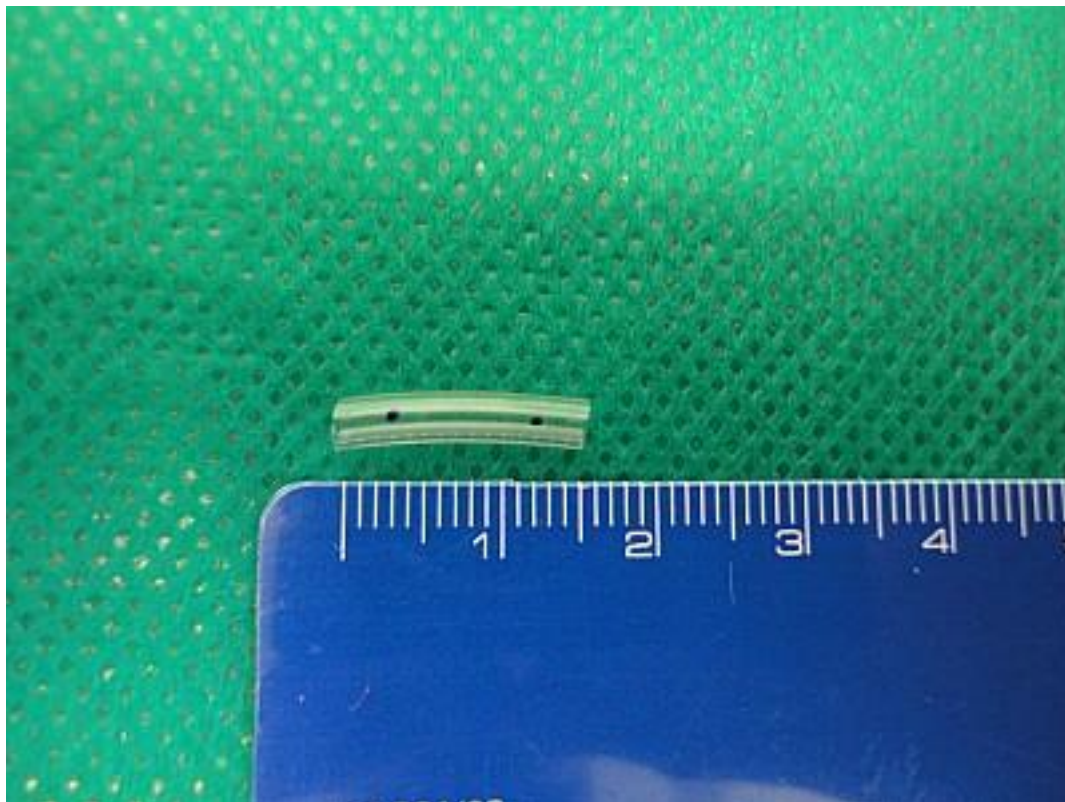
Os procedimentos anestésico-cirúrgicos foram realizados no Laboratório de Habilidades Médicas e Pesquisa Cirúrgica da Faculdade de Medicina da

PUCRS. Os animais serão anestesiados através de associação de cloridrato de cetamina ( $75\text{mg.kg}^{-1}$ ) e Xilazina ( $10\text{mg.kg}^{-1}$ ) (PAIVA *et al*, 2005) administrados na mesma seringa via intraperitoneal (IP).

### 5.7. Procedimentos Cirúrgicos

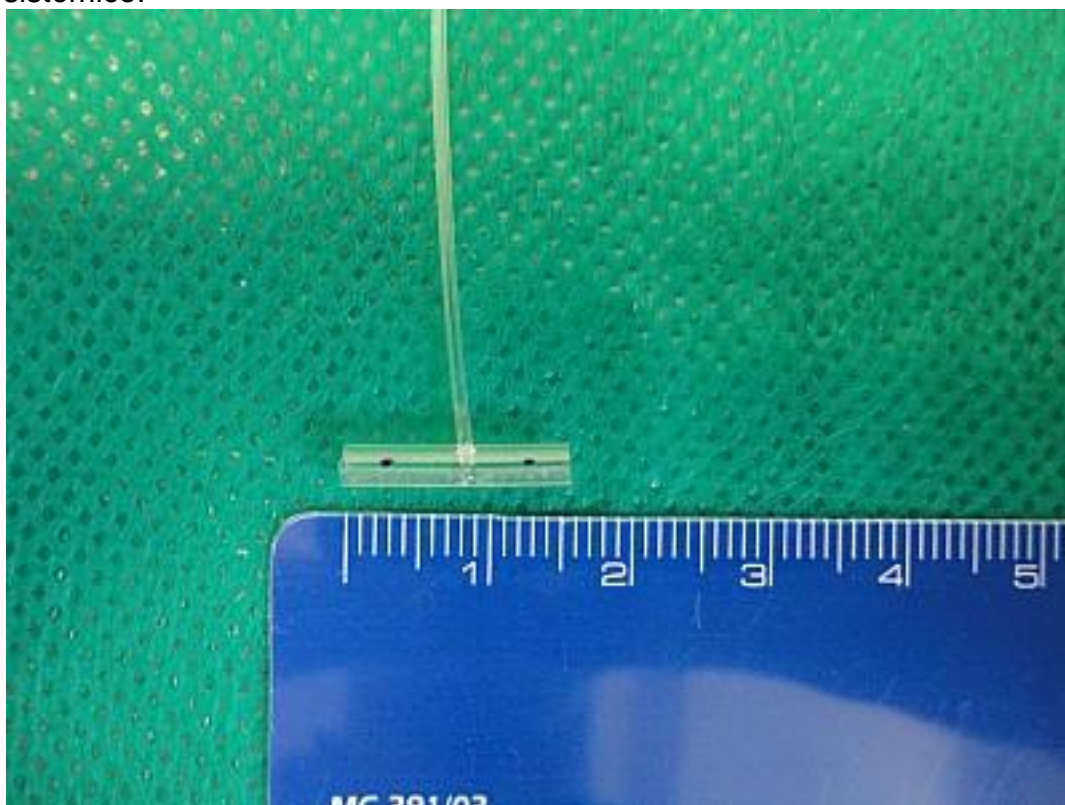
Os procedimentos cirúrgicos foram realizados no Laboratório de Habilidades Médicas e Pesquisa Cirúrgica da Faculdade de Medicina da PUCRS, com auxílio de um microscópio de dissecação microcirúrgica (D.F.Vasconcellos, São Paulo, Brasil).

Os animais foram posicionados em decúbito lateral direito, sob anestesia geral. Após, será acessada a região craniolateral da coxa. Os músculos vasto lateral e bíceps femoral foram afastados e o nervo isquiático liberado de suas inserções fasciais. Através do auxílio de microscópio cirúrgico (D.F.Vasconcellos, São Paulo, Brasil), um segmento do nervo foi ressecado com tesoura microcirúrgica criando no terço proximal, antes da bifurcação do ciático em nervos tibial e fibular comum, um defeito crítico para a espécie de 10 mm. Um tubo de silicone de calibre compatível com 15mm de comprimento foi suturado com fio náilon monofilamentar 9-0 (Prolene®, BV 1, Ethicon®) em pontos epineurais nas extremidades criadas (um ponto proximal e outro distal). No pós-operatório imediato foi administrado cetoprofeno ( $5\text{mg.kg}^{-1}$ , SC, cada 24 horas durante 2 dias) e cloridrato de tramadol ( $5\text{mg.kg}^{-1}$ , SC, cada 12 horas durante 2 dias) como medicação analgésica/antiinflamatória (HAU e VAN HOOSIER, 2003). Para fechamento da incisão de acesso em ambos os grupos experimentais, a fáscia lata e a pele foram suturadas separadamente em padrão contínuo simples e fio monofilamentar de náilon 5-0 (Ethilon®, Johnson & Johnson). A Figura 10 mostra o tubo que foi usado nos grupos controle e sistêmico ao passo que a Figura 11 mostra o tubo (já com o catéter adaptado) que foi usado no grupo local.



Eduardo Goldoni

**FIGURA 10.** Tubo de silicone de 15mm empregado nos grupos controle e sistêmico.



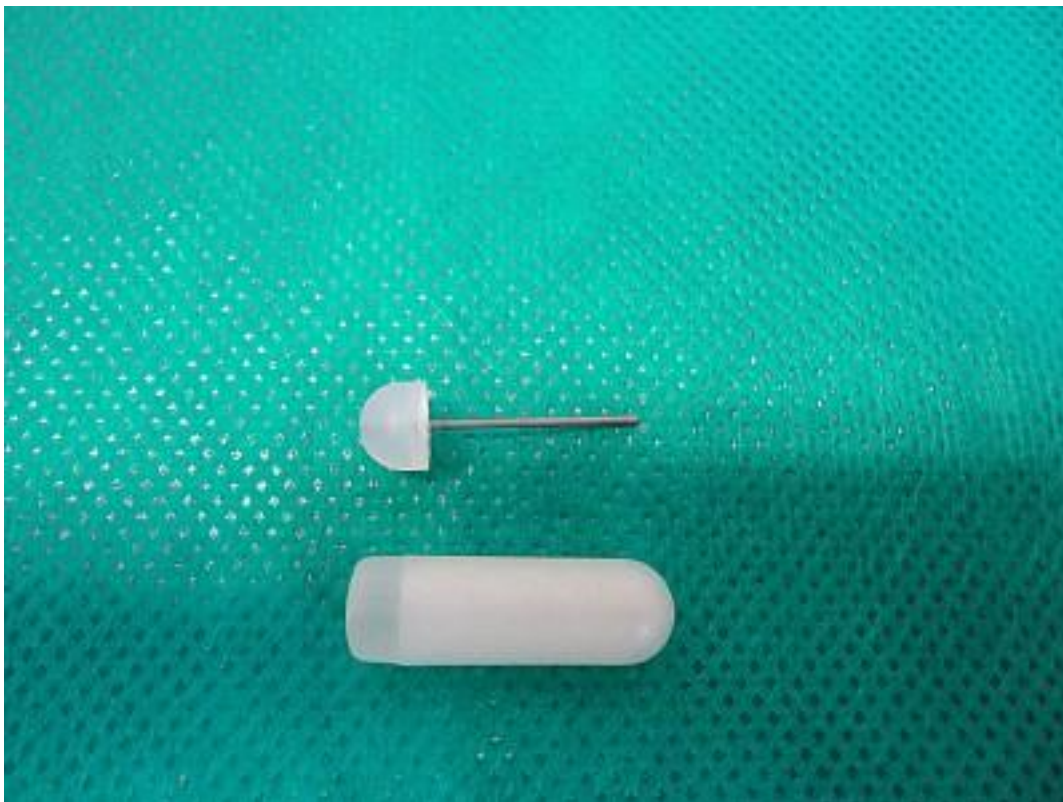
Eduardo Goldoni

**FIGURA 11.** Tubo de silicone de 15mm com cateter adaptado para administração local empregado no grupo local.



### 5.8. Administração do Tacrolimus (FK506)

Minibombas osmóticas (modelo 2006, Alzet, Cupertino, CA) preenchidas com FK506 (0,1 mg/kg/dia) foram implantadas por via subcutânea na porção posterior de cada animal (melhor região para acomodação do dispositivo) para os grupos sistêmico e local. No caso específico do grupo local, foi anexado um cateter à bomba de modo que este pudesse ser ligado ao tubo de silicone garantindo que a droga fosse dispensada intratubo (localmente), ou seja, foi criada uma via de dispensação da droga diretamente na região da lesão. No grupo controle, foi realizado apenas o defeito crítico de 10mm e consequente tubulização, sem uso das minibombas. Fazendo-se uso das minibombas, consegue-se garantir que o FK506 seja liberado numa taxa constante de 0.15 $\mu$ L/h durante 6 semanas (havendo a troca das bombas, mediante novo procedimento cirúrgico, para um período de mais 6 semanas, totalizando as 12 semanas previstas para a duração do projeto). Com isso, evita-se o pico característico de que pode ser visualizado numa curva de concentração sérica de um fármaco, ou seja, garante-se que não houve oscilações na concentração do fármaco atuando no organismo em função do tempo. As Figuras 12 e 13 mostram, respectivamente, exemplares da minibomba ALZET empregada nos grupos sistêmico e local.



**FIGURA 12.** Minibomba ALZET empregada no grupo sistêmico



**FIGURA 13.** Minibomba ALZET com cateter interligado ao tubo de silicone empregada no grupo local

## 5.9 Avaliação da Recuperação da Lesão

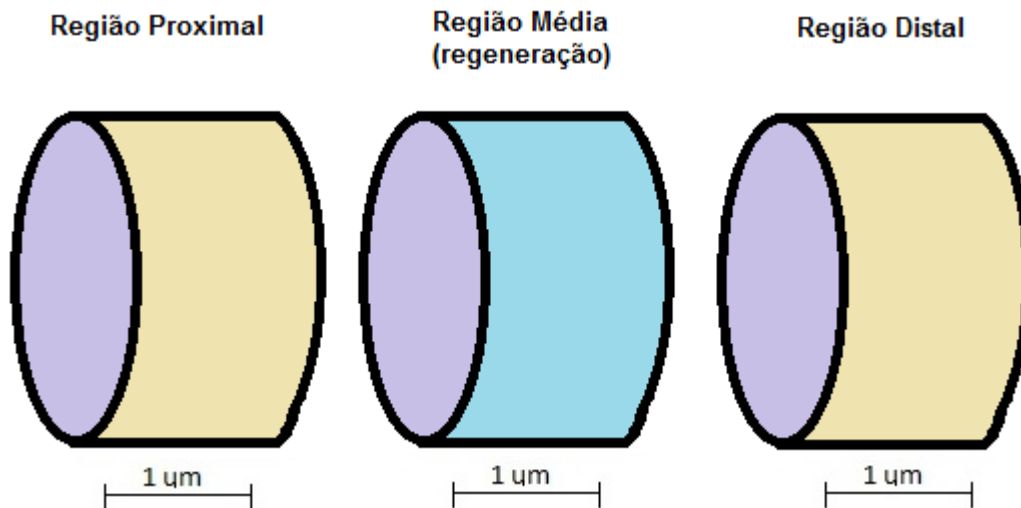
Lesões de nervo periférico são um problema clínico muito comum e frequentemente resultam em déficits funcionais por um longo período. Diversas pesquisas voltadas ao desenvolvimento de métodos que possam melhorar a regeneração após lesão estão em andamento. Tentativas de estudar o efeito de diversas substâncias neurotróficas têm encontrado enorme dificuldade no que diz respeito à precisa quantificação da regeneração. Medidas histológicas, eletrofisiológicas e funcionais de regeneração já se encontram estabelecidas. Dessas, a recuperação funcional é a mais difícil de ser mensurada precisamente e nem sempre está adequadamente correlacionada com os resultados histológicos e eletrofisiológicos. O atual padrão ouro em modelo de lesão ciática em ratos envolve a análise das pegadas do animal em recuperação e a análise do índice de função ciática (SFI, do inglês *sciatic function index*) (KOKA E HADLOCK, 2001).

### 5.9.1 Análise Histomorfométrica

Depois de retirado, o nervo foi seccionado transversalmente gerando três segmentos: proximal, médio e distal. As amostras de cada segmento foram fixadas em glutaraldeído 2,5% (tampão fosfato 0.1M) por 48h a temperatura ambiente. Após a fixação, os tecidos foram lavados em tampão fosfato (pH 7.4) e pós-fixados em tetróxido de ósmio 1% ( $\text{OsO}_4$ ) por 2 horas a 4°C.

Posteriormente, parte das amostras foram desidratadas em graduações crescentes de etanol, lavadas com uma solução de óxido de propileno e embebidas em resina Epoxy (Sigma) (moldes de silicone numerados com cavidades de 5 mm de profundidade). Este molde oferece orientação e ângulo de corte adequados para as secções do nervo. Posteriormente, as amostras foram clivadas (Figura 14) (cortes semifinos de 1 $\mu\text{m}$ ) em ultra-micrótomo (SuperNova, Reichert-Yung, Áustria), transferidas para lâminas de vidro em água, secas em platina a 50-60°C e coradas com azul de toluidina a 1% em ácido bórico saturado para observação em microscopia de luz. As lâminas

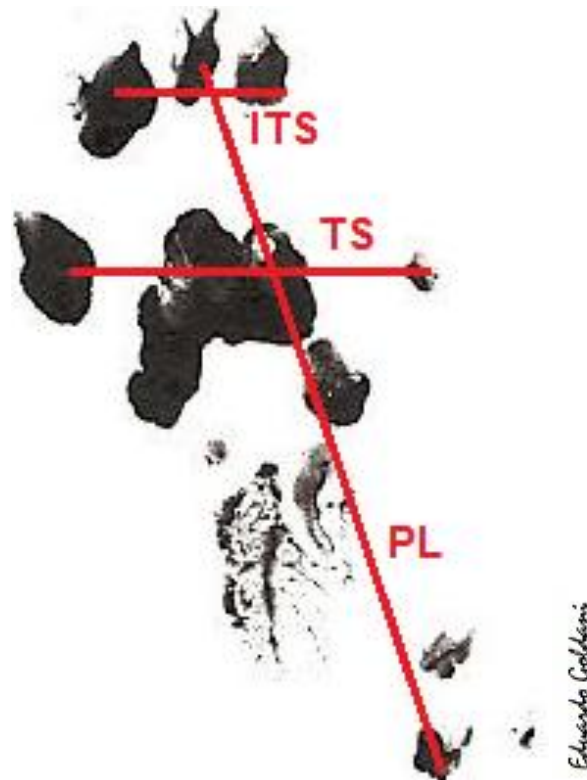
foram analisadas por especialista cegado em relação ao delineamento do estudo em microscópio óptico Olympus® BX50 equipado com uma câmera fotográfica digital Leica® DC 300F. Os parâmetros morfométricos avaliados foram o perímetro e a área do nervo. Os parâmetros foram avaliados através da média, selecionando de forma randomizada 10 campos em aumento de 400x.



**FIGURA 14.** Secções transversais do segmento do nervo operado e das regiões proximal e distal ao defeito.

#### 5.9.2 Teste de Marcha (Walking Track Analysis)

O atual padrão ouro e método mais comumente empregado para a medida da recuperação funcional de lesão em nervo ciático de ratos é o teste de marcha. Esse método foi descrito pela primeira vez por Medinaceli (DE MEDINACELI *et al*, 1993) em 1982 e posteriormente modificado por Bain (BAIN *et al*, 1989). O método descrito vem sendo utilizado de maneira crescente por pesquisadores que lidam com neurociência e envolve a medida de várias relações (Figura 15): PL = distância do calcanhar até o 3º dedo; TS = distância do 1º ao 5º dedo; ITS = distância do 2º ao 4º dedo. Diferentes técnicas são empregadas na obtenção das pegadas para a análise do teste de marcha, desde aquelas coletadas através de tinta e papel até as que utilizam recursos digitais (escâner que avalia a pegada) e computador (KOKA E HADLOCK, 2001).



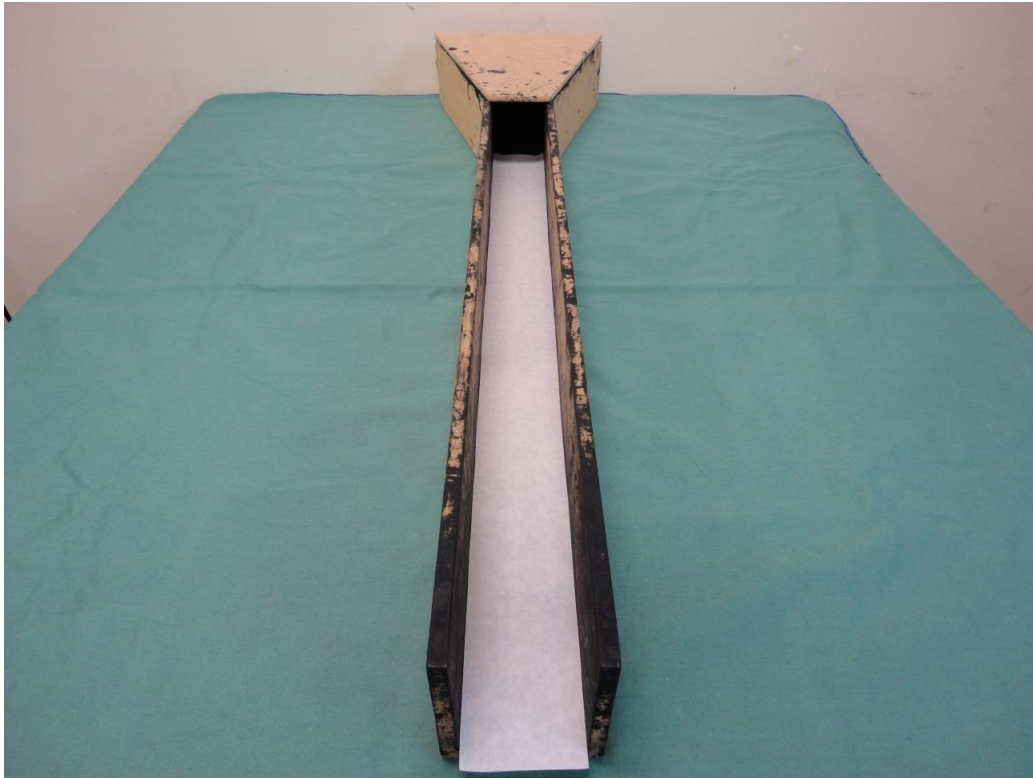
**FIGURA 15.** Medida da pegada de um rato não lesado;

Uma complexa fórmula matemática (Eq. 1), derivada empiricamente, é usada para comparar as medidas obtidas entre o lado experimental e o lado normal. O valor numérico encontrado através da fórmula é chamado de índice de função ciática. Um SFI igual à (0), indica normal, e (-100) indica rompimento completo do tronco do nervo (como em uma transecção do nervo ciático) (SARIKCIOGLU, 2009; VAREJÃO *et al*, 2001).

$$SFI = -38.8 \left( \frac{EPL-NPL}{NPL} \right) + 109.5 \left( \frac{ETS-NTS}{NTS} \right) + 13.3 \left( \frac{EIT-NIT}{NIT} \right) - 8.8 \quad (\text{Eq.1})$$

Para a determinação do SFI, os animais são posicionados em uma passarela de madeira (43 x 8,7x 5,5 cm) fechada nas laterais e dotada de abrigo para o rato no final do trajeto (Figura 16). Todos os animais são, primeiramente, treinados por duas ou três vezes para que possam reconhecer o local. Frequentemente, durante os treinamentos, os animais param no meio do corredor para explorar o local. Após, caminham até o final chegando ao abrigo. As patas dos animais são pintadas com tinta apropriada e suas pegadas ficam registradas em uma tira de papel que é posicionada dentro da

passarela por onde eles irão passar. De posse das pegadas, os parâmetros PL, TS e ITS são coletados para posterior análise através da equação matemática (KOKA E HADLOCK, 2001).



**FIGURA 16.** Passarela do teste de marcha

Os animais foram submetidos ao teste de marcha em passarela em períodos pré-determinados (30, 60 e 90 dias). O Índice de Função Ciática foi calculado através da mensuração das pegadas de cada animal comparando-se a pata lesada com a não lesada. Na interpretação, valores negativos próximos de cem (-100) indicam disfunção severa do nervo e valores negativos próximos à zero (0) significam disfunção leve ou função normal (SARIKCIOGLU, 2009; VAREJÃO *et al*, 2001).

#### 5.10. Eutanásia

Após 90 dias, os animais foram novamente anestesiados conforme protocolo anteriormente descrito e eutanasiados com sobredose anestésica (mesmo protocolo utilizado para os procedimentos cirúrgicos), estando este método de acordo com a Lei Arouca n. 11.794, de 13.08.2008.

### 5.11. Análise Macroscópica

Após a eutanásia, a coxa do animal foi novamente acessada para retirada do nervo ciático dos animais (todos os grupos). Nesse momento, foi realizada avaliação macroscópica constando-se a existência ou ausência de nervo neoformado dentro do tubo de silicone (câmara de regeneração).

### 5.12. Análise Estatística

Os valores obtidos com o experimento foram expressos pela média e desvio padrão. A avaliação estatística foi realizada através da análise de variância (ANOVA) com desvio padrão aplicado ao teste de *Student Newman-Keuls* (nível de significância de 5%, valor de  $p < 0,05$ ), teste de esfericidade de Mauchly, teste *Between-Subjects*, teste de *Within-Subjects Effects*, teste *Multivariate* e teste de Bonferroni usando versão 11.0 do software estatístico SPSS. Também foram aplicados teste de adequação (teste de esfericidade de Mauchly), como também o teste de Bonferroni

### 5.13. Aspectos Bioéticos

Este trabalho seguiu as normas bioéticas estabelecidas pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) e/ou CEUA (Comitê de Ética para o Uso de Animais) do Hospital São Lucas – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), além de estar em conformidade com a resolução 714 de 20 de junho de 2002 do Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV) e com o Colégio Brasileiro de experimentação animal (COBEA). O estudo foi realizado respeitando os preceitos para minimizar a dor e o sofrimento dos animais. Todos os procedimentos que, de alguma forma, pudessem causar dor, angústia ou sofrimento (incluindo os procedimentos cirúrgicos e a eutanásia) por parte dos animais foram realizados sob anestesia geral (descrita anteriormente). A pesquisa em questão foi aprovada pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais (CEUA) da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS) sob o número de protocolo 11/00225 (Anexo A).

## 6. RESULTADOS

### 6.1. ANÁLISE FUNCIONAL POR TESTE DE MARCHA

A função ambulatoria dos animais foi avaliada por teste de marcha em passarela em 30, 60 e 90 dias pós-operatórios. Os valores do índice de função ciática (SFI) aos 90 dias foram melhores (diferença significativa ao nível de 1% para p) (Tabela 3 e Figuras 17 e 18) quando comparados a 30 e 60 dias.

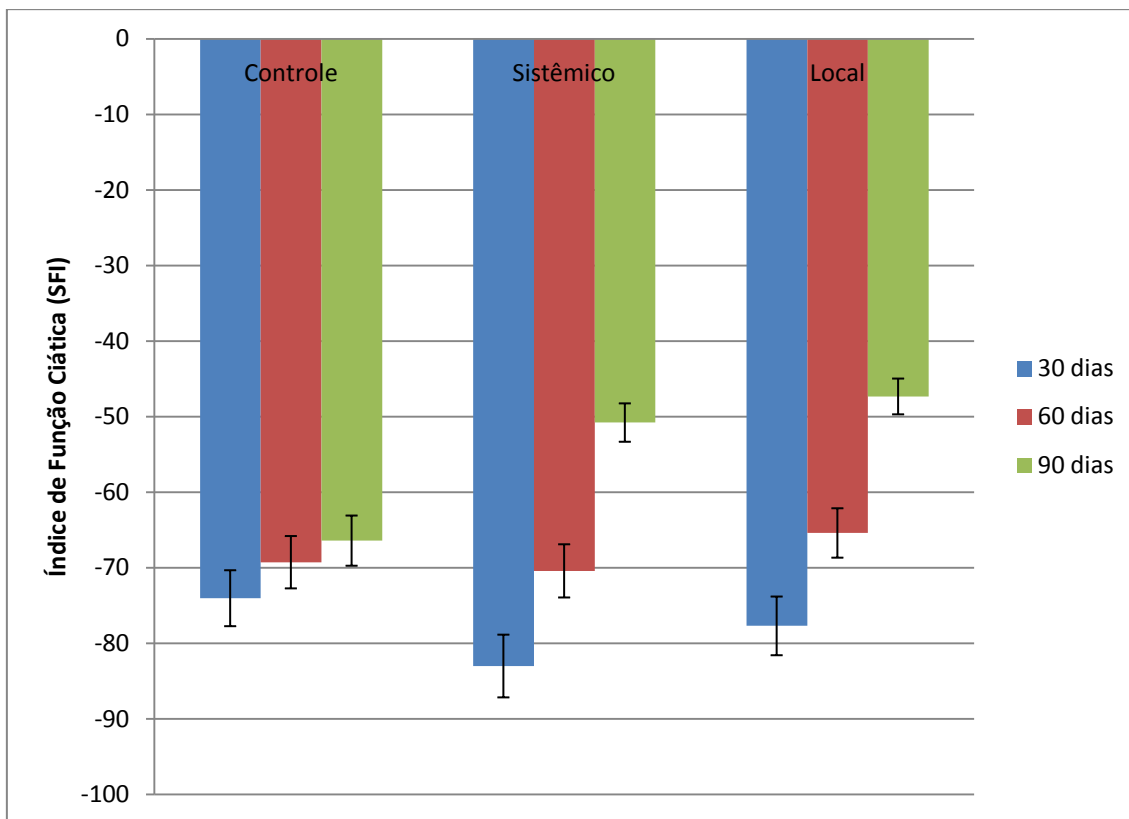
**TABELA 3.** Média ( $\pm$  DP) do índice de função ciática (SFI) para comparação entre os grupos controle, sistêmico e local em 30, 60 e 90 dias pós-operatório.

	<b>Grupo</b>	<b>n</b>	<b>Média <math>\pm</math> DP</b>	<b>Valor de p*</b>
<b>SFI 30 dias</b>	Controle	11	-74,029 $\pm$ 6,377	0,009**
	Sistêmico	12	-83,002 $\pm$ 5,651	
	Local	11	-77,690 $\pm$ 7,482	
	Total	34	-78,380 $\pm$ 7,360	
<b>SFI 60 dias</b>	Controle	11	-69,262 $\pm$ 6,886	0,212
	Sistêmico	12	-70,411 $\pm$ 6,363	
	Local	11	-65,394 $\pm$ 7,493	
	Total	34	-68,416 $\pm$ 7,044	
<b>SFI 90 dias</b>	Controle	11	-66,410 $\pm$ 8,214	0,000**
	Sistêmico	12	-50,784 $\pm$ 3,799	
	Local	11	-47,328 $\pm$ 2,264	
	Total	34	-54,721 $\pm$ 9,809	

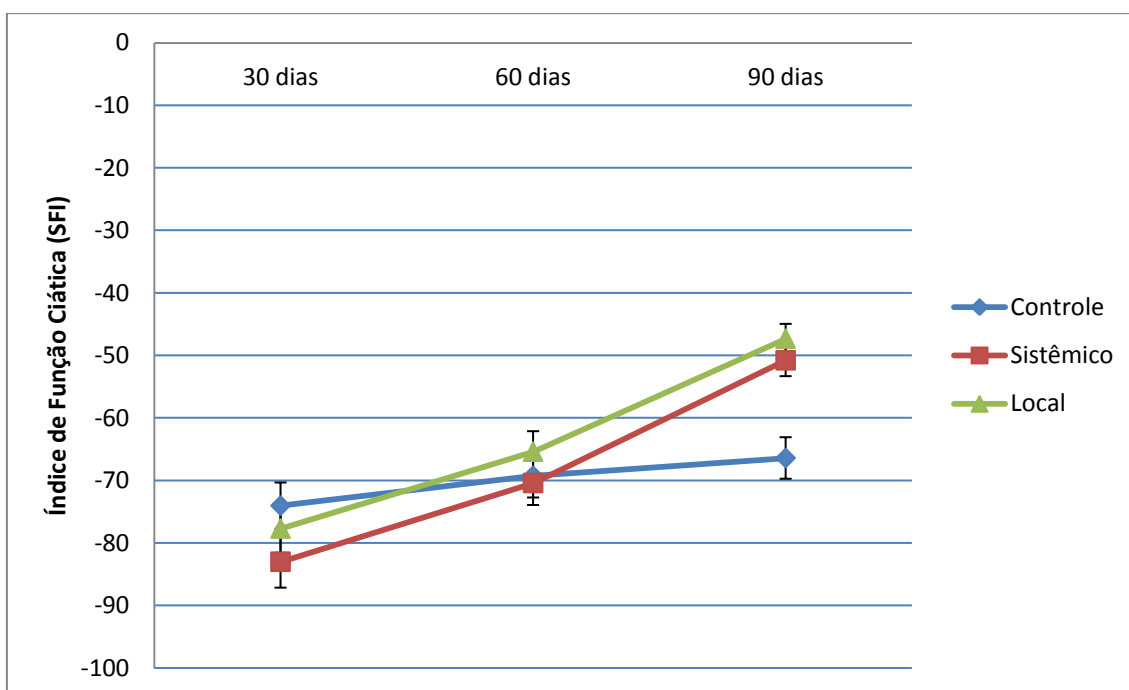
\* Valor de p em relação ao total para cada período avaliado (30, 60 e 90 dias)

\*\* Diferença significativa ao nível de 1%





**FIGURA 17.** Índice de função ciática segundo o período de avaliação

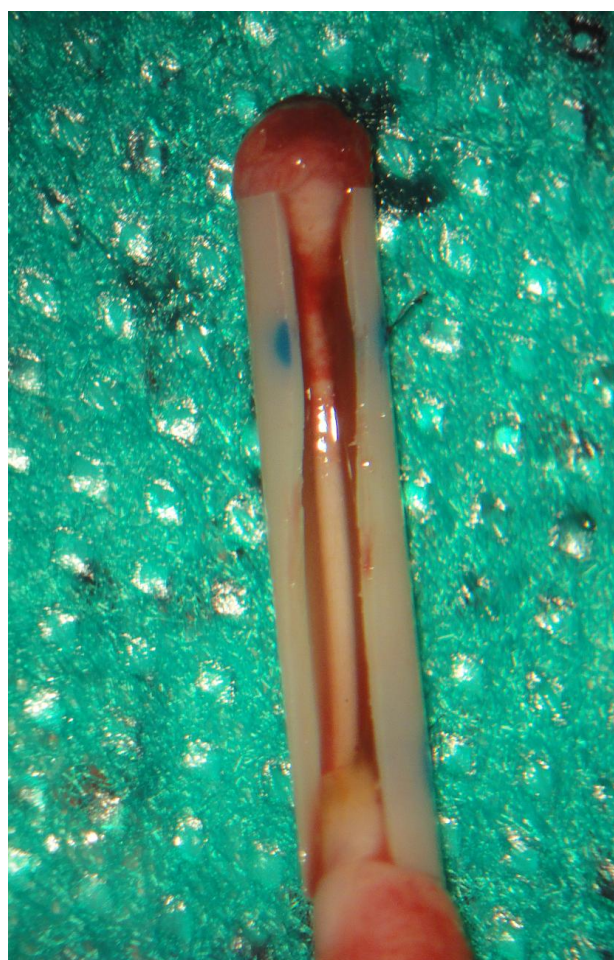


**FIGURA 18.** Índice de função ciática segundo o período de avaliação

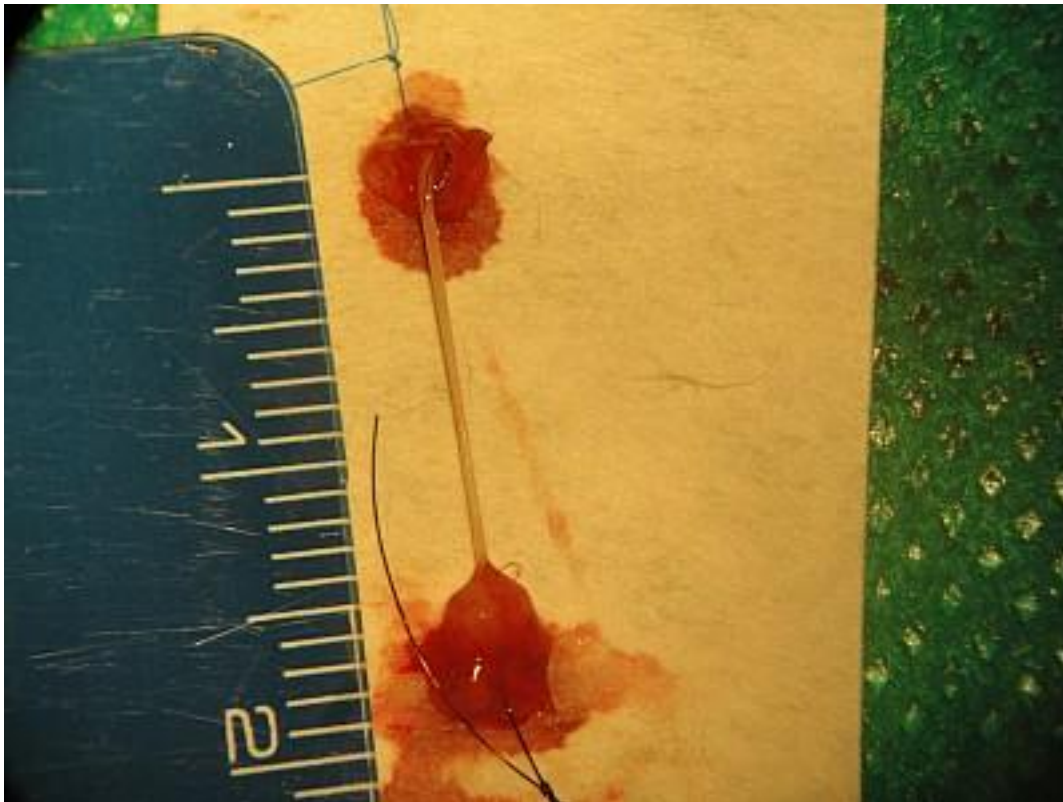
## 6.2. ANÁLISE MACROSCÓPICA

Foi observado índice macroscópico de neuroregeneração (crescimento visível do segmento médio dentro do tubo) bastante variável (66%, 83% e 75% nos grupos controle, sistêmico e local, respectivamente).

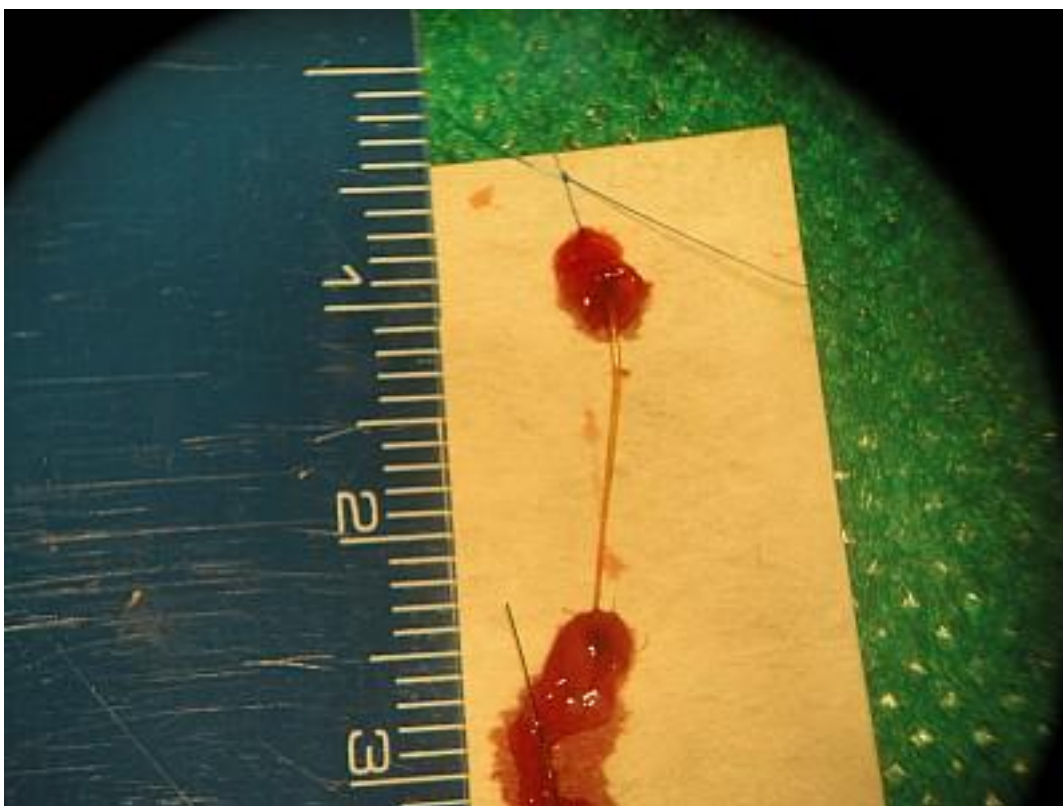
Constataram-se, ainda, espessuras variáveis de nervo neoformado. Como se trata de uma análise subjetiva, onde, necessariamente, a visualização macroscópica não signifique que houve, de fato, regeneração nervosa, estas observações não foram mensuradas. As Figuras 19 a 25 demonstram, aleatoriamente, exemplares dos resultados macroscópicos obtidos (notar a variabilidade de espessura do nervo neoformado ou a ausência de regeneração).



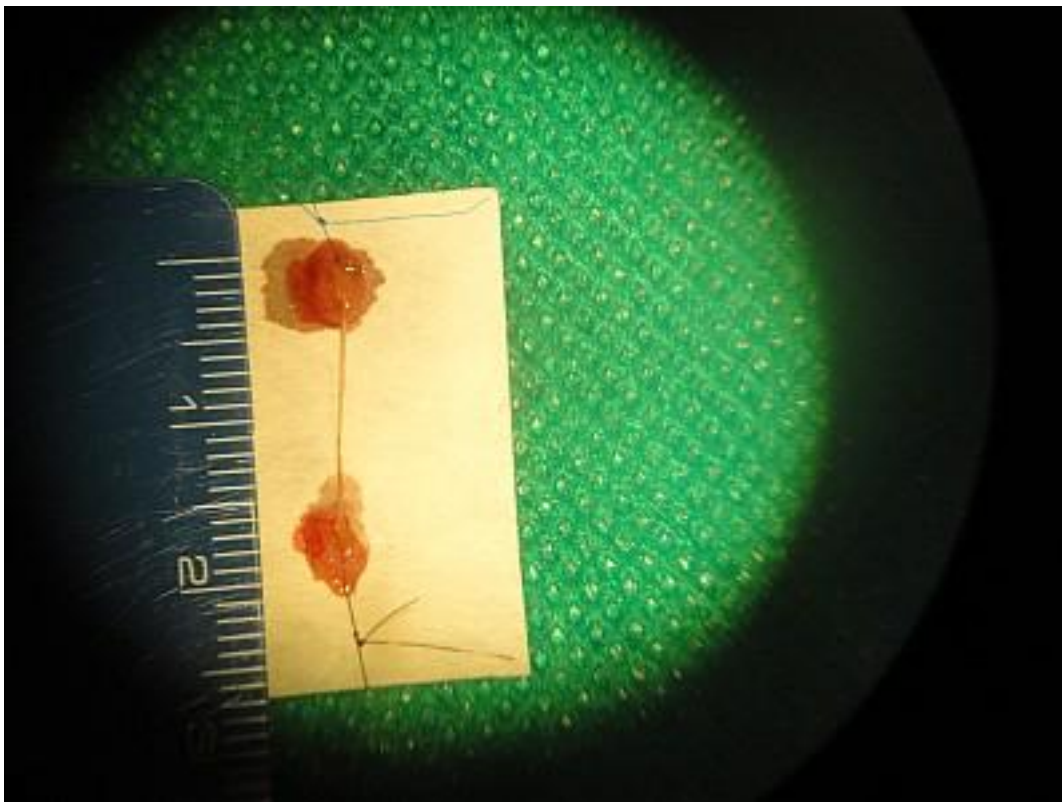
**FIGURA 19:** Segmento de nervo ciático regenerado ainda dentro do tubo (grupo controle).



**FIGURA 20:** Segmento de nervo ciático regenerado (grupo controle).



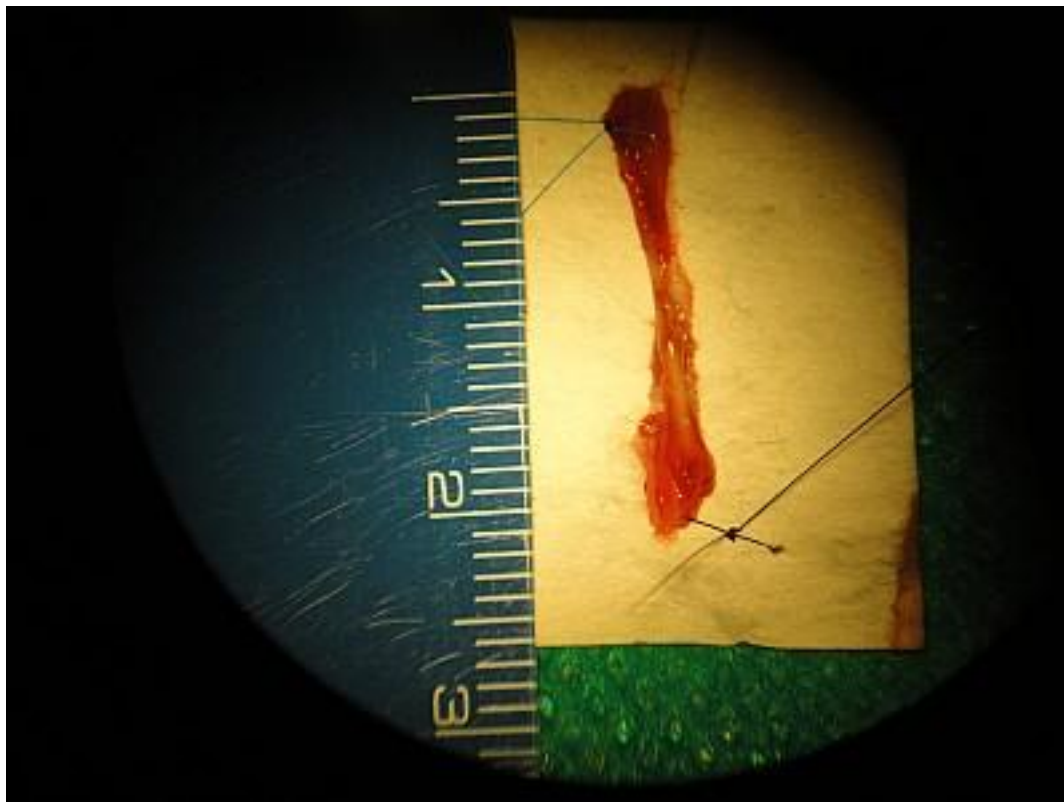
**FIGURA 21:** Segmento de nervo ciático regenerado (grupo controle).



**FIGURA 22:** Segmento de nervo ciático regenerado (grupo sistêmico).

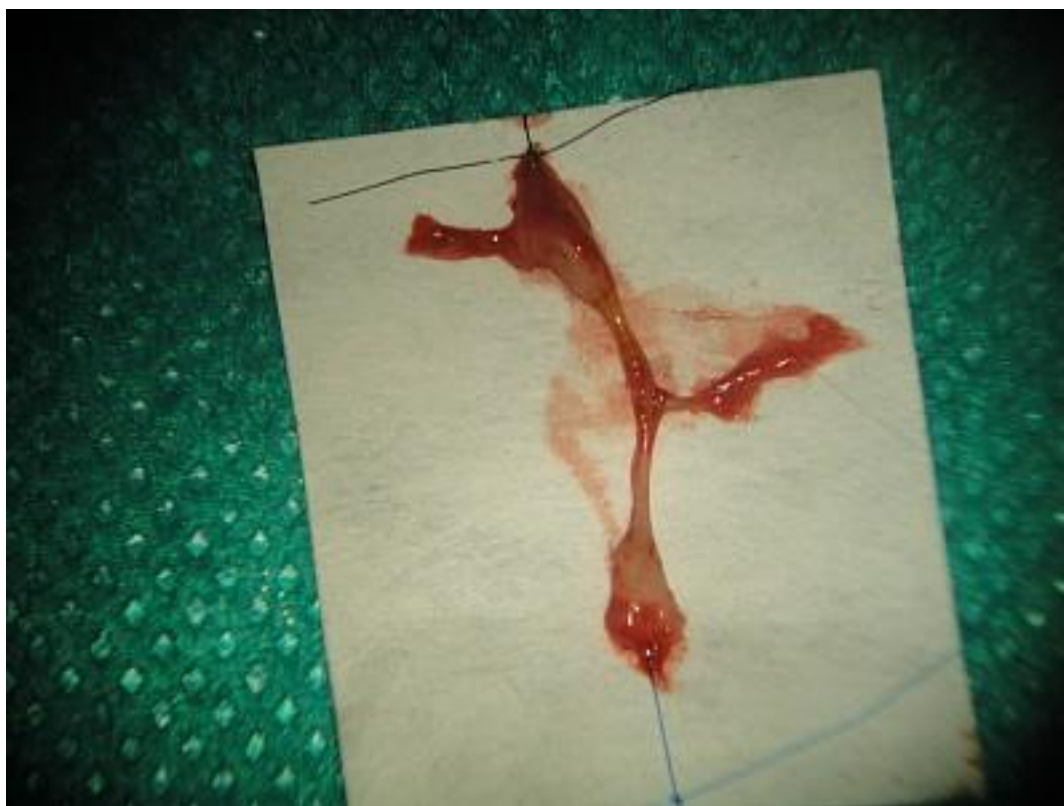


**FIGURA 23:** Segmento de nervo ciático apresentando ausência de regeneração a partir de técnica de tubulização (grupo sistêmico).



Eduardo Golbasi

**FIGURA 24:** Segmento de nervo ciático regenerado (grupo local).



Eduardo Golbasi

**FIGURA 25:** Segmento de nervo ciático regenerado (grupo local). Observar a regeneração em forma de "T deitado", em função do catéter que foi adaptado ao tubo de silicone.

### 6.3. ANÁLISE MORFOMÉTRICA

A análise morfométrica foi realizada nos três segmentos (proximal, médio e distal) dos nervos ciáticos após 90 dias de tratamento. Foram avaliados o perímetro e a área do nervo.

#### 6.3.1 Perímetro do nervo

A Tabela 4 apresenta os dados descritivos dos perímetros do nervo ( $\mu\text{m}$ ) nos segmentos proximal, medial e distal dos grupos controle, sistêmico e local.

**TABELA 4.** Média ( $\pm$  DP) do perímetro para comparação entre os grupos controle, sistêmico e local após 90 dias de pós-operatório.

Região	Grupo	Média ( $\mu\text{m}$ )
Proximal	Controle	2261,8 $\pm$ 633,3
	Sistêmico	3564,1 $\pm$ 961,6
	Local	1758,2 $\pm$ 978,3
Medial	Controle	1159,1 $\pm$ 616,7
	Sistêmico	2073,0 $\pm$ 1017,9
	Local	1166,0 $\pm$ 412,3
Distal	Controle	1830,5 $\pm$ 1515,3
	Sistêmico	2933,3 $\pm$ 876,8
	Local	2239,9 $\pm$ 1436,0

Sobre essa variável, em termos descritivos apenas, os grupos estudados demonstraram diferença no perímetro das três regiões.

Já para o teste *Between-Subjects*, que verifica se o fator “grupo” é significativo, ou seja, se há ou não diferença entre os grupos de estudo (controle, sistêmico e local), o valor de p foi de 0,01 ( $p < 0,05$ ) com poder de 0,819 (poder  $> 0,80$ ). Isso indica que há diferença entre os grupos com relação ao perímetro. A Tabela 5 apresenta o valor médio do perímetro encontrado nos três grupos.

**TABELA 5.** Valor médio do perímetro ( $\mu\text{m}$ ) nos grupos controle, sistêmico e local.

Grupo	Média ( $\mu\text{m}$ ) $\pm$ erro padrão
Controle	1750,5 $\pm$ 312,0
Sistêmico	2856,8 $\pm$ 254,8
Local	1721,4 $\pm$ 235,9

Analisando a Tabela 5, pode ser observado que, em função de o valor médio do perímetro dos grupos controle e local ter sido muito próximo, o grupo sistêmico difere dos demais (valor médio de perímetro maior em relação ao controle e local).

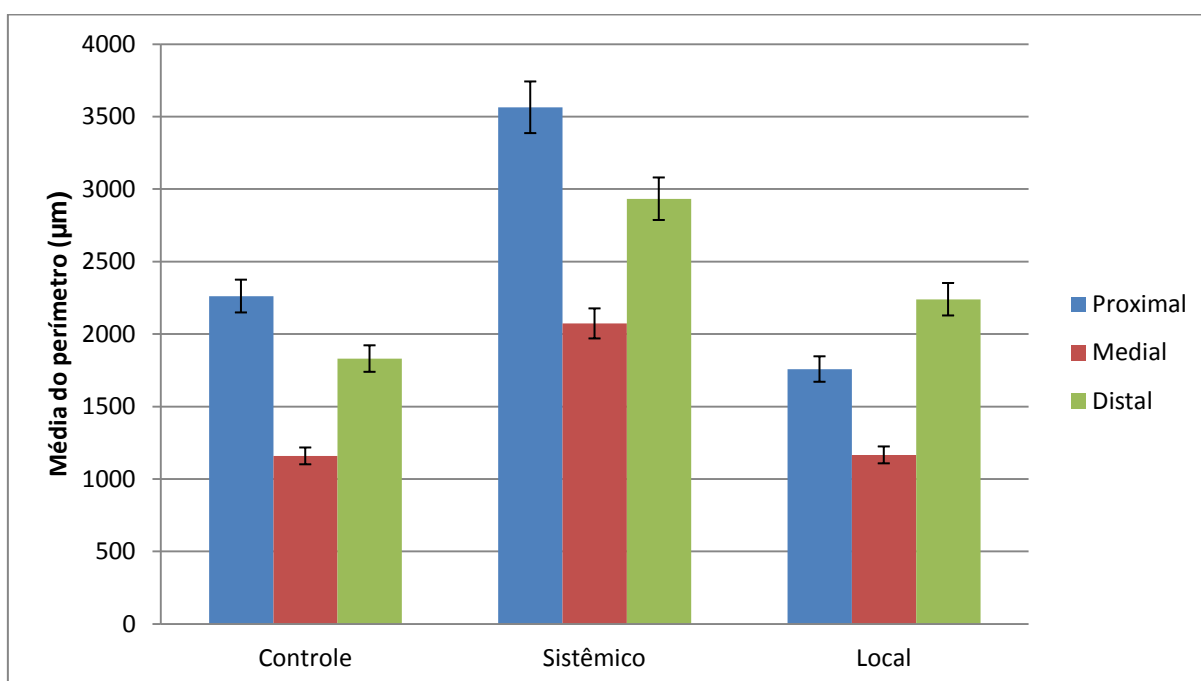
Com relação ao teste *Multivariate*, que verifica se o fator região (segmento) é significativo, ou seja, se há ou não diferença entre os segmentos do nervo (proximal, medial e distal) o valor de p foi de 0,002 ( $p < 0,05$ ) com poder de 0,964 (poder  $> 0,80$ ). Isso significa que o valor de p foi significativo consolidando que o estudo da região é consistente e há diferença entre os segmentos analisados. A Tabela 6 apresenta o valor médio do perímetro encontrado nos três segmentos do nervo (proximal, medial e distal).

**TABELA 6.** Valor médio do perímetro ( $\mu\text{m}$ ) nos segmentos proximal, medial e distal.

Região	Média ( $\mu\text{m}$ ) $\pm$ erro padrão
proximal	2528,0 $\pm$ 226,7
medial	1466,1 $\pm$ 180,6
distal	2334,6 $\pm$ 320,3

Analisando a Tabela 6, pode ser observado que, em função de o valor médio do perímetro das regiões proximal e distal ter sido muito próximo, a região medial difere das demais, ou seja, há diferença entre as regiões proximal e medial, mas não há entre as regiões proximal e distal. A região medial apresenta o menor valor, em média, de perímetro.

A Figura 26 mostra a relação do perímetro em função dos grupos de estudo e da região do nervo.



**FIGURA 26.** Relação do perímetro ( $\mu\text{m}$ ) em função dos grupos de estudo (controle, sistêmico e local) e da região do nervo (proximal, medial e distal).



Pela análise da Figura 26, verifica-se que o grupo sistêmico apresentou melhor regeneração (região medial apresenta maior valor) em relação aos grupos controle e local.

### 6.3.2 Área do nervo

A Tabela 7 apresenta os dados descritivos das áreas do nervo ( $\mu\text{m}^2$ ) nos segmentos proximal, medial e distal dos grupos controle, sistêmico e local.

**TABELA 7.** Média ( $\pm$  DP) da área para comparação entre os grupos controle, sistêmico e local após 90 dias de pós-operatório.

Região	Grupo	Média ( $\mu\text{m}^2$ )
Proximal	Controle	$389046,2 \pm 1,9 \times 10^5$
	Sistêmico	$1,0713 \times 10^6 \pm 5,4 \times 10^5$
	Local	$487339,9 \pm 6,2 \times 10^5$
Medial	Controle	$112499,2 \pm 9,4 \times 10^5$
	Sistêmico	$287940,8 \pm 2,7 \times 10^5$
	Local	$185991,9 \pm 2,0 \times 10^5$
Distal	Controle	$389413,3 \pm 5,1 \times 10^5$
	Sistêmico	$676561,5 \pm 4,0 \times 10^5$
	Local	$506700,6 \pm 6,0 \times 10^5$

Sobre essa variável, em termos descritivos apenas, os grupos estudados demonstraram diferença na área das três regiões.

Já para o teste *Between-Subjects*, o valor de p foi de 0,144 ( $p > 0,05$ ) com poder de 0,382 ( $\text{poder} < 0,80$ ) indicando que não há evidências de diferença

entre as médias das áreas entre os grupos. A Tabela 8 apresenta o valor médio da área encontrada nos três grupos.

**TABELA 8.** Valor médio da área ( $\mu\text{m}^2$ ) nos grupos controle, sistêmico e local.

Grupo	Média ( $\mu\text{m}^2$ ) $\pm$ erro padrão
Controle	296986,3 $\pm$ 136000,2
Sistêmico	678604,3 $\pm$ 136000,2
Local	393344,2 $\pm$ 101368,6

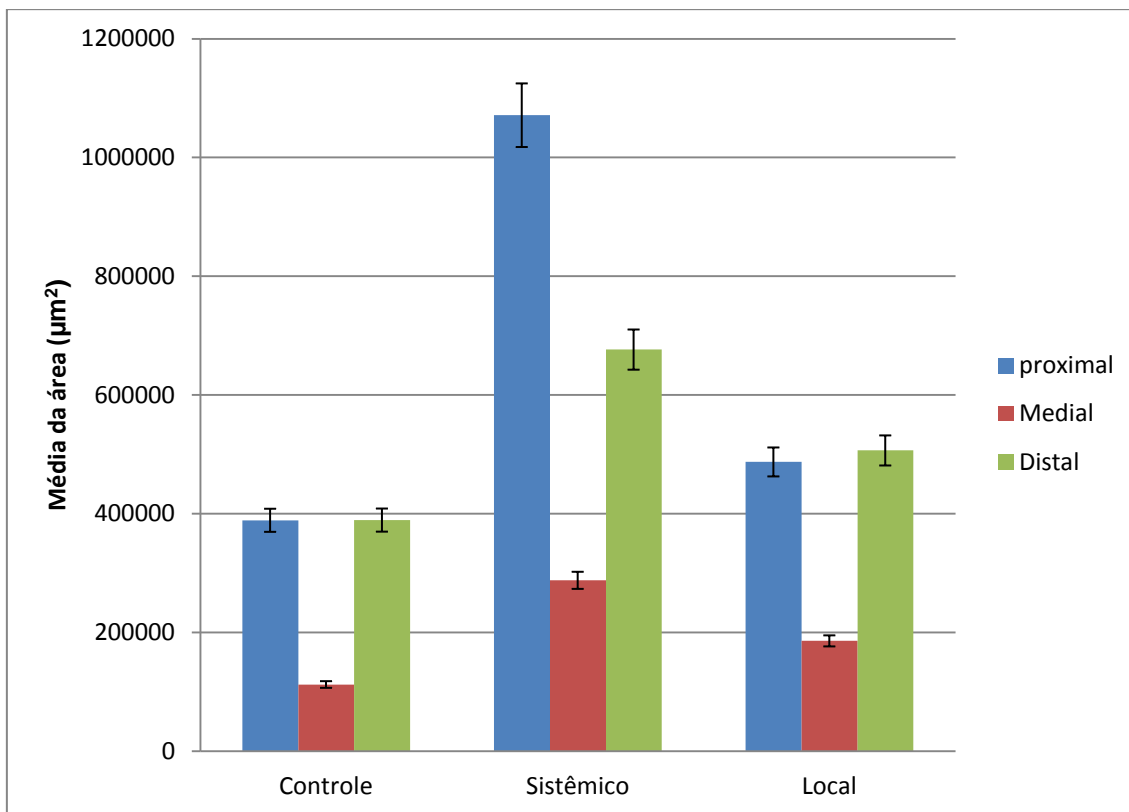
Analisando a Tabela 8, pode ser observado que o valor médio da área para o grupo sistêmico foi maior em relação aos grupos controle e local.

A Tabela 9 apresenta o valor médio da área encontrada nos três segmentos do nervo (proximal, medial e distal).

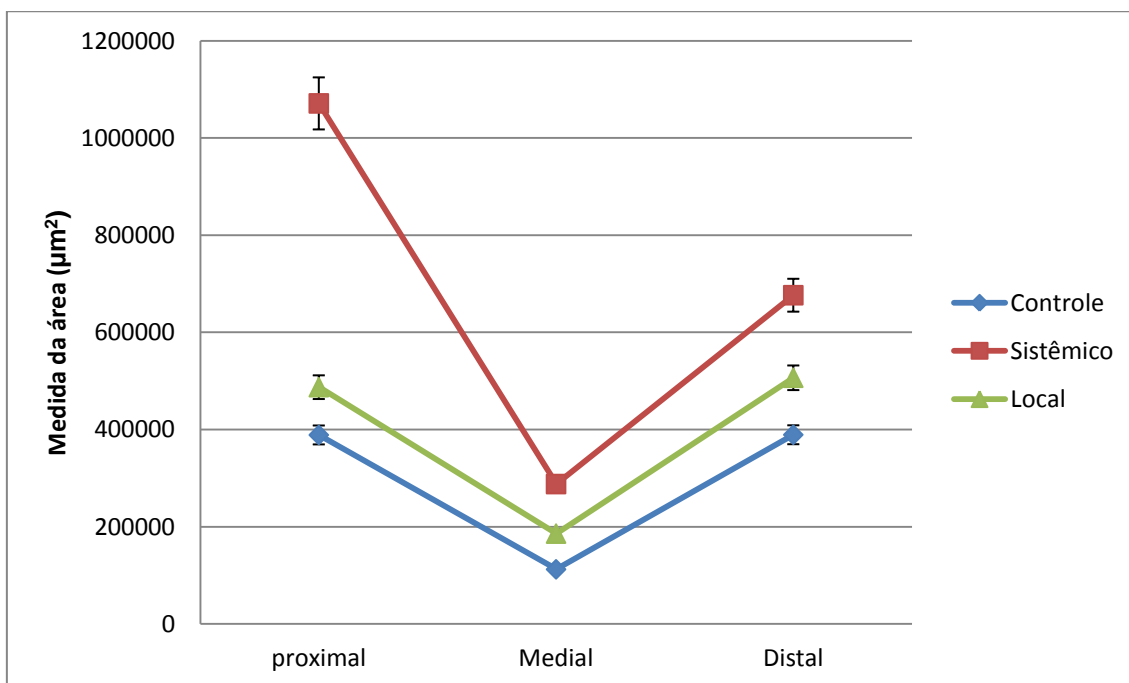
**TABELA 9.** Valor médio da área ( $\mu\text{m}^2$ ) nos segmentos proximal, medial e distal.

Região	Média ( $\mu\text{m}^2$ ) $\pm$ erro padrão
proximal	649232,2 $\pm$ 124616,2
medial	195477,3 $\pm$ 47992,2
distal	524225,1 $\pm$ 127979,5

Através da análise da Tabela 9, pode ser observado que o segmento medial apresenta, em média, a menor área. As Figuras 27 e 28 mostram a medida da área em função dos grupos de estudo e da região do nervo.



**FIGURA 27.** Medida da área ( $\mu\text{m}^2$ ) em função dos grupos de estudo (controle, sistêmico e local) e da região do nervo (proximal, medial e distal).



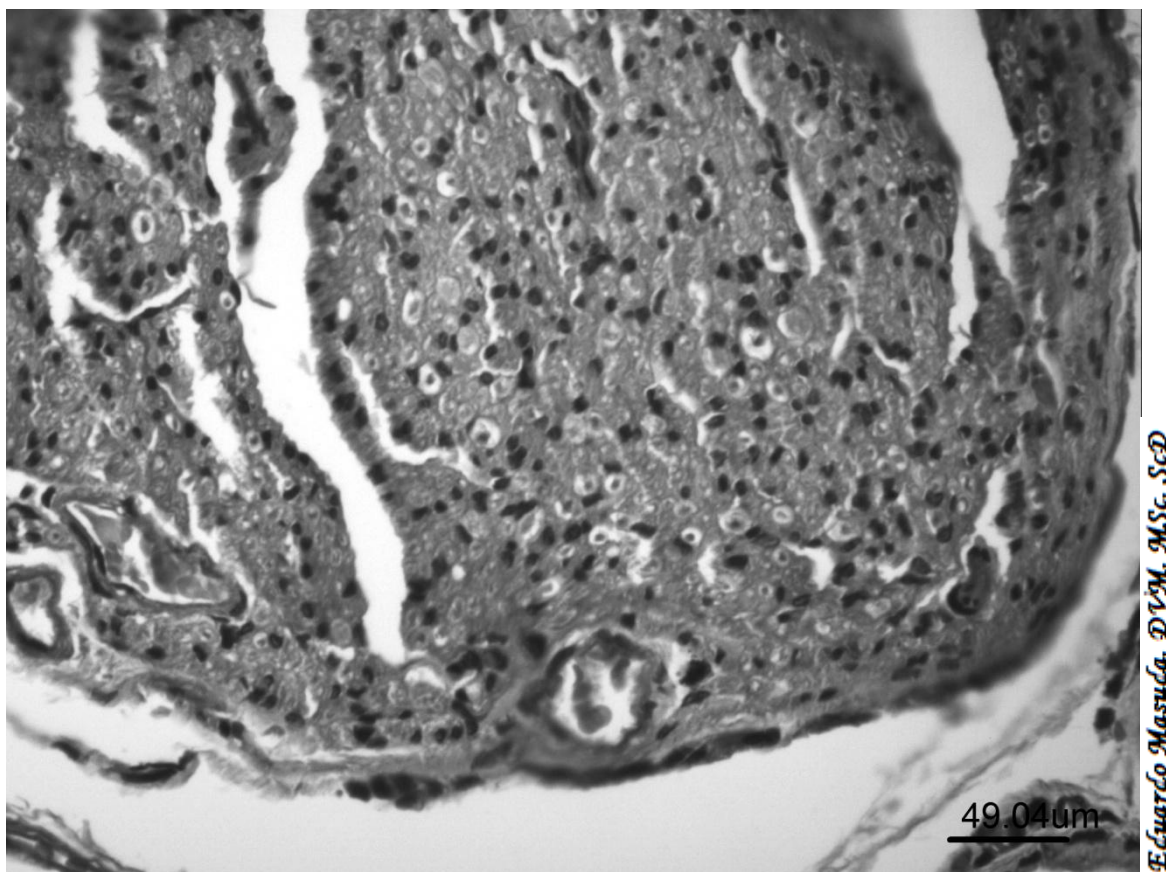
**FIGURA 28.** Medida da área ( $\mu\text{m}^2$ ) em função dos grupos de estudo (controle, sistêmico e local) e da região do nervo (proximal, medial e distal).

Pela análise das Figuras 27 e 28, verifica-se que, para o grupo sistêmico, a área da região medial (região do segmento regenerado) foi maior.

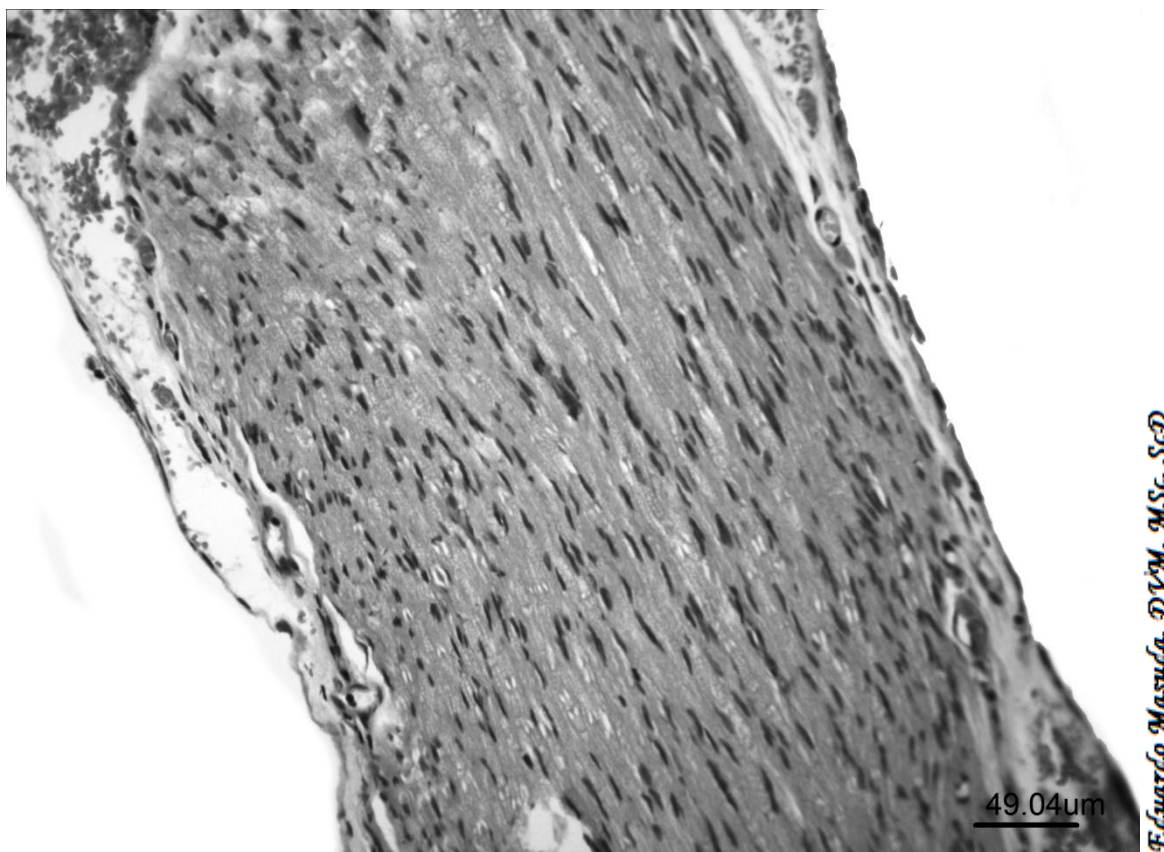
#### 6.4. ANÁLISE MORFOLÓGICA

A análise morfológica foi realizada nos três segmentos (proximal, médio e distal) dos nervos ciáticos dos três grupos após 90 dias de tratamento. Foram avaliadas as presenças de células de Schwann e Axônios.

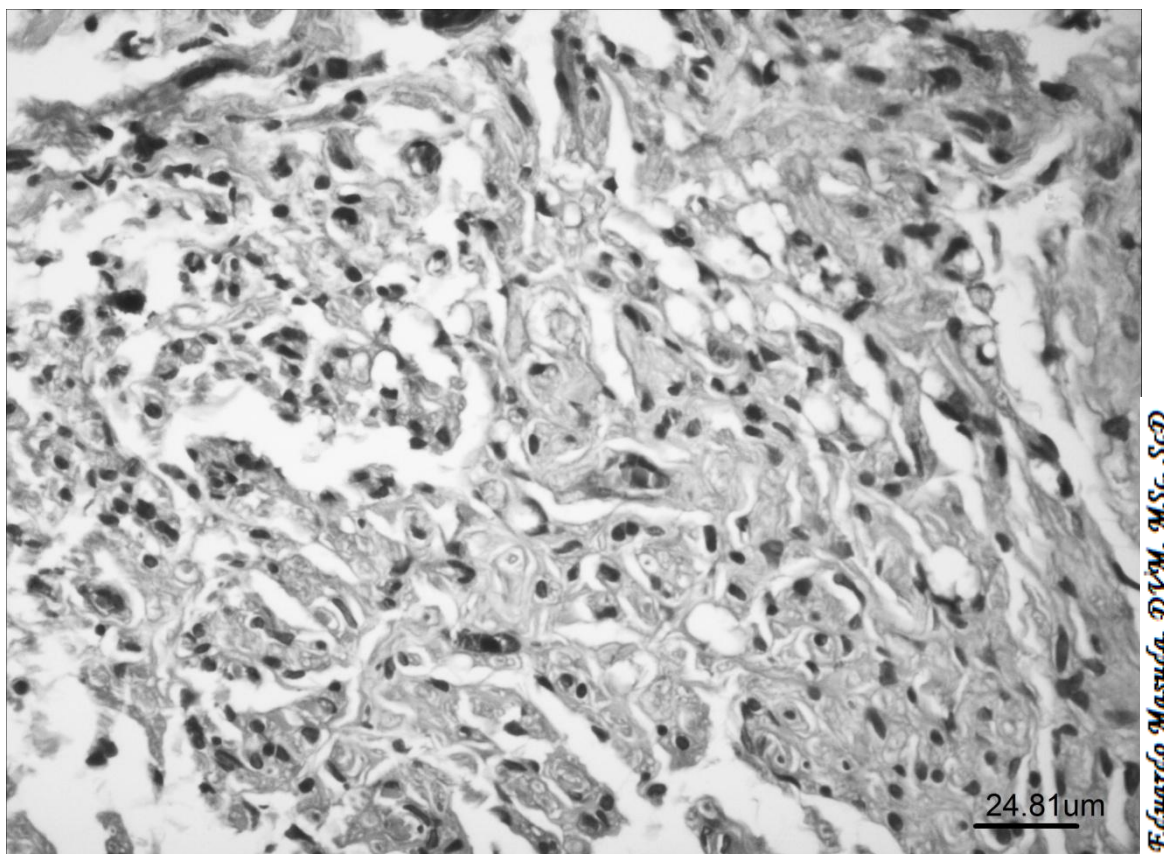
Foi observada a presença de células de Schwann e Axônios nos três segmentos do nervo (proximal, medial e distal) nos três grupos de estudo. As Figuras 29 a 37 demonstram, respectivamente, exemplares dos segmentos proximal, medial e distal nos grupos Controle, Sistêmico e Local.



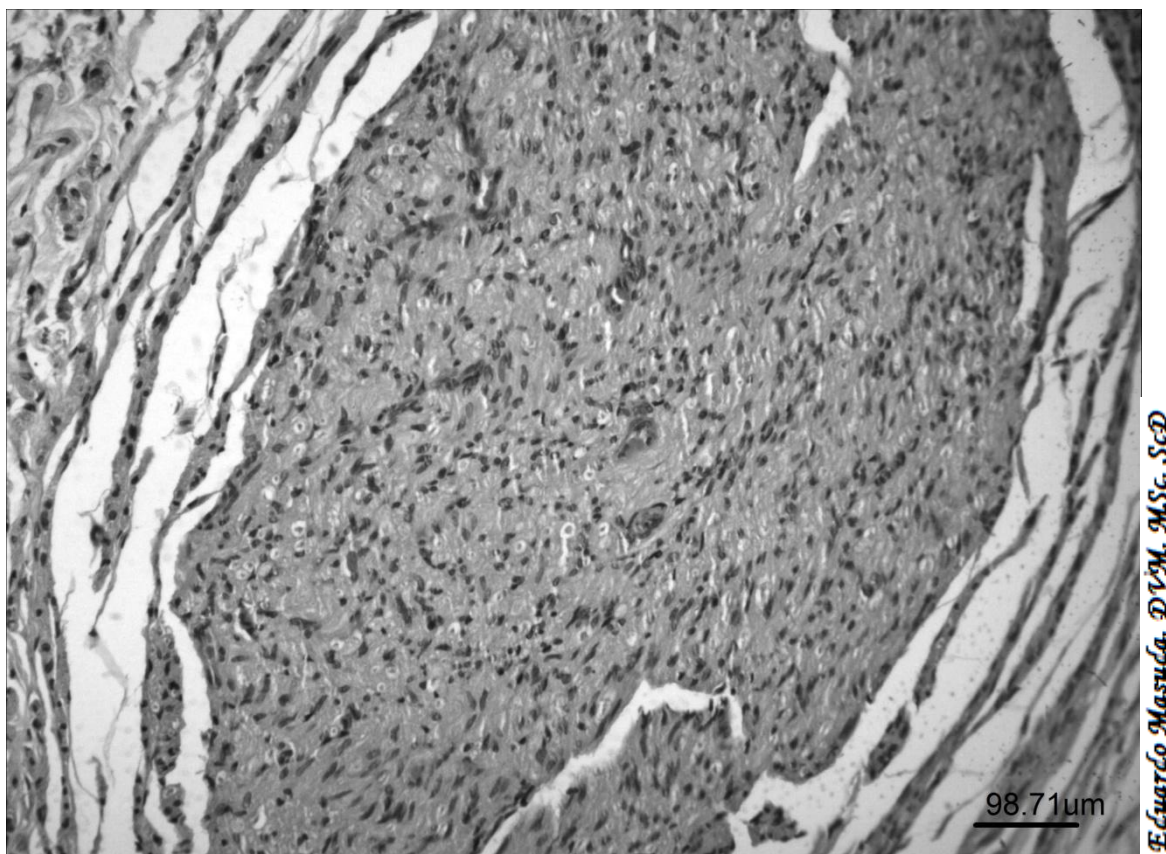
**FIGURA 29.** Segmento proximal do nervo ciático do grupo controle após 90 dias.



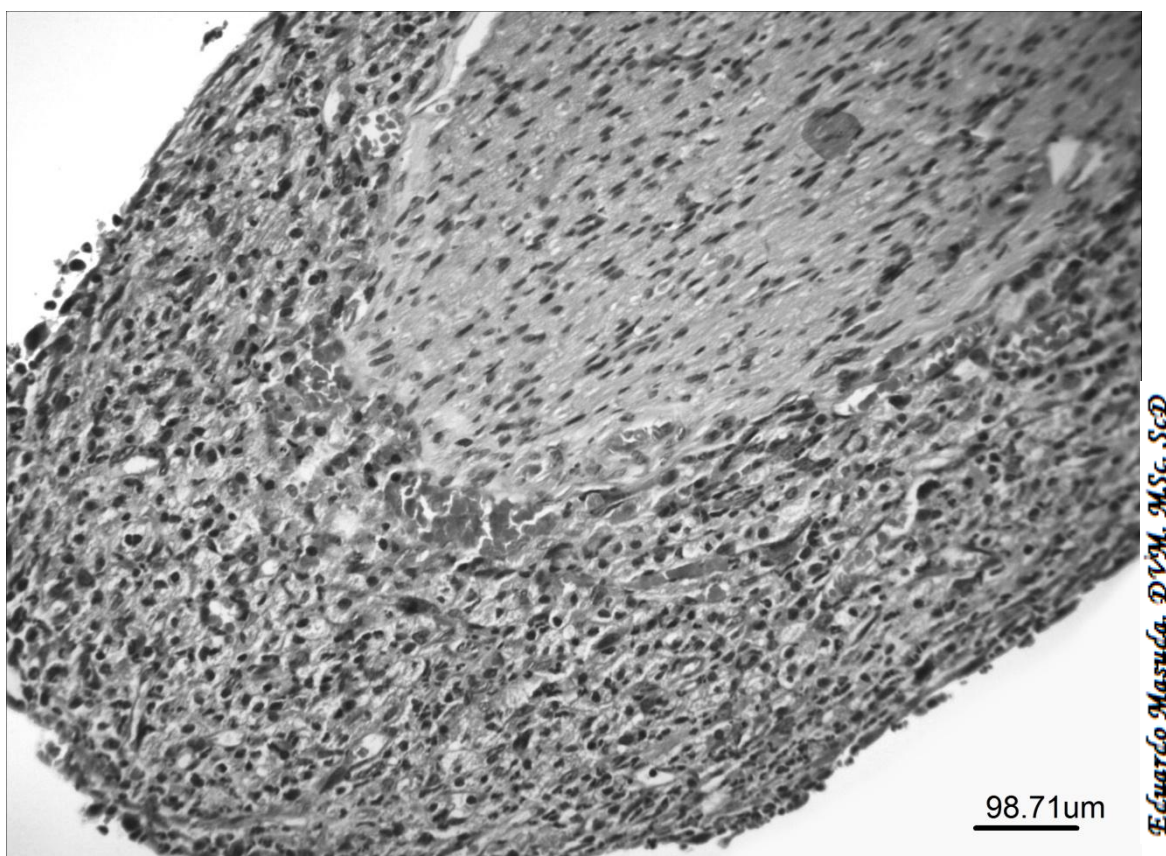
**FIGURA 30.** Segmento medial do nervo ciático do grupo controle após 90 dias.



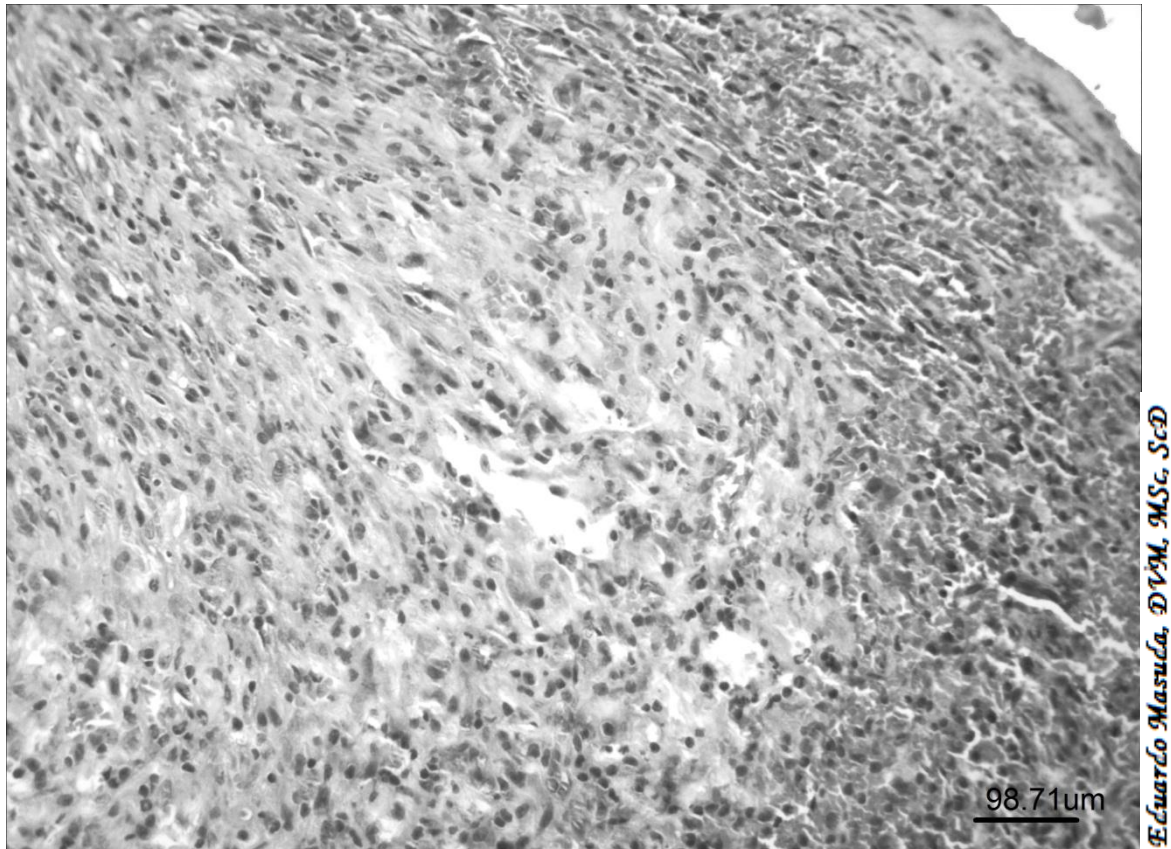
**FIGURA 31.** Segmento distal do nervo ciático do grupo controle após 90 dias.



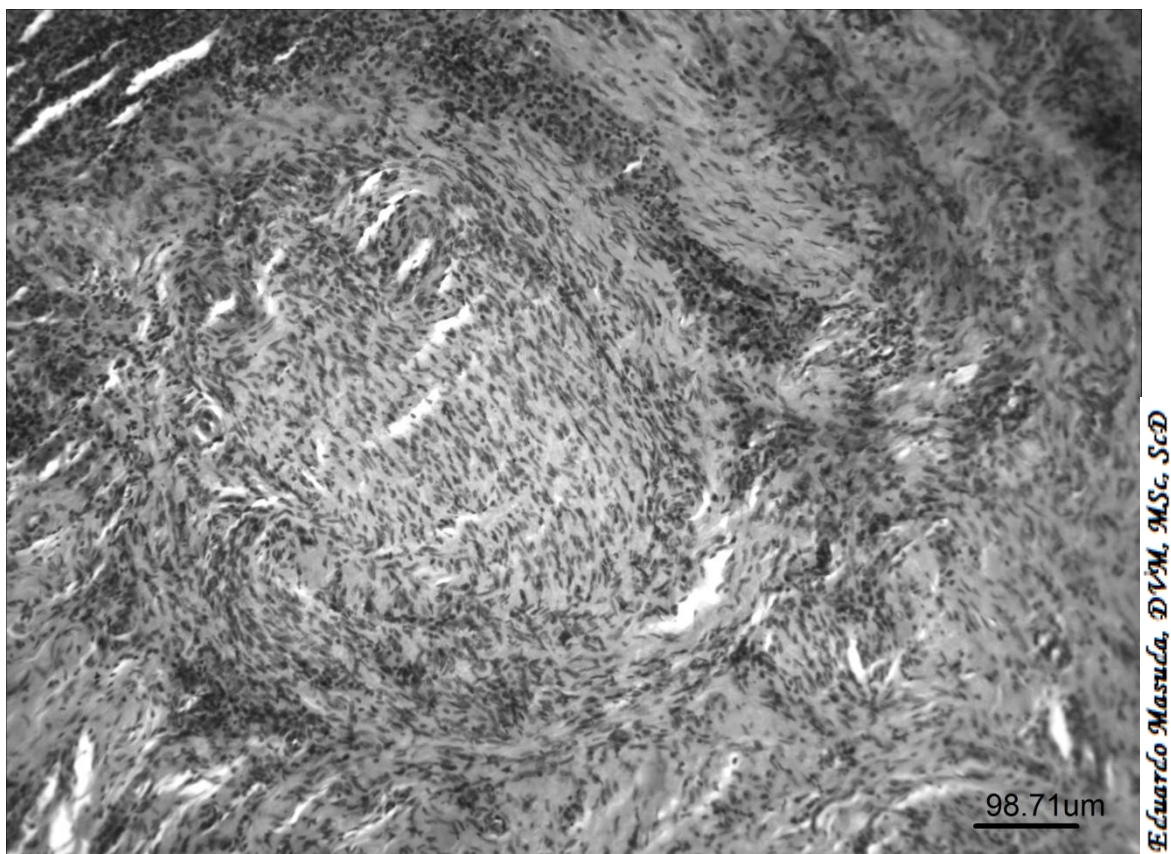
**FIGURA 32.** Segmento proximal do nervo ciático do grupo sistêmico após 90 dias.



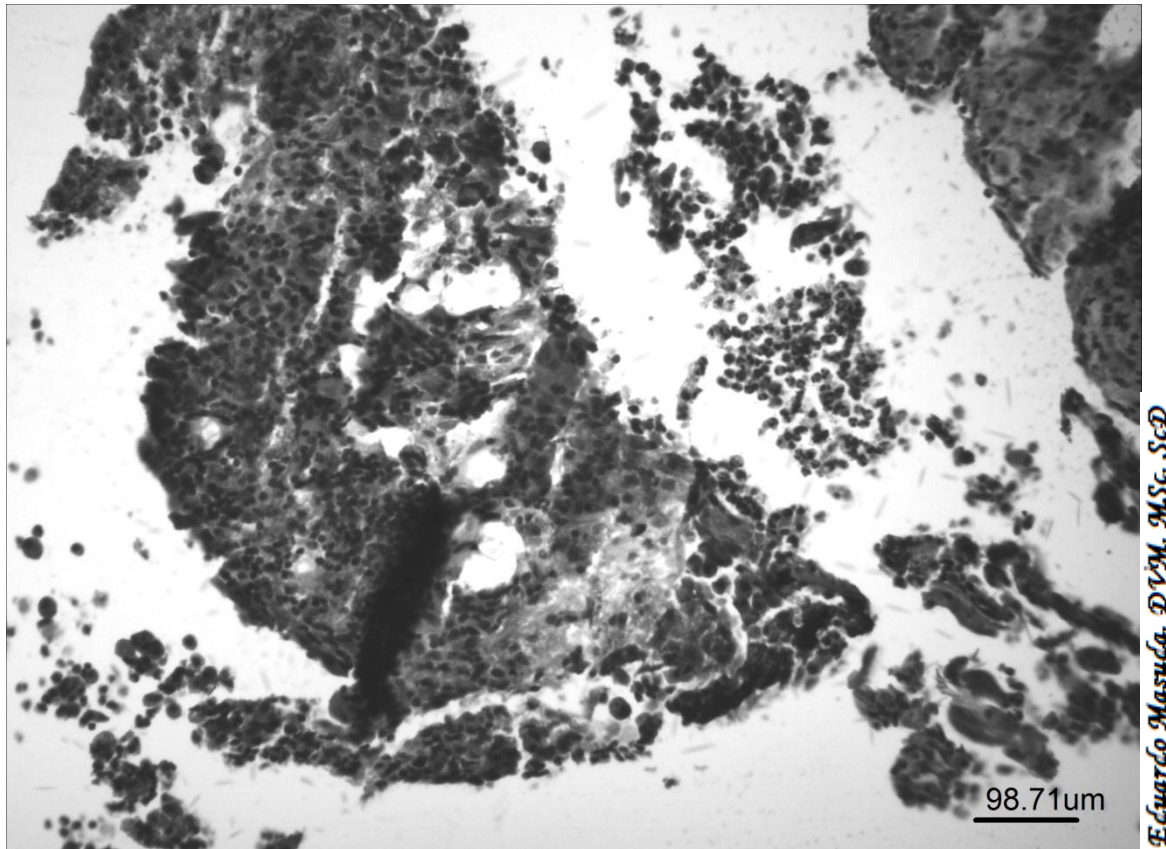
**FIGURA 33.** Segmento medial do nervo ciático do grupo sistêmico após 90 dias.



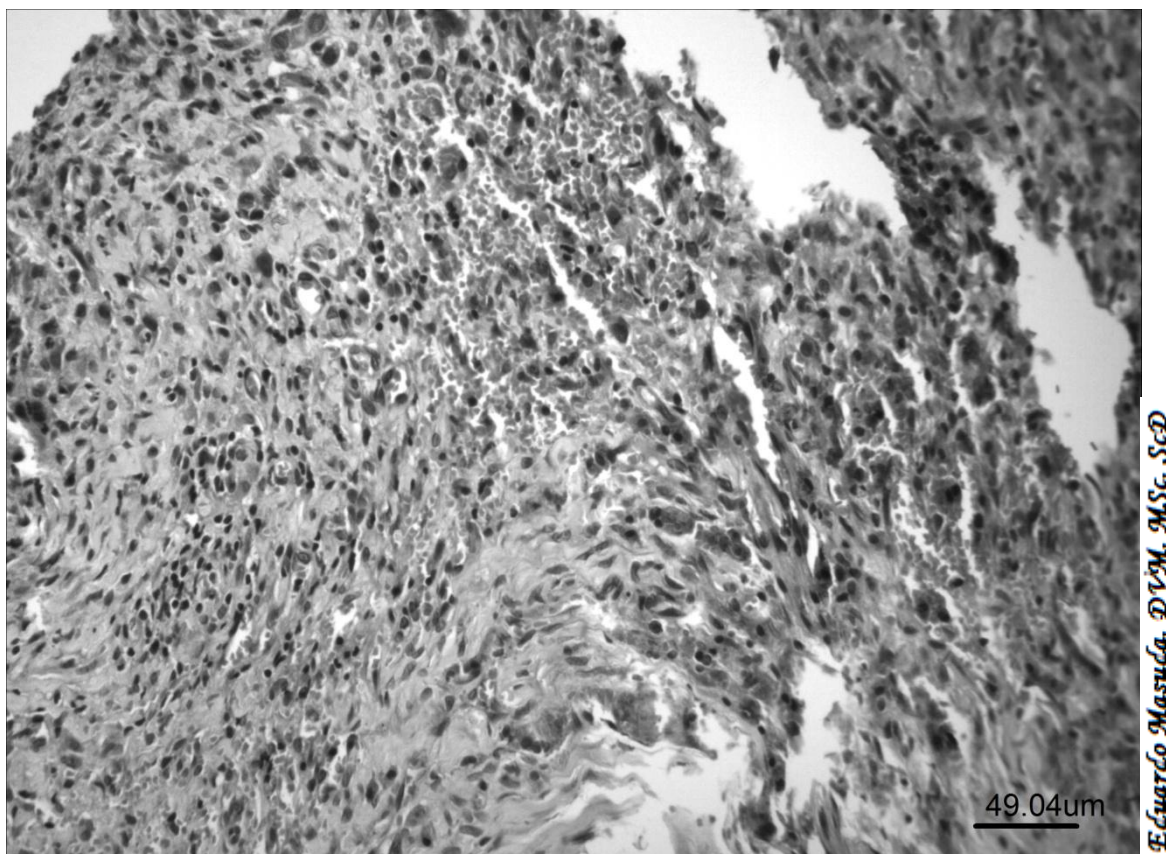
**FIGURA 34.** Segmento distal do nervo ciático do grupo sistêmico após 90 dias.



**FIGURA 35.** Segmento proximal do nervo ciático do grupo local após 90 dias.



**FIGURA 36.** Segmento medial do nervo ciático do grupo local após 90 dias.



**FIGURA 37.** Segmento distal do nervo ciático do grupo local após 90 dias.



Pela análise das Figuras 29, 30 e 31, pode-se observar que, independentemente do segmento analisado, há presença de células de Schwann assim como quantidades variáveis de axônios. Já as Figuras 32, 33 e 34, representando o grupo sistêmico, para o segmento proximal, também há grande quantidade de células de Schwann bem como de axônios. No segmento medial, contudo, há presença de infiltrado plasmocítico e hemorragia. No segmento distal, há bom número de células de Schwann, poucos axônios, além de hemorragia, infiltração de adipócitos, infiltrado plasmocítico e macrófagos. As Figuras 35, 36 e 37, representando o grupo local, para o segmento proximal, há muito infiltrado linfoplasmocítico, além de hemorragia e tecido conjuntivo. No segmento medial, há muito infiltrado linfoplasmocítico, macrófagos e necrose. No segmento distal, também há muito infiltrado linfoplasmocítico, macrófagos e hemorragia.

## **7. DISCUSSÃO**

Em relação à análise funcional da regeneração nervosa (índice de função ciática, SFI), os resultados indicaram uma melhora significativa após 90 dias pós-operatórios, ou seja, há uma nítida interação entre o tempo de tratamento e o grupo. Aos 60 dias, os três grupos experimentais apresentam praticamente o mesmo valor do SFI demonstrando que, para esse tipo de lesão, esse seria um tempo muito curto para permitir a ação do fator de crescimento e conseqüente regeneração. Pode-se, inclusive, supor que, para tempos maiores de tratamento como, por exemplo, 120, 150 dias talvez os resultados fossem ainda melhores. Quando comparados os grupos em 30, 60 e 90 dias, o valor de p (ao nível de 1%) foi significativo para 30 e 90 dias, enfatizando que, em 60 dias, ocorre um equilíbrio entre os três grupos experimentais. Os dois grupos que receberam tratamento (sistêmico e local) obtiveram melhora funcional significativa, ao passo que o grupo controle apresentou pouca variação na análise da marcha. Rustemeyer e colaboradores observaram melhora no índice de função ciática em 60 e 90 dias pós-operatórios através de tratamento com FK506 na mesma dose (0,1 mg/kg/d)

via sistêmica (injeção intramuscular). Devido à inexistência de outros trabalhos que tenham empregado o FK506 juntamente com a técnica de tubulização e dispositivos osmóticos, esses dados precisam ser investigados e comparados em trabalhos futuros.

Em relação à análise histológica, foram evidenciadas diferenças entre os grupos controle, sistêmico e local. O grupo controle apresentou, nos três segmentos (proximal, medial e distal), bom número de axônios e células de Schwann com distribuição regular e pouco tecido conjuntivo entre as fibras. Isso indica que estava ocorrendo o processo de regeneração nervosa no sítio estudado devido, principalmente, ao grande número de células de Schwann.

As células de Schwann são as principais mediadoras da regeneração. Sofrem divisão mitótica imediatamente após a lesão, se diferenciam e regulam a expressão gênica de moléculas envolvidas na degeneração e regeneração. Desprovidas de axônios, tornam-se alongadas e se unem a células de Schwann vizinhas, formando as Bandas de Bungner no interior dos tubos de membrana basal. Nesta fase a síntese de fatores neurotróficos aumenta e, como a lâmina basal das células de Schwann permanece íntegra durante a degeneração Walleriana, serve de guia para o brotamento dos axônios durante a reinervação (SILVA, JA, 2010).

A regeneração inicia aproximadamente 6 horas após a lesão, quando os axônios proximais formam um cone de crescimento, de onde surgem os primeiros brotos axonais. Cada axônio emite 2 a 3 brotos em direção ao músculo para restabelecimento da função, os quais são atraídos por fatores tróficos presentes na membrana basal das células de Schwann, especialmente a laminina e a fibronectina, que aceleram a regeneração axonal (SILVA, JA, 2010).

Embora o tempo de tratamento para esse tipo de lesão já esteja estabelecido e padronizado na literatura, esse trabalho verificou que, ao fazer uma ação combinada entre droga imunossupressora, tubulização e

dispensação contínua da droga, o tempo para verificação da regeneração tende a ser maior que 90 dias. Tal constatação baseia-se na análise gráfica do teste funcional bem como nas relações dos segmentos, ou seja, a relação proximal/medial é significativa, porém medial/distal não é. A análise morfológica (presença de células de Schwann e axônios nos três segmentos dos três grupos) também reforça essa ideia, isto é, se o tratamento tivesse sido prolongado, talvez fosse possível obter resultados morfométricos e morfológicos melhores nos segmentos medial e distal, principalmente.

O grupo sistêmico, para o segmento proximal, também apresenta grande quantidade de células de Schwann bem como de axônios. Nos segmentos medial e distal, contudo, além da presença de células de Schwann e axônios, há também presença de infiltrado plasmocítico além de hemorragia, infiltração de adipócitos e macrófagos, indicando presença de processo inflamatório. Mesmo assim, a presença de células de Schwann e axônios assinala, mesmo com alguma reação inflamatória, processo regenerativo em andamento.

No grupo local, por outro lado, verifica-se, nos três segmentos, muito infiltrado linfoplasmocítico, além de hemorragia, tecido conjuntivo, macrófagos e necrose, indicando que houve uma reação adversa (de defesa) do organismo não reconhecendo a droga como um fator para auxiliar a regeneração, mas sim como um corpo estranho gerando inflamação.

Estes resultados não estão de acordo com a recuperação funcional encontrada nos três grupos pelo SFI. A análise histológica mostrou que mesmo apresentando recuperação da função motora (grupos sistêmico e local), os nervos ciáticos dos ratos do grupo local permaneceram com a presença de processos degenerativos, inflamatórios, macrófagos, hemorragia e necrose.

A análise morfométrica demonstrou que, tanto para o perímetro quanto para a área, ao comparar os grupos controle, sistêmico e local, os valores são maiores no grupo sistêmico, independente da região (proximal, medial ou

distal). Entretanto, ao comparar as três regiões, a região medial foi a que apresentou os menores valores de perímetro e área.

A análise morfométrica após lesão traumática de nervo evidencia as condições tróficas dos nervos, porém não reproduz a capacidade funcional. Diversos autores que pesquisam regeneração de lesões traumáticas de nervos periféricos não encontraram relação entre SFI e análises morfométricas, estando estes de acordo com os achados desta pesquisa.

Na reparação nervosa, a principal meta a ser alcançada é a recuperação funcional das estruturas lesadas. Foi constatado no nosso trabalho que, mesmo não apresentando diferenças morfológicas e morfométricas significantes, o grupo local apresentou recuperação funcional adequada demonstrada no teste de marcha pelo SFI.

É importante salientar, portanto, que, provavelmente com um período mais longo de observação, o resultado morfométrico das fibras nervosas fosse compatível com o resultado funcional obtido.

Os dados do presente estudo sugerem que a droga imunossupressora FK506 possui efeito positivo, dependendo da via de aplicação, na melhora funcional nervosa e o uso de minibombas osmóticas é eficaz na dispensação contínua da droga.

## **8. CONCLUSÕES**

- A via sistêmica apresentou os melhores resultados morfométricos, indicando que, ao relacionar o grupo controle (sem tratamento) com o grupo local (com tratamento), não há diferenças, ou seja, o fator tratamento (presença do FK506 no grupo local) na relação entre esses dois grupos não foi significativo.
- A via local apresentou os melhores resultados funcionais.

- A efetividade da atuação das minibombas osmóticas foi inferida principalmente pelos resultados morfológicos encontrados no grupo local, ou seja, a presença do fator neurotrófico no grupo local provocou uma reação inflamatória culminando com a presença de macrófagos e morte celular, fato esse não observado quando da aplicação sistêmica.
- Em termos morfológicos, o fator local não potencializa a processo de regeneração nervosa. Pelo contrário, acarreta em processos inflamatórios e morte celular.
- A análise funcional demonstrou que o grupo local foi o que apresentou os melhores resultados. Tais dados não foram comprovados através das análises morfométrica e morfológica.
- A recuperação funcional foi alcançada, fato comprovado pelo SFI.
- Novos estudos empregando FK506 juntamente com a técnica de tubulização e dispensação contínua através de minibombas osmóticas são necessários para comprovação da sua eficácia em lesões de nervos periféricos com perda de substância.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

Rodríguez FJ, Valero-Cabré A, Navarro X. Regeneration and functional recovery following peripheral nerve injury. *Drug Discovery Today: Disease Models*. 2004;1(2):177-85.

Chalfoun CT, Wirth GA, Evans GR. Tissue engineered nerve constructs: where do we stand? *J Cell Mol Med*. 2006 Apr-Jun;10(2):309-17.

Sebben AD, Lichtenfels M, Silva JB. Peripheral nerve regeneration: cell therapy and neurotrophic factors. *Rev Bras Ortop*. 2011;46(6):643-49

Oliveira ALR, Pierucci A, Pereira KB. Peripheral nerve regeneration through the nerve tubulization technique. *Brazilian Journal of Morphological Sciences* 2004;21(4): 225-31

Pabari, A.; Yang, S.U.; Seifalian, A.M.; Mosahebi, A. Modern surgical management of peripheral nerve gap. *Journal of Plastic, Reconstructive and Aesthetic Surgery* (2010) doi: 10.1016/j.bjps.2009.12.010

Da Silva CK, Camargo EA. Mecanismos envolvidos na regeneração de lesões nervosas periféricas. *Rev. Saúde Pesq*. 2010; 3 (1): 93-99.

Ichihara S, Inada Y, Nakamura T. Artificial nerve tubes and their application for repair of peripheral nerve injury: an update of current concepts. *Injury*. 2008;39 Suppl 4:29-39.

Lichtenfels, M. Efeito do plasma rico em plaquetas e de plaqueta rica em fibrina na regeneração de lesões com perda de substância do nervo ciático em ratos. Dissertação de Mestrado. Porto Alegre: PUCRS, 2012.

Daza CHM, Rengifo YR, Rubio JJS, Alzate LH, Hurtado H. Câmaras de silicona como injerto nervioso, análisis de la especialidad de regeneración del nervio peroneal o tibial :estúdio experimental em ratas. Rev Colomb de Ortop y Traumatol. 1993;13(3):285-92.

Lundborg G, Rósen B, Dahlin L, Danielsen N, Holmberg J. Tubular versus conventional repair of median and ulnar nerves in the human forearm: Early results from a prospective, randomized, clinical study. J Hand Surg AM. 1997 Jan;22(1):99-106.

Boyd JG, Gordon T. Neurotrophic factors and their receptors in axonal regeneration and functional recovery after peripheral nerve injury. Mol Neurobiol. 2003;27(3):277-324.

Rustemeyer, J; Krajacic, A; Dicke, U. Histomorphological and functional impacts of postoperative motor training in rats after allograft sciatic nerve transplantation under low-dose FK 506. 2009, 39: 480-488.

Udina, E., Rodriguez, F.J., Verdu, E. Espejo, M., Gold, B. G., Navarro, X. FK506 Enhances Regeneration of Axons Across Long Peripheral Nerve Gaps Repaired With Collagen Guides Seeded With Allogeneic Schwann Cells. GLIA. 2004;47:120–129.

Kei-ichi Muraoka, Koutaro Fujimoto, Xiangao Sun, Katsuji Yoshioka, Kou-ichi Shimizu, Masao Yagi, Henry Bose, Jr., Itsuo Miyazaki, and Ken-ichi Yamamoto. Rodkey, W.G.; Sharp, N.J.H. Immunosuppressant FK506 Induces Interleukin-6 Production through the Activation of Transcription Factor Nuclear Factor (NF)- $\kappa$ B - Implications for FK506 Nephropathy. J. Clin. Invest. 1996;11: 2433–2439.

Gold, BG; Katoh, K; Storm-Dickerson, T. The immunosuppressant FK506 increases the rate of axonal regeneration in rat sciatic nerve. 1995, 15(11): 7509-7516.

Gupta S, Singh RP, Sharma R, Kalyanwat R, Lokwani P. Osmotic Pumps: A Review. *Pharmacie Globale (IJCP)* 2011;6(02):1-8

Gordon T, Fu SY. Long-term response to nerve injury. *Adv Neurol.* 1997;72:185-99.

Tria MA, Fusco M, Vantini G, Mariot R. Pharmacokinetics of nerve growth factor (NGF) following different routes of administration to adult rats. *Exp Neurol.* 1994;127(2):178- 83.

Oyelese AA, Rizzo MA, Waxman SG, Kocsis JD. Differential effects of NGF and BDNF on axotomy-induced changes in GABA(A)-receptor-mediated conductance and sodium currents in cutaneous afferent neurons. *J Neurophysiol.* 1997;78(1):31-42.

Wongtrakul S, Bishop AT, Friedrich PF. Vascular endothelial growth factor promotion of neoangiogenesis in conventional nerve grafts. *J Hand Surg Am.* 2002;27(2):277-85.

Machado, A.B.M. *Neuroanatomia funcional*. 2ª Ed. São Paulo: Atheneu, 1998.

Murray, B. Trauma of the Nervous System: Peripheral Nerve Trauma. In: BRADLEY, W. G. et al. (Ed). *Neurology in Clinical Practice. Principles of Diagnosis and management*. 4. Ed. London: Butterworth Heinemann, 2005: 1179-1198.

Gartner LP, Hiatt JL. *Color text book of histology*. 3º ed. Philadelphia: Saunders; 2006.



Landon DN, Hall S. The myelinated nerve fiber. In: Landon DN, editor. The peripheral nerve. London: Chapman and Hall; 1976. p. 1-105.

Peters A, Palay SL, Webster HF. The fine structure of the nervous system: the neurons and sprouting cells. Philadelphia: Saunders; 1976.

Lundborg G. Peripheral nerve injuries: pathophysiology and strategies for treatment. J Hand Ther. 1993 Jul-Sep;6(3):179-88.

Mattar Júnior R, Azze RJ. Lesão dos nervos periféricos. In: Atualização em Traumatologia do Aparelho Locomotor. São Paulo: Publicação Oficial do Instituto de Ortopedia e Traumatologia do HC FMUSP; 1999 (Fascículo).

Pachioni, C.A.S et al. Lesão por esmagamento do nervo isquiático de ratos: um estudo da vascularização. Acta Ortopédica Brasileira, v. 14, n. 4, p. 203-207, 2006.

Shores, A. Sistema nervoso periférico. In: BOJRAB, M.J. Técnicas atuais em cirurgia de pequenos animais. São Paulo: Roca, 1996, p.49-60.

Shell, L.G. Afecções de nervos periféricos. In: BIRCHARD, S.J. e SHERDING, R.G. Manual Saunders clínica de pequenos animais. São Paulo: Roca, 2008, p.1329-1340.

Vicente, E.J.D.; Viotto, M.J.S.; Barbosa, C.A.A. et al. Estudo das relações anatômicas e suas variações entre o nervo ciático e o músculo piriforme. Revista Brasileira de Fisioterapia, v.11, n. 3, p. 227-232, 2007.

Taylor, S.M. Distúrbios neuromusculares. In: NELSON, R.W. E COUTO, C.G. Medicina interna de pequenos animais. 3 ed. Rio de Janeiro, Elsevier, 2006, p.1013-1025.

Seim III, Cirurgia dos nervos periféricos. In: FOSSUM, T.W. Cirurgia de pequenos animais. São Paulo: Roca, 2005, p.1336-1350.

Fonseca *et al.* Abordagem simplificada do nervo ciático por via posterior, no ponto médio do sulco glúteo-femoral, com o uso de neuroestimulador. Revista Brasileira de Anestesiologia, v.52, n.6, p. 764-773, 2002.

Duran WN, Mariscano TH, Anatomy of the microcirculation. In: Serafin D, Buncke Jr. HJ. Microsurgical composite tissue transplantation. St. Louis: Mosby Company, 1979. p. 17-30.

Vloka JD, Hadzic A, April E, Thys DM, The division of the sciatic nerve in the popliteal fossa: anatomical implications for popliteal nerve blockade. Anesth. Analg. 2001; 92:215-217.

Seim III DVM. Pheripheral nerve surgery. In: Fossum TW, editor. Small Animal Surgery. 2ª ed. St. Louis: Mosby; 2002. p. 1336-50.

Mirsky R, Jessen KR. Embryonic and early postnatal development of Schwann cells. In: Jessen KR, Richardson WD, editors. Glial cell development. 2 ed. New York: Oxford; 2001. p. 1-20.

Thomas PK. Changes in the Endoneurial Sheaths of Peripheral Myelinated Nerve Fibres During Wallerian Degeneration. J Anat. 1964;98:175-82.

Zochodne DW. The microenvironment of injured and regenerating peripheral nerves. Muscle Nerve Suppl. 2000;9:S33-8.

Osbourne A. Peripheral Nerve Injury and Repair. TSMJ 2007;8:29-33.

Campbell WW. Evaluation and management of peripheral nerve injury. Clinical Neurophysiology. 2008;119:1951–1965.

Lee SK, Wolfe SW. Peripheral Nerve Injury and Repair. *Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons*. 2000;8(4):243-253.

Lunn ER, Brown MC, Perry VH. The pattern of axonal degeneration in the peripheral nervous system varies with different types of lesion. *Neuroscience*. 1990;35(1):157-65.

Kiefer R, Kieseier BC, Stoll G, Hartung HP. The role of macrophages in immune-mediated damage to the peripheral nervous system. *Prog Neurobiol*. 2001;64(2):109-27.

Rutkowski JL, Tuite GF, Lincoln PM, Boyer PJ, Tennekoon GI, Kunkel SL. Signals for proinflammatory cytokine secretion by human Schwann cells. *J Neuroimmunol*. 1999;1;101(1):47-60.

Cheng C, Zochodne DW. In vivo proliferation, migration and phenotypic changes of Schwann cells in the presence of myelinated fibers. *Neuroscience*. 2002;115(1):321-9.

Braga-Silva J. The use of silicone tubing in the late repair of the median and ulnar nerves in the forearm. *J Hand Surg Br*. 1999;24(6):703-6.

Shores A. Lesão e reparo do nervo periférico In: Bojrab MJ, editor. *Técnicas atuais em cirurgia de pequenos animais*. 3º ed. São Paulo: Roca; 1996. p. 49-56.

Colomé LM, Gomes C, Crosignani N, Paz AH, Lugo AA, Guimarães KM, et al. Utilização de células-tronco autólogas de medula óssea na regeneração do nervo tibial de coelhos mediante técnica de tubulização com prótese de silicone. *Ciência Rural*. 2008;38(92529-2534):2529-34.

Braga Silva J, Gehlen D, Javier ARR, Menta C, Atkinson EA, Machado DC, et al. 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 Ortopedica Brasileira*. 2006;14(5):273-5.

Sariguney Y, Yavuzer R, Elmas C, Yenicesu I, Bolay H, Atabay K. Effect of platelet-rich plasma on peripheral nerve regeneration. *J Reconstr Microsurg*. 2008;24(3):159-67.

Ely JB, Calteux N. Envelope venoso, contribuição experimental à cirurgia dos nervos periféricos. *Revista AMRIGS*. 1983;27(4):454-61.

Labrador RO, Buti M, Navarro X. Influence of collagen and laminin gels concentration on nerve regeneration after resection and tube repair. *Exp Neurol*. 1998;149(1):243-52.

Pinedo UG. Utilización de prótesis de quitosana y silicona em la regeneración del nervio ciático axotomizado de ratas. . *Archivos de neurociencias mexicanas*. 2001;6(4):184-93.

Schmidt CE, Leach JB. Neural tissue engineering: strategies for repair and regeneration. *Annu Rev Biomed Eng*. 2003;5:293-347.

Lee AC, Yu VM, Lowe JB, 3rd, Brenner MJ, Hunter DA, Mackinnon SE, et al. Controlled release of nerve growth factor enhances sciatic nerve regeneration. *Exp Neurol*. 2003;184(1):295-303.

<http://www.neuralrepairinstitute.org/neurotrophicfactors.html>, Acessado em 21 de fevereiro de 2014.

Yin Q, Kemp GJ, Frostick SP. Neurotrophins, neurones and peripheral nerve regeneration. *J Hand Surg Br*. 1998;23(4):433-7.

Yoshinori T, Shinji I, Hideto K, Miwako K, Isamu Y, Toshiyuki K, Hiroshi U, Tomoya T, Hitoshi Y, Lawrence C, Hiroshi K, Yoshitaka M. Brain-Derived Neurotrophic Factor from Bone Marrow-Derived Cells Promotes Post-Injury Repair of Peripheral Nerve. PLOS ONE (2012);7(9):e44592

Terenghi G, Peripheral nerve regeneration and neurotrophic factors. Review J. Anat. 1999;194:1±14

Yates JM, Smith KG, Robinson PP. The effect of brain-derived neurotrophic factor on sensory and autonomic function after lingual nerve repair. Exp Neurol. 2004;190(2):495-505.

Henderson CE, Phillips HS, Pollock RA, Davies AM, Lemeulle C, Armanini M, et al. GDNF: a potent survival factor for motoneurons present in peripheral nerve and muscle. Science. 1994;266(5187):1062-4.

Hoke A, Ho T, Crawford TO, LeBel C, Hilt D, Griffin JW. Glial cell line-derived neurotrophic factor alters axon schwann cell units and promotes myelination in unmyelinated nerve fibers. J Neurosci. 2003;23(2):561-7.

Sterne GD, Coulton GR, Brown RA, Green CJ, Terenghi G. Neurotrophin-3–enhanced Nerve Regeneration Selectively Improves Recovery of Muscle Fibers Expressing Myosin Heavy Chains 2b. The Journal of Cell Biology. 1997; 139(3):709–715.

English AW, Schwartz G, Meador W, Sabatier MJ, Mulligan A. Electrical Stimulation Promotes Peripheral Axon Regeneration By Enhanced Neuronal Neurotrophin Signaling. Journal of Neurobiology. 2006; DOI 10.1002/neu

Rustemeyer J, van de Wal R, Keipert C, Dicke U. Administration of low-dose FK 506 accelerates histomorphometric regeneration and functional outcomes after allograft nerve repair in a rat model. J Craniomaxillofac Surg. 2010;38(2):134-40. doi: 10.1016/j.jcms.2009.03.008.

Jifeng H, Dezhong L, Qiongjiao Y, Huayong Z, Shipu L. Evaluation of PRGD/FK506/NGF conduits for peripheral nerve regeneration in rats. *Neurol India*. 2010;58(3):384-91. doi: 10.4103/0028-3886.65810.

Gold BG. FK506 and the role of immunophilins in nerve regeneration. *Mol Neurobiol*. 1997;15(3):285-306.

Yu H, Peng J, Guo Q, Zhang L, Li Z, Zhao B, et al. Improvement of peripheral nerve regeneration in acellular nerve grafts with local release of nerve growth factor. *Microsurgery*. 2009;29(4):330-6.

Koka R, Hadlock TA. Quantification of Functional Recovery Following Rat Sciatic Nerve Transection. *Experimental Neurology* 2001;168(1):192–5.

de Medinaceli L, Prayon M, Merle M. Percentage of nerve injuries in which primary repair can be achieved by end-to-end approximation: review of 2,181 nerve lesions. *Microsurgery*. 1993;14:244-6.

Bain JR, Mackinnon SE, Hunter DA. Functional Evaluation of Complete Sciatic, Peroneal, and Posterior Tibial Nerve Lesions in the Rat. *Plast Reconstr Surg*. 1989;83(1):129-38.

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

Varejão, A. S. P. Meek, M. F. Ferreira, A. J. A. Patricio, J. A. B. Cabrita, A. M. S. Functional evaluation of peripheral nerve regeneration in the rat: walking track analysis. *J Neurosci Methods*. 2001;108(1):1-9.

Lindenau JDR, Guimarães LSP. Calculando o tamanho de efeito no SPSS. *Revista HCPA*. 2012;32(3):363-381


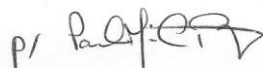

Paiva, F. P; Maffili, V. V; Santos, A. C. S. Curso de Manipulação de animais de laboratório. Ministério da Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz. Salvador, BA, 2005. 28p.

Hau J, Van Hoosier Jr GL. Handbook of Laboratory Animal Science. 2 ed. New York: CRC Press LLC; 2003

Chen, CJ; Ou, YC; Liao, SL; Chen, WY; Chen, SY; Wu, CW, et al. Transplantation of bone marrow stromal cells for peripheral nerve repair. *Experimental Neurology*. 2007; 204: 443-453.

Silva, JA. Influência da estimulação elétrica de alta voltagem sobre a população de células de schwann e vascularização no nervo após axoniotmese. 18º Congresso de Iniciação Científica no contexto da 8ª Mostra Acadêmica da Unimep, 2010.

## ANEXO A – CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA PARA USO DOS ANIMAIS

	<p>Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS</p>
Ofício 086/11 – CEUA	Porto Alegre, 12 de julho de 2011.
Senhor Pesquisador:	
A Comissão de Ética no Uso de Animais apreciou e aprovou seu protocolo de pesquisa, registro CEUA 11/00225, intitulado: <b>“Avaliação do potencial de regeneração de nervos periféricos do <i>Tacrolimus</i> (FK506) administrado a ratos wistar”</b> .	
Sua investigação está autorizada a partir da presente data.	
Atenciosamente,	
p/ 	
Profa. Dra. Anamaria Gonçalves Feijó Coordenadora da CEUA/PUCRS	
Ilmo. Sr. Prof. Dr. Jefferson Luis Braga da Silva N/Universidade	
	<p><b>Campus Central</b> Av. Ipiranga, 6690 – Prédio 60, sala 314 CEP: 90610-000 Fone/Fax: (51) 3320-3345 E-mail: <a href="mailto:ceua@puccrs.br">ceua@puccrs.br</a></p>





Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
COMITÊ DE ÉTICA PARA O USO DE ANIMAIS

### AValiação DE PROJETOS DE PESQUISA

<b>Título do projeto</b>
Avaliação do potencial de regeneração de nervos periféricos do <i>tacrolimus</i> (FK506) administrado a ratos wistar.
<b>Pesquisador: Jefferson Braga da Silva</b>
<b>Avaliação geral do projeto</b>
<input checked="" type="checkbox"/> Aprovado <input type="checkbox"/> Aprovado com recomendação <input type="checkbox"/> Pendente <input type="checkbox"/> Não aprovado
<b>Questões levantadas pelo CEUA – PUCRS</b>
Todos os questionamentos e correções solicitadas pela CEUA foram plenamente atendidos.

PUCRS

**Campus Central**  
Av. Ipiranga, 6690 – Prédio 60, sala 314  
CEP: 90610-000  
Fone/Fax: (51) 3320-3345  
E-mail: [ceua@pucrs.br](mailto:ceua@pucrs.br)

## ANEXO B – CARTA DE SUBMISSÃO DO ARTIGO CIENTÍFICO

 Journal of the Peripheral Nervous System

---

### Submission Confirmation

Thank you for submitting your manuscript to *Journal of the Peripheral Nervous System*.

Manuscript ID: PNS-14-07-00102

Title: Functional recovery after sciatic nerve transection and treatment through tubulization technique employing tacrolimus and osmotic minipumps

Authors: Goldani, Eduardo

Date Submitted: 18-Jul-2014

 Print  Return to Dashboard

---

© Thomson Reuters | © ScholarOne, Inc., 2014. All Rights Reserved.

ScholarOne Manuscripts and ScholarOne are registered trademarks of ScholarOne, Inc.  
ScholarOne Manuscripts Patents #7,257,767 and #7,263,655.

 @ScholarOneNews |  System Requirements |  Privacy Statement |  Terms of Use

**ANEXO C – ARTIGO ORIGINAL****Functional recovery after sciatic nerve transection and treatment through tubulization technique employing tacrolimus and osmotic minipumps**

**Eduardo Goldani,<sup>1</sup> Marco A.S Gelain,<sup>2</sup> Thomas Cardoso,<sup>2</sup> Alice C. Pellizzari,<sup>3</sup> Mariana D. Curra,<sup>3</sup> Thaís M.A Beuren,<sup>3</sup> Juliana O. Rangel,<sup>4</sup> Jefferson B. Silva,<sup>5</sup>**

*Laboratory of Medical Skills and Surgical Research, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil,<sup>1,4,5</sup> Faculty of Medicine, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil,<sup>3</sup> Faculty of Medicine, Federal University of Health Sciences of Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil,<sup>2</sup>*

Address correspondence to: Eduardo Goldani, Laboratory of Medical Skills and Surgical Research, São Lucas Hospital, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul (PUCRS), Ipiranga Avenue, 6690, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil. Tel: +5551 3353-4816. E-mail: eduardogoldani@gmail.com

**ABSTRACT**

Peripheral nerve injury (PNI) is a serious health concern for society and often causes long lasting disability. Nerve tubulization is recommended when there is too much tension for end-to-end coaptation and the gap between the stumps is shorter or equal to 3 cm. The immunosuppressive drug FK506 has been shown to have neuroprotective and neurotrophic actions in experimental models by increasing neurite elongation and accelerating the rate of nerve regeneration in vitro and in vivo. The aim of this study was to evaluate functional recovery through walking track analysis after nerve transection with loss of substance. Tacrolimus (FK506) was used as a neurotrophic factor to stimulate neuronal growth through the tubulization technique along with a controlled drug delivery system, the alzet osmotic minipumps. Rats ( $n=36$ ) were randomly assigned to three groups. Group I served as untreated controls. Groups II and III received 0.1 mg/kg/d of FK506 systemically and locally, respectively. A 90 days postoperative results showed the Group III achieved the best functional recovery (highest Sciatic Functional Index – SFI) in comparison with Groups I and II.

**Keywords:** peripheral nerve injury, tubulization, tacrolimus, walking track analysis, osmotic pumps

## Introduction

Peripheral nerve injury (PNI) is a serious health concern for society and has posed an intimidating challenge to surgeons since Cruikshank first reported successful repair in 1795. It affects 2.8% of trauma patients, many of whom acquire life-long disability (*Midha, 2006; Buschnell et al., 2008; Belkas et al., 2004*). Loss of sensory and motor function, accompanied by pain and discomfort not only has functional consequences but also have major social and psychological impact (*Smit, 2006*). Peripheral nerve transection results in Wallerian degeneration in all of the axons distal to the injury site, as evidenced by the disintegration of axoplasmic microtubules and neurofilaments. Most of the axons along the distal stumps of transected nerves are reduced to granular and amorphous debris within 24 hours; by 48 hours, the myelin sheath has begun to be transformed into short segments that then form into ovoids. Activated macrophages migrate into the degenerating nerve stumps and phagocytose the disintegrating nerve fibers and myelin. Schwann cells proliferate in response to myelin debris and macrophage-derived cytokines and form longitudinal Schwann cell bands (bands of Bungner) as they divide and remain within the basal-lamina-lined endoneurial tubes (*Belkas et al., 2004*).

The surgical management of injured peripheral nerves where a gap is present still remains a formidable problem in reconstructive surgery. Bridging the nerve gap by the interposition of an autogenous nerve graft is the current treatment of choice for such situation. However, the limited availability of donor sites for nerve grafts (sural nerve, approximately 25-30cm), the potentially inappropriate diameter of around 1.5mm of most selected nerves, and their inherent associated morbidity or neuroma formation continue to stimulate researches toward finding a suitable alternative to bridge a gap and to enhance the process of peripheral nerve regeneration (*El-Bassiony et al., 2009*). The tubulization technique attempts to create mechanical guidance to the growing of the nerve trunk, and consists in inserting and suturing proximal and distal nerve endings into a conduit with an overlap between the stumps (*Lohmeyer et al., 2009; Babu et al., 2008*).

Of the various neurotrophic factors available, there is FK506 (Tacrolimus), an immunophilin ligand with strong immunosuppressive effect that is now being used to improve peripheral nerve regeneration across nerve allografts (*Feng et al., 2001; Okajima et al., 2002*.) because it has a high potential for nerve regeneration and neuroprotection (*Gold et al., 1995; Gold et al., 2004; Navarro et al., 2001; Wang et al., 1997*) and fewer side effects than other immunosuppressants (*Ohara et al., 1990; Tiebosch et al., 1990; Hontanilla et al., 2006; Lee et al., 2000*). Tacrolimus has powerful effects on the promotion of neural regeneration, and the underlying mechanism is mainly associated with immune inhibition and neurotrophic activity (*Que et al., 2012*).

Functional recovery following experimental nerve injury has been notoriously difficult to quantify precisely. The current gold standard in the rat sciatic nerve model involves analysis of footprints of the recovering animal, and computation of the sciatic function index (SFI) (*koka et al., 2001*). The current gold standard and most commonly used method for measuring functional recovery following rat sciatic nerve injury is walking track analysis. This method was first described by (*de Medinaceli et al., 1993*) and subsequently modified by (*Bain et al., 1989*). The approach they described is utilized increasingly by the researchers who deal with neuroscience. It involves the measurement of various relationships (print length (PL): distance from the heel to the third toe; toe spread (TS): distance from the first to the fifth toe; intermediate toe spread

(ITS): distance from the second to the fourth toe, between toes and feet of the hind limb of recovering animals. Different techniques are used to obtain footprints for walking track analysis, ranging from visible footprints in a walkway to digitally recorded footprints (Smit *et al.*, 2004; Sarikcioglu *et al.*, 2009; Rustemeyer *et al.*, 2009; Brenner *et al.*, 2008; Varejão *et al.*, 2001; Dijkstra *et al.*, 2000).

The present study was aimed at delineating basic regenerative measures like functional recovery through the walking track analysis after nerve transection with loss of substance using FK506 as a neurotrophic factor released by a controlled drug delivery system (ALZET® minipumps, Cupertino, CA).

## Materials and Methods

### Animals and surgical procedures

Male Wistar rats, weighing between 250 and 300 g, 3 months old were used. These studies were approved by the local animal ethics committee at Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul (PUCRS), Brazil. All animals were kept in plastic cages in a 12 h light and 12 h dark circle. At surgery, the rats were anesthetized with an intraperitoneal injection of Ketamine (75 mg/kg) and Xylazine (10 mg/kg). All surgical procedures were performed aseptically using standard microsurgical techniques and an operating microscope.

Operation of sciatic nerve transection (SNT) was carried out in 36 rats on right leg by opening the skin over a length of 2 cm in the proximal half of the line between trochanter major and knee joint. The m. vastus lateralis and m. biceps femoris were separated by blunt preparation techniques and the sciatic nerve could now be seen from where it emerges from under the m. gluteus maximus and runs over the m. semimembranosus and m. semitendinosus (DeKoning *et al.*, 1986). All animals underwent left sciatic nerve exposure, transection (10mm gap) and repair with silicon tubulization. The exposed distal and proximal nerve stumps were pulled into the silicon tubule (15mm) and secured with one 9-0 nylon suture (Ethicon, Somerville, NJ). The alzet osmotic minipumps were placed subcutaneously in the back of each rat. The experimental set-up is described in Table 1.

**Table 1.** Experimental set-up

Group	Description	Number of rats
I	Untreated controls	12
II	FK506 via Alzet minipump (systemic)	12
III	FK506 via Alzet minipump (local)	12

### Drug Administration

The rats of groups II and III received therapy with FK506 (FK-506 Tacrolimus monohydrate, Sigma-Aldrich); Tacrolimus was diluted to a concentration of 10 mg/ml in anhydrous alcohol. Rats of group II received a 0,1 mg/kg/day FK506 solution via Alzet minipump (model 2006, Alzet, Cupertino, CA) systemically whereas rats of group III received 0,1 mg/kg/day FK506 solution via Alzet minipump locally (a catheter was adapted to deliver the solution locally, inside the silicon tubule). The delivery rate of the FK506 solution via Alzet osmotic pumps was 0.15 µl/h during 6 weeks. After this

period, the pumps were replaced to reach the time of the experiment (the treatment started at the day of the surgery and lasts 12 weeks).

## Evaluation

### Functional Assessment

A standardized walking track analysis (WTA) technique allowed for assessment of hind limb recovery by examination of footprint patterns. Animals were tested in a confined walkway with a dark shelter at the end of the corridor by an observer unaware of group assignment. After three conditioning trials during which rats often stopped to explore the corridor they walked steadily to the dark shelter. The bottom of the track was lined with strips of paper. After the hind feet of the animals were painted with a black paint (*Tempera Guache, Acrilex*), they were allowed to ambulate down the 43 x 8,7 x 5,5 cm wooden corridor. The paw prints appeared immediately on the paper. Three to four footprints from both sides appeared on each track. Sciatic nerve function was evaluated on days 30, 60 and 90 after surgery. For the calculation of sciatic functional index (SFI) the following footprint parameters were measured: the distance from one foot to the opposite foot (TOF); the footprint length (PL); the distance from the first to fifth toes (the toe spread or TS); the distance from the second to fourth toe (the intermediary spreading or IS). Data was collected for both the normal (N) and the experimental (E) feet. The sciatic functional index was calculated by using the following formula (*De Medinaceli et al., 1982*):

$$SFI = -38.8 \left( \frac{EPL - NPL}{NPL} \right) + 109.5 \left( \frac{ETS - NTS}{NTS} \right) + 13.3 \left( \frac{EIT - NIT}{NIT} \right) - 8.8$$

The SFI is expressed in units of functional deficit. Thus, normal SFI was defined as 0–10 and 100 represented complete loss of nerve function.

### Histologic analysis

At the end of the study, animals were reanesthetized, the operated nerve was reexposed, and excised *en bloc* to include proximal and distal host segments. Immediately following nerve harvest, animals were sacrificed with a lethal intravenous dose of Pentobarbital (Delmarva Laboratories, Midlothian, VA). The sample was then fixed in glutaraldehyde (2,5%) in 0.1 M phosphate buffered saline (pH 7.4, 48h, 25°C), postfixed in OsO<sub>4</sub> (1%, 2h, 4°C), and dehydrated through ethanol series. After the first dehydration, the tissues were stained with propylene oxide (1,2-epoxypropane) as a transition solvent to facilitate resin infiltration. The samples were then processed for embedding in Epon. Transverse semithin sections (0.5 µm) of the entire nerve at midpoint, proximal and distal to the guide were made with an ultramicrotome (LKB 6802), stained with toluidine blue and examined under light microscopy. The investigators remained blinded to the treatment groups during examination of the slides with a Zeiss primostar microscope equipped with a AmScope MT500 of 5mpx camera to computer and utilizing the AmScope MT Software 3.0.0.6 Integrated Image Analysis Systems Morphometry program. This program was used to calculate the proximal, medial and distal nerve segment areas and perimeters (mm<sup>2</sup>).

### Statistical Analysis

All values are expressed as mean  $\pm$  SD. A one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey test, was used to compare the data measured by comparison of the normal and the experimental hind limb of the rats. A significant value was accepted at a p-value of  $<0.05$  using SPSS software version 11.0.

## Results

Operations were performed on 36 animals, and 34 were able to be evaluated at the 30<sup>th</sup>, 60<sup>th</sup> and 90<sup>th</sup> postoperative day. In the I and III groups, one animal could not be evaluated for walking track analysis after automutilating two toes on the experimental foot on the 60th postoperative day making analysis of walking tracks impossible. At necropsy, mild to moderate fibrosis was observed covering the silicon tubule implantation site. All of the silicon tubules were intact. Functionally, group III demonstrated better rates of recovery (Table 2 and Fig. 1). Histologic analysis revealed that the systemic group had the largest mean both the perimeter and area of the nerve when compared with all other groups, but no statistically significant differences were seen comparing the untreated control and the local groups. Considering the segment of the nerve, the medial had the smallest mean both for the perimeter and area when compared with all other segments, but no statistically significant differences were seen between the proximal and distal and also between the medial and distal, only when comparing the segments proximal and medial (Tables 3 and 4).

**Table 2.** Summary of functional recovery based on Sciatic Functional Index (SFI).

	<b>Group</b>	<b>n</b>	<b>Mean <math>\pm</math> SD</b>	<b>p-value</b>
<b>SFI 30 days</b>	Untreated Control	11	-74,029 $\pm$ 6,377	0,009**
	Systemic	12	-83,002 $\pm$ 5,651	
	Local	11	-77,690 $\pm$ 7,482	
	Total	34	-78,380 $\pm$ 7,360	
<b>SFI 60 days</b>	Untreated Control	11	-69,262 $\pm$ 6,886	0,212
	Systemic	12	-70,411 $\pm$ 6,363	
	Local	11	-65,394 $\pm$ 7,493	
	Total	34	-68,416 $\pm$ 7,044	
<b>SFI 90 days</b>	Untreated Control	11	-66,410 $\pm$ 8,214	0,000**
	Systemic	12	-50,784 $\pm$ 3,799	
	Local	11	-47,328 $\pm$ 2,264	
	Total	34	-54,721 $\pm$ 9,809	

\*\* statistical significance (P < 0.05).

## Figure 1

**Table 3.** Summary of morphometric measurements (perimeter and area) according to the group.

Group	Perimeter ( $\mu\text{m}$ )	Area ( $\mu\text{m}^2$ )
	Mean $\pm$ SD	Mean $\pm$ SD
Untreated Control	1750.5 $\pm$ 312.0	296986.3 $\pm$ 136000.2
Systemic	2856.8 $\pm$ 254.8	678604.3 $\pm$ 136000.2
Local	1721.4 $\pm$ 235.9	393344.2 $\pm$ 101368.6

**Table 4.** Summary of morphometric measurements (perimeter and area) according to the segment of the nerve.

Segment	Perimeter ( $\mu\text{m}$ )	Area ( $\mu\text{m}^2$ )
	Mean $\pm$ SD	Mean $\pm$ SD
proximal	2528.0 $\pm$ 226.7	649232.2 $\pm$ 124616.2
medial	1466.1 $\pm$ 180.6	195477.3 $\pm$ 47992.2
distal	2334.6 $\pm$ 320.3	524225.1 $\pm$ 127979.5

## Discussion

The main aims of the present study were, (1) to evaluate the use of osmotic pumps for delivering neurotrophic drugs in a constant rate, (2) to evaluate the use of FK506 at low-dose along with the tubulization technique as a potential neurotrophic factor for nerve repair, (3) the route of administration (systemic or local) of the neurotrophic factor, and (4) the improvement of functional recovery after nerve transection using FK506.

Timing is a critical consideration in the study of nerve regeneration. Accelerating nerve regeneration has the potential to optimize functional recovery through early reinnervation and salvaging of functional motor end-plates. Conversely, impaired nerve regeneration not only delays functional recovery but may adversely impact upon the degree of recovery that is ultimately achieved. A large body of experimental work investigates approaches to enhance nerve regeneration with the goal of improving outcomes after nerve injury (*Brenner et al, 2008*).

The experimental model in the present investigation involved the use of these substances in a silicon tubule repair of severed sciatic nerves, with a narrow (10 mm) gap. The silicon tubule was chosen for our model of nerve repair because it provides for a closed system which ensures the transected nerve ends are bathed with a precise concentration of matrix factors and in order to reproduce, as precisely as possible, previous studies which showed histomorphologic, immunocytochemical, and electrophysiologic enhancement when matrix factors are used in conjunction with silicon tubulization (*Terris et al, 1999*).



The addition of FK506 at low-dose improved functional recovery of transected nerves repaired with a narrow (10 mm) gap by silicon tubulization. These data suggest that, at low doses, daily FK506 treatment provides a quicker recovery of function than no treatment at all. The dose chosen for animals treated with CsA has already been shown to produce a maximal response in a nerve allograft model. Whereas quicker regeneration has been documented in animals treated with much higher doses of FK506 we wished to observe any effects on nerve regeneration at low, potentially nonimmunosuppressive doses in search of clinical applications for nerve injuries that otherwise would not require immunosuppression (*Lee et al, 2000*)

Various methods have been used in the past to assess recovery from peripheral nerve injury. These include morphometric, electrophysiological, biochemical, and histological analyses. Despite providing useful information, these tests do not measure the most important criteria, functional recovery. The reason why morphometric outcomes do not correlate with functional recovery may be a result of incomplete nerve regeneration or significant misdirection of the regenerating nerve fibres (*Iohom et al, 2005*).

The concept of walking track analysis as a method of assessing the function of the rat sciatic nerve has been described in detail elsewhere. Briefly, this gait analysis is based on the fact that rats normally walk on their digits and metatarsal footpads. Print length is therefore short in normal animals. Sciatic nerve lesions cause variable loss of both extensors and flexors of the foot. This deficit will cause the foot to drop to the ground and thus change the footprint. In this way footprints can be used to assess sciatic nerve function. Shortening of the footprint is thus a good sign of nerve recovery.

SFI has been widely used to assess motor nerve function and recovery following surgical repair, transection, crush injury, and intraneural injection. It has been shown to correlate with the severity of nerve injury in rats, with muscle strength; it has been validated as reliable, sensitive and reproducible (*Iohom et al, 2005; Brain et al, 1989; Brown et al, 1991; Shen and Zhu, 1995; Goldberg et al, 1984*).

While small animals are vital to research on nerve regeneration; work using these models must be undertaken with an informed perspective on the unique biology of small animals and how it differs from that of higher animals. When rodents are evaluated at a late time point, beneficial treatments may be overlooked as conferring no advantage. A more pervasive problem is the tendency to overestimate the efficacy of a new therapy that appears equivalent to a gold standard at late time points. These observations underscore the importance of rigorous controls and appropriate timing in functional and morphometric assessments of nerve regeneration (*Brenner et al, 2008*)

In conclusion, our data suggest that, at low doses, daily FK506 treatment provides a quicker recovery of function than no treatment at all. The most important finding of our study was that the degree of functional recovery measured by the SFI after long gap nerve injury repaired with artificial nerve guides is better when FK506 is administered locally with delivery devices of constant rate than systemically in rat models. We did not find any other work that had used a local application of FK506 in a constant rate to compare with.

## Acknowledgements

The project was supported by CAPES and the Laboratory of Medical Skills and Surgical Research of FAMED of PUCRS (Medicine Faculty of Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul).

## References

Midha R (2006). Emerging Techniques for Nerve Repair: Nerve Transfers and Nerve Guidance Tubes. *Clinical Neurosurgery*.53:185-190.

Bushnell BD, McWilliams AD, Whitener GB, Messer TM (2008). Early Clinical Experience With Collagen Nerve Tubes in Digital Nerve Repair. *J Hand Surg Am*.33(7):1081-7

Belkas JS, Shoichet MS, Midha R (2004). Axonal Guidance Channels in Peripheral Nerve Regeneration. *Oper Tech Orthop* 14:190-198. doi:10.1053/j.oto.2004.06.001

Smit X (2006). Struggle at the site of nerve injury: A rat sciatic nerve study on fundamental problems of peripheral nerve injury. Rotterdam, The Netherlands. 68 p.

El-Bassiony L, El-Mosalemy, K, Barakat NM. Vein Graft Versus Silicone Tube as a Conduit for Peripheral Nerve Defects: An Experimental Study (2009). *Egypt, J. Plast. Reconstr. Surg.*, 33:2;253-259

Lohmeyer JA, Siemers F, Machens HG, Mailander P (2009). The clinical use of artificial nerve conduits for digital nerve repair: a prospective cohort study and literature review. *J Reconstr Microsurg*. 25:55-61.

Babu P, Behl A, Chakravarty B, Bhandari PS, Bhatti TS, Maurya S (2008). Entubulation techniques in peripheral nerve repair. *Indian J Neurotrauma*. 5: 15-20.

Feng FY, Ogden MA, Myckatyn TM, Grand AG, Jensen JN, Hunter DA, Mackinnon SE (2001). FK506 rescues peripheral nerve allografts in acute rejection. *J Neurotrauma*.18:217–229.

Okajima S, Hojo T, Tamai K, Takai S, Hirasawa Y (2002). Histological and electrophysiological analysis of the peripheral nerve allografts using an immunosuppressive agent. *Microsc Res Tech*. 58:52–58.

Gold G, Katoh K, Storm-Dickerson T (1995). The immunosuppressant FK-506 increases the rate of axonal regeneration in rat sciatic nerve. *J Neurosciences*.15:7505–7516.

Gold BG, Udina E, Bourdette D, Navarro X (2004). Neuroregenerative and neuroprotective actions of neuroimmunophilin compounds in traumatic and inflammatory neuropathies. *Neurol Res*.26:371–380.

Navarro X, Udina E, Ceballos D, Gold BG (2001). Effects of FK506 on nerve regeneration and reinnervation after graft or tube repair of long nerve gaps. *Muscle Nerve*.24:905–915.

Wang MS, Zenely-Pooley M, Gold BG (1997). Comparative dose-dependence study of FK-506 and cyclosporine A on the rate of axonal regeneration in the rat sciatic nerve. *J Pharmacol Exp Ther.*282:1080–1093.

Ohara K, Billington R, James RW, Dean GA, Nishiyama M, Noguchi H (1990). Toxicologic evaluation of FK-506. *Transplantation Proceedings* ;22:83–86.

Tiebosch A, Ericzon BG, Wijnen R, Arends JW, Groth CG, Koostra G (1990). Side effects of FK-506 in Cynomolgus monkeys: A histopathologic study. *Transplantation Proceedings*;22:1652.

Hontanilla B, Auba C, Arcocha J, Gorria O (2006). Nerve regeneration through nerve autografts and cold preserved allografts using tacrolimus (FK506) in a facial paralysis model: A topographical and neurophysiological study in monkeys. *Neurosurgery.* 58:768-79.

Lee M, Doolabh B, Mackinnon SE, Jost S. FK 506 promotes functional recovery in crushed rat sciatic nerve. *Muscle Nerve* 2000;23:633-40.

Que J, Cao Q, Sui T, Du S, Zhang A, Kong D, Cao X (2012). Tacrolimus reduces scar formation and promotes sciatic nerve regeneration. *Neural Regen Res.*7(32):2500-2506.

Koka R, Hadlock TA (2001). Quantification of Functional Recovery Following Rat Sciatic Nerve Transection. *Experimental Neurology.* 168(1):192–5.

de Medinaceli L, Prayon M, Merle M (1993). Percentage of nerve injuries in which primary repair can be achieved by end-to-end approximation: review of 2,181 nerve lesions. *Microsurgery.*14:244-6.

Bain JR, Mackinnon SE, Hunter DA (1989). Functional Evaluation of Complete Sciatic, Peroneal, and Posterior Tibial Nerve Lesions in the Rat. *Plast Reconstr Surg.* 83(1):129-38.

Smit X, van Neck JW, Ebeli MJ, Hovius SE (2004). Static footprint analysis: a time-saving functional evaluation of nerve repair in rats. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg.* 38(6):321-5.

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

Rustemeyer J, Krajacic A, Dicke U (2009). Histomorphological and Functional Impacts of Postoperative Motor Training in Rats after Allograft Sciatic Nerve Transplantation under Low-dose FK 506. *Muscle Nerve.* 39(4):480-8.

Brenner MJ, Moradzadeh A, Myckatyn TM, Tung THH, Mendez AB, Hunter DA, Mackinnon SE (2008). Role of Timing Assessment of Nerve Regeneration. *Microsurgery.* 28(4):265-72.

Varejão ASP, Meek MF, Ferreira AJA, Patricio JAB, Cabrita MAS (2001). Functional evaluation of peripheral nerve regeneration in the rat: walking track analysis. *J Neurosci Methods*. 108(1):1-9.

Dijkstra JR, Meek MF, Robinson PH, Gramsbergen, A (2000). Methods to evaluate functional nerve recovery in adult rats: walking track analysis, video analysis and the withdrawal reflex. *J Neurosci Methods*. 96(2):89-96.

DeKoning P, Braklee JH, Gispens WH (1986) Methods for producing a reproducible crush in the rat sciatic and tibial nerve of the rat and rapid and precise testing of return of sensory function. *J Neurosci* 74:237–246

De Medinaceli L, Freed WJ, and Wyatt RJ (1982). An index of the functional condition of rat sciatic nerve based on measurements made from walking tracks. *Exp. Neurol*. 77, 634.

Brenner JM, Moradzadeh A, Myckatyn TM, Tung THH, Mendez AB, Hunter DA, Mackinnon SE (2008). Role of timing in assessment of nerve regeneration. *Microsurgery* 28:265–272.

Terris DJ, Cheng ET, Utleay DS, Tarn DM, Ho PR, Verity AN (1999). Functional recovery following nerve injury and repair by silicon tubulization: comparison of laminin-fibronectin, dialyzed plasma, collagen gel, and phosphate buffered solution. *Auris Nasus Larynx* 26:117–122.

Lee M, Doolabh VB, Mackinnon SE, Jost S (2000). FK506 promotes functional recovery in crushed rat sciatic nerve. *Muscle Nerve* 23: 633–640.

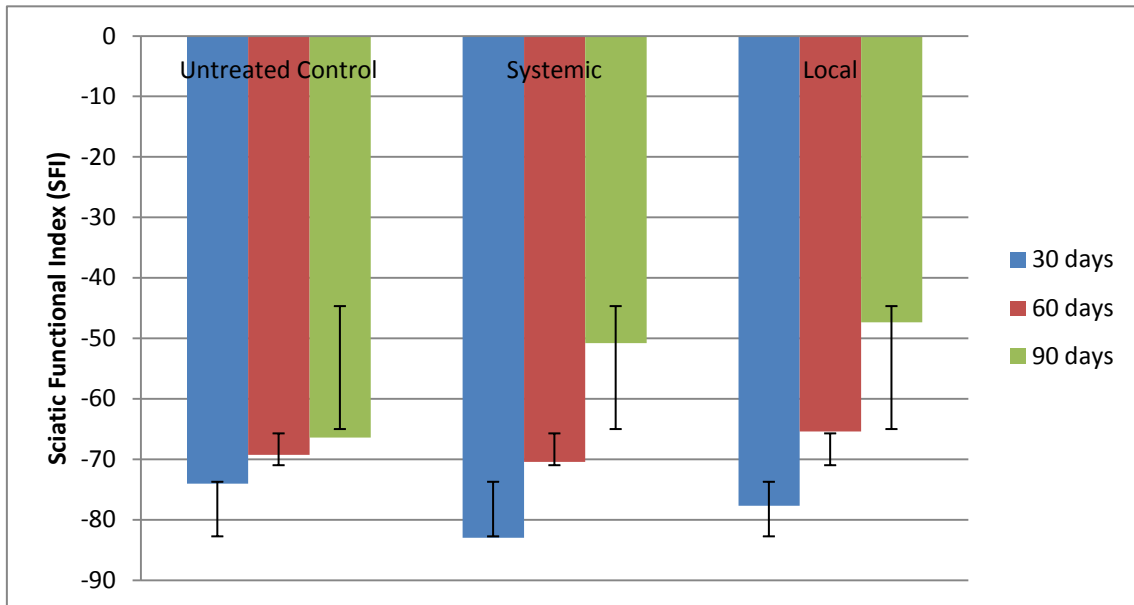
Iohom G, Lan GB, Diarra DP, Grignon Y, Kinirons BP, Girard F, Merle M, Granier G, Cahn V, Bouaziz H (2005). Long-term evaluation of motor function following intraneural injection of ropivacaine using walking track analysis in rats. *British Journal of Anaesthesia* 94 (4): 524–9.

Brain JR, Mackinnon SE, Hunter DA (1989). Functional evaluation of complete sciatic, peroneal and posterior tibial nerve lesions in the rat. *Plast Reconstruct Surg* 83: 129–36.

Brown CJ, Mackinnon SE, Evans PJ, et al (1991). Inter- and intraobserver reliability of walking track analysis used to assess sciatic nerve function in rats. *Microsurgery* 12: 76–9.

Shen N, Zhu J (1995). Application of sciatic functional index in nerve functional assessment. *Microsurgery* 16: 552–5

Goldberg NH, Deshpande SS, May CS, et al (1984). Disparity between neurophysiologic measurements and clinical reality following peripheral nerve transection and microneurography. *Surg Forum* 35: 608–10



**Figure 1.** Bar graph depicting the mean functional recovery in terms of SFI of each group after sciatic nerve transection and repair.