

ERICK YOSHIO WATAYA

Comparação de métodos de processamento de aloenxertos de nervos acelulares
em humanos

São Paulo

2025

ERICK YOSHIO WATAYA

Comparação de métodos de processamento de aloenxertos de nervos acelulares
em humanos

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

Programa de Ciências do Sistema
Musculoesquelético

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Rosa de Rezende

Coorientador: Dr. Hugo Alberto Nakamoto

São Paulo

2025

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Wataya, Erick Yoshio

Comparação de métodos de processamento de aloenxertos
de nervos acelulares em humanos / Erick Yoshio Wataya;
Marcelo Rosa de Rezende, orientador; Hugo Alberto
Nakamoto, coorientador. -- São Paulo, 2025.

Tese (Doutorado) -- Programa de Ciências do Sistema
Musculoesquelético. Faculdade de Medicina da Universidade
de São Paulo, 2025.

1.Lesões nervosas 2.Regeneração nervosa 3.Aloenxerto
4.Enxerto de nervo acelular 5.Traumatismos dos nervos
periféricos 6.Transferência de nervos I.Rezende, Marcelo
Rosa de, orient. II.Nakamoto, Hugo Alberto, coorient. III.Título

USP/FM/DBD-212/25

Responsável: Daniela Amaral Barbosa, CRB-8 7533

Wataya EY. Comparação de métodos de processamento de aloenxertos de nervos acelulares em humanos [doutorado]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2025.

Aprovado em: _____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

A meus pais, Suzana e Orlindo, exemplos de integridade e sabedoria, por me proporcionarem todas as condições para minha formação pessoal e profissional. Por me estimularem a estudar e correr atrás dos meus objetivos.

À minha esposa Daniella, pelo amor incondicional e apoio em todos momentos. Por ter me dado a chance de ser pai da Heloísa. Por ser a mãe e esposa mais dedicada e carinhosa.

À minha filha Heloísa, por ser a minha maior alegria e me tornar uma pessoa melhor. Meu motivo mais nobre de querer crescer e evoluir.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Marcelo Rosa de Rezende, orientador desta tese, por acreditar no projeto e oferecer pertinentes recomendações durante sua execução. Por todos os ensinamentos que contribuem para minha formação acadêmica e profissional.

Ao Dr. Hugo Alberto Nakamoto, coorientador desta tese, pelo incentivo, ajuda e contribuições desde o início do projeto. Grande amigo, mentor e exemplo de caráter e cirurgião.

Aos Prof. Dr. Rames Mattar Júnior, Prof. Dr. Teng Hsiang Wei e Dr. Emygdio José Leomil de Paula, que dedicam esforços e guiam o Grupo de Cirurgia da Mão e Microcirurgia do Instituto de Ortopedia e Traumatologia da Universidade de São Paulo. Pelos constantes ensinamentos e oportunidades. Grandes exemplos para mim.

Aos Prof. Dr. Alexandre Fogaça Cristante, Prof. Dr. Olavo Pires de Camargo e Prof. Dr. Tarcísio Eloy Pessoa de Barros, Professores Titulares do Departamento de Ortopedia e Traumatologia Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo durante minha formação como residente, pela admirável condução das atividades da Instituição.

À banca de qualificação desta tese, Prof. Dr. Teng Hsiang Wei, Dr. Mário Gilberto Siqueira e Dra. Renata Gregorio Paulos, pelas valiosas recomendações para aprimoramento do projeto.

Aos amigos Dr. João Carlos Nakamoto, Dr. Bruno Azevedo Veronesi, Dra. Cristina Schmitt Cavalheiro, por dedicarem tempo, compartilharem seus conhecimentos e contribuírem na construção desta tese.

Aos colegas de trabalho: Dr. Luciano Ruiz Torres e Dr. Luiz Sorrenti, pelos conselhos e pela amizade.

Aos amigos: Dr. Álvaro B. Cho, Dra. Danielle T. Simão, Dr. Edgard de Novaes F. Bisneto, Dra. Fernanda do Carmo Iwase, Dr. Leandro Y. Kiyohara, Dr. Maurício P. Rodrigues, Dra. Raquel B. Iamaguchi da Costa, Dra. Renata G. Paulos, Dr. Thiago Felipe dos Santos Barros, colegas de profissão e com os quais compartilho as recompensas das atividades do Grupo de Cirurgia da Mão e Microcirurgia do IOT-HC-FMUSP.

Aos residentes Jorge Henrique Higashi e Élcio Koodiro Yoshida, pelo auxílio na execução do projeto, na análise das lâminas e por acreditar neste trabalho.

A todos os médicos residentes, pela colaboração nas disseções.

À bióloga Simone Kneip Cavalheiro e ao Flavio Elias Santiago do Nascimento, pela dedicação e apoio nas disseções, e ajuda no processamento dos enxertos e nas análises histomorfológicas.

A Henry Dan Kiyomoto, pelo auxílio nas análises estatísticas.

À Noemi Nosomi Taniwaki, do Laboratório de Microscopia eletrônica do Instituto Adolfo Lutz, por todo apoio prestado na confecção das lâminas para análise histológica.

À Tania Maria Borges, por terem sido sempre muito prestativas em sanarem dúvidas e darem recomendações a respeito do funcionamento da Pós-Graduação.

À Priscilla Vargas, pelo apoio na formatação desta tese.

A toda equipe que trabalha no Serviço de Verificação de Óbitos da Capital.

Aos cadáveres utilizados nas disseções anatômicas e seus familiares.

“Se eu vi mais longe, foi por estar sobre ombros de gigantes”.

Isaac Newton

RESUMO

Wataya EY. Comparação de métodos de processamento de aloenxertos de nervos acelulares em humanos [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2025.

INTRODUÇÃO: o tratamento de lesões de nervos periféricos com perda segmentar é um desafio para os cirurgiões. O uso de aloenxertos de nervos acelulares é uma alternativa, porém necessitam de processamento para que haja remoção dos debris celulares e manutenção da matriz extracelular afim de estimular regeneração axonal sem que ocorra imunogenicidade. Várias técnicas de processamento de aloenxertos de nervos são descritas, porém ainda é incerto qual é mais eficaz. **OBJETIVO:** comparar qual o método de processamento de nervos de cadáveres – preservação a frio, com detergentes, ou com glicerol - é melhor, em relação à: contagem de axônios, densidade de axônios, espessura da bainha de mielina, manutenção da matriz extracelular e retirada de debris celulares pela análise histomorfométrica. **MÉTODOS:** foram ressecados 44 nervos, que incluíam os nervos musculocutâneo, radial, ulnar e mediano de cadáveres. Cada nervo foi dividido em três segmentos, que foram encaminhados aos grupos: C (preservados a frio), D (preservados em detergentes segundo o protocolo de Hudson) e G (preservados em glicerol). Após o processamento, foi ressecado um segmento da parte média para fixação e análise histomorfométrica. **RESULTADOS:** do total de 44 nervos avaliados, para a contagem de axônios, houve diferença entre os métodos ($p = 0,025$) em favor do grupo C sobre o G ($p = 0,007$). Para a densidade axonal houve diferença entre os métodos ($p = 0,002$) em favor do grupo D sobre o grupo C ($p = 0,018$) e o G ($p < 0,001$). Para a espessura da bainha de mielina houve diferença ($p = 0,003$) em favor do grupo C sobre o G ($p = 0,011$) e em favor do grupo D sobre o G ($p < 0,001$). A análise entre os quatro nervos mostrou diferença em relação à contagem de axônios ($p = 0,004$) e à área no grupo D ($p = 0,003$). Em relação à contagem de axônios para o grupo D, o nervo musculocutâneo apresentou menor número de axônios em relação ao nervo mediano ($p = 0,012$). Na comparação da matriz extracelular normal e destruída dentro de cada grupo, não foi possível analisar no grupo C, pois só existiam $n = 2$ de destruídos. No grupo D não se identificou diferença estatisticamente significativa para nenhuma das variáveis e no grupo G houve diferença entre os nervos normais e destruídos para contagem de axônios ($p = 0,027$) e para área ($p = 0,025$). A comparação entre os três grupos após exclusão dos casos com matriz extracelular destruída apresentou diferença estatística somente para densidade de axônios ($p = 0,017$) em favor do grupo D sobre o grupo G ($p = 0,018$). A comparação entre os quatro tipos de nervos, após a exclusão dos que tiveram matriz extracelular destruída identificou diferença no grupo D para contagem de axônios ($p < 0,001$), favorecendo o nervo radial em relação ao nervo mediano ($p = 0,033$); o nervo musculocutâneo em relação ao nervo mediano ($p < 0,001$) e o nervo ulnar sobre o nervo mediano ($p = 0,003$). **CONCLUSÃO:** a análise comparativa histomorfométrica de nervos de cadáveres nos três grupos demonstrou: superioridade do resfriamento na contagem de axônios; do detergente na densidade axonal e de ambos na espessura da bainha de mielina. O glicerol apresentou tendência a piores resultados. Não se observou diferença na preservação da matriz extracelular na comparação dos três métodos,

exceto no grupo G na análise da contagem de axônios. Na análise do tipo de nervo utilizado, o nervo mediano apresentou piores resultados na contagem de axônios no grupo D.

Palavras-chave: Lesões nervosas; Regeneração nervosa; Aloenxerto; Enxerto de nervo acelular; Traumatismos dos nervos periféricos, Transferência de nervos.

ABSTRACT

Wataya EY. A Comparative Analysis of Processing Methods for Acellular Nerve Allografts in Humans [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2025.

Background: The treatment of peripheral nerve injuries with segmental loss continues to pose challenges for surgeons. Acellular nerve allografts present a promising alternative, but they require processing to eliminate cellular debris while preserving the extracellular matrix to encourage axonal regeneration without inducing immunogenicity. Although various cadaveric nerve processing techniques have been documented, their effectiveness remains uncertain.

Objective: This study aims to compare different cadaveric nerve processing methods—cold preservation, detergent-based preservation, and glycerol-based preservation—concerning axon count, axon density, myelin sheath thickness, extracellular matrix preservation, and cellular debris removal via histomorphometric analysis. **Methods:** A total of 44 nerves, including the musculocutaneous, radial, ulnar, and median nerves from cadavers, were resected. Each nerve was divided into three segments and assigned to the following groups: C (cold preservation), D (detergent-based preservation following Hudson’s protocol), and G (glycerol-based preservation). Following processing, a mid-portion segment was resected for fixation and histomorphometric analysis. **Results:** Among the 44 evaluated nerves, axon count analysis identified differences between methods ($p=0.025$), favoring group C over group G ($p=0.007$). Axon density demonstrated differences ($p=0.002$), favoring group D over both group C ($p=0.018$) and group G ($p<0.001$). Myelin sheath thickness analysis indicated differences ($p=0.003$), favoring group C over group G ($p=0.011$) and group D over group G ($p<0.001$). Significant differences in axon count ($p=0.004$) and area were noted in group D ($p=0.003$) among the four nerve types. Within group D, the musculocutaneous nerve had fewer axons than the median nerve ($p=0.012$). The comparison of extracellular matrix within each group was inconclusive for group C due to a low number of destroyed extracellular matrices ($n=2$). In group D, no statistically significant differences were observed; however, in group G, axon count ($p=0.027$) and area ($p=0.025$) differed between normal and destroyed extracellular matrix. Upon excluding cases with destroyed extracellular matrix, a statistical difference in axon density ($p=0.017$) favored group D over group G ($p=0.018$). After exclusion, significant differences in axon count ($p<0.001$) emerged in group D, favoring the radial ($p=0.033$), musculocutaneous ($p<0.001$), and ulnar ($p=0.003$) nerves over the median nerve. **Conclusion:** Histomorphometric analysis revealed that cold preservation was superior for axon count, detergent processing excelled in axon density, and both methods outperformed others regarding myelin sheath thickness. Glycerol-based preservation indicated a tendency for poorer results. No significant differences in extracellular matrix preservation appeared among the three methods, except for group G in the axon count analysis. Among the nerve types, the median nerve displayed worse results in the axon count in group D.

Keywords: Nerve injury; Nerve regeneration; Allograft; Descellularized nerve graft; Peripheral nerve injuries; Nerve transfer.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Nervo musculocutâneo, nervo mediano, nervo radial e nervo ulnar na região axilar	34
Figura 2 - Via axilar para acesso aos nervos	35
Figura 3 - Nervo mediano marcado com tira de algodão	36
Figura 4 - Nervo radial marcado com tira de algodão	37
Figura 5 - Nervo musculocutâneo marcado com tira de algodão	37
Figura 6 - Nervo ulnar marcado com tira de algodão	38
Figura 7 - Segmento de nervo	39
Figura 8 - Segmento de nervo cortado para diferentes métodos de preservação	39
Figura 9 - Frascos de preservação dos aloenxertos em seus respectivos grupos	40
Figura 10 - Fluxograma da retirada de segmento do nervo, encaminhamento para o processamento específico e análise histológica	42
Figura 11 - Emblocamento e polimerização em resina Epon	43
Figura 12 - Microscópio ótico Carl Zeiss Axiolab para captura inicial das lâminas de vidro após métodos de fixação	44
Figura 13 - Lavagem dos cortes nas lâminas de vidro	44
Figura 14 - Fixação e corante de azul de metileno 1%	45
Figura 15 - Exemplos das lâminas após os três métodos de fixação	45
Figura 16 - Corte histológico de segmento de nervo preservado a frio com aumento de 40 vezes. Exemplo de foto realizada com a câmera JVC TK-1270	46
Figura 17 - Corte histológico de segmento de nervo preservado com detergente com aumento de 40 vezes. Foto realizada com a câmera JVC TK-1270	47
Figura 18 - Corte histológico de segmento de nervo preservado com glicerol com aumento de 40 vezes. Foto realizada com a câmera JVC TK-1270	48
Figura 19 - Corte histológico de segmento de nervo preservado à frio com aumento de 400 vezes. Foto realizada com a câmera JVC TK-1270	49
Figura 20 - Exemplo da lâmina 7C, antes e depois da delimitação da área de análise	50
Figura 21 - Lâmina 7C após escaneamento digital. Exemplo da visão com aumento de 100X	51
Figura 22 - Exemplo da lâmina 7C. A esquerda, imagem Composite. A direita, Count Density, com a linha em amarelo delimitando a área da secção transversa do neurônio, o que possibilita a estimativa da densidade por micrometro ² x1000 de neurônios em cada tipo de método de conservação	51

Figura 23 - Contagem manual da espessura das bainhas de mielina.....	52
Figura 24 - Exemplo de matriz extracelular destruída	53
Figura 25 - Ilustração demonstrando enxerto de nervo celular a esquerda e aloenxerto de nervo acelular a direita.....	54

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Médias de contagem do número de axônios nos três grupos.....	57
Gráfico 2 - Medianas de contagem do número de axônios nos três grupos.....	57
Gráfico 3 - Médias dos valores das áreas nos três grupos.....	58
Gráfico 4 - Medianas das áreas dos nervos nos três grupos.....	59
Gráfico 5 - Médias dos valores das densidades de axônios nos três grupos	60
Gráfico 6 - Medianas da densidade dos axônios nos três grupos.....	60
Gráfico 7 - Médias dos valores das espessuras da bainha de mielina nos três grupos.....	61
Gráfico 8 - Medianas da espessura da bainha de mielina nos três grupos	62
Gráfico 9 - Médias da contagem do número de axônios nos três grupos após exclusão dos casos com matriz extracelular destruída.....	73
Gráfico 10 - Medianas da contagem do número de axônios nos três grupos após exclusão dos casos com matriz extracelular destruída.....	73
Gráfico 11 - Médias das áreas dos nervos nos três grupos após exclusão dos casos com matriz extracelular destruída.....	74
Gráfico 12 - Medianas das áreas dos nervos nos três grupos após exclusão dos casos com matriz extracelular destruída.....	74
Gráfico 13 - Médias das densidades dos axônios nos três grupos após exclusão dos casos com matriz extracelular destruída	75
Gráfico 14 - Medianas das densidades dos axônios nos três grupos após exclusão dos casos com matriz extracelular destruída	75
Gráfico 15 - Médias das espessuras da bainha de mielina nos três grupos após exclusão dos casos com matriz extracelular destruída.....	76
Gráfico 16 - Medianas das espessuras da bainha de mielina nos três grupos após exclusão dos casos com matriz extracelular destruída.....	77
Gráfico 17 - Comparação dos quatro tipos de nervos em relação à contagem de axônios e os três grupos	80
Gráfico 18 - Comparação dos quatro tipos de nervos em relação à área dos nervos e os três grupos.....	80
Gráfico 19 - Comparação dos quatro tipos de nervos em relação à densidade de axônios e os três grupos	80
Gráfico 20 - Comparação dos quatro tipos de nervos em relação à espessura da bainha de mielina e os três grupos.....	81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Especificação de nervos radial, musculocutâneo, ulnar e mediano retirados para análise	38
Tabela 2 - Estatística descritiva da contagem de axônios nos grupos C, D e G	56
Tabela 3 - Comparações entre os pares de grupos em relação a contagem de axônios	56
Tabela 4 - Estatística descritiva da área dos nervos nos grupos C, D e G	58
Tabela 5 - Comparações entre os pares de grupos em relação a área dos nervos	58
Tabela 6 - Estatística descritiva da densidade dos axônios nos grupos C, D e G	59
Tabela 7 - Comparações entre os pares de grupos em relação a densidade dos axônios	59
Tabela 8 - Estatística descritiva da espessura da bainha de mielina nos grupos C, D e G	61
Tabela 9 - Comparações entre os pares de grupos em relação à espessura da bainha de mielina	61
Tabela 10 - Comparações da contagem de axônios entre pares de nervos no grupo D	62
Tabela 11 - Comparações das áreas dos axônios entre pares de nervos no grupo D: comparações múltiplas Dwass-Steel-Critchlow-Fligner	63
Tabela 12 - Estatística descritiva em relação aos tipos de nervo para o grupo D	64
Tabela 13 - Frequências de matriz extracelular destruída ou normal no grupo C	65
Tabela 14 - Frequências de matriz extracelular destruída ou normal no grupo D	65
Tabela 15 - Frequências de matriz extracelular destruída ou normal no grupo G	65
Tabela 16 - Estatística descritiva entre matriz extracelular normal e destruída para o grupo C	66
Tabela 17 - Estatística descritiva entre matriz extracelular normal e destruída para o grupo D	68
Tabela 18 - Estatística descritiva entre matriz extracelular normal e destruída para o grupo G	70
Tabela 19 - Comparação da contagem de axônios, área, densidade axonal e espessura da bainha de mielina entre os grupos C, D e G após exclusão dos casos com matrix extracelular destruída	72
Tabela 20 - Comparações entre os pares de grupos em relação a densidade dos axônios após exclusão dos casos com matriz extracelular destruída	76
Tabela 21 - Comparação geral entre os quatro tipos de nervos para os grupos C, D e G	78

Tabela 22 - Estatística descritiva em relação aos tipos de nervo para o grupo C após exclusão dos casos com matriz extracelular destruída	82
Tabela 23 - Cálculo de p para área e densidade de axônios para o grupo C após exclusão dos casos com matriz extracelular destruída	83
Tabela 24 - Cálculo de p para espessura da bainha de mielina e para contagem de axônios para o grupo C após exclusão dos casos com matriz extracelular destruída.....	83
Tabela 25 - Estatística descritiva em relação aos tipos de nervo para o grupo D após exclusão dos casos com matriz extracelular destruída	84
Tabela 26 - Cálculo de p para densidade de axônios para o grupo D após exclusão dos casos com matriz extracelular destruída	85
Tabela 27 - Cálculo de p para espessura da bainha de mielina, contagem de axônios e área para o grupo D após exclusão dos casos com matriz extracelular destruída.....	85
Tabela 28 - Cálculo de p em relação à contagem de axônios entre os tipos de nervo para o grupo D após exclusão dos casos com matriz extracelular destruída	85
Tabela 29 - Cálculo de p em relação à área entre os tipos de nervo para o grupo D após exclusão dos casos com matriz extracelular destruída	86
Tabela 30 - Estatística descritiva em relação aos tipos de nervo para o grupo G após exclusão dos casos com matriz extracelular destruída	87
Tabela 31 - Cálculo de p para contagem de axônios, área, densidade de axônios e espessura da bainha de mielina para o grupo G após exclusão dos casos com matriz extracelular destruída.....	88

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	- Por cento
®	- Marca registrada
°C	- Graus Celsius
µm ²	- Micrômetro quadrado
ACQUA	- <i>Anatomic Quality Assurance</i>
EUA	- Estados Unidos da América
FMUSP	- Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HIV	- Vírus da imunodeficiência humana
HTLV 1 e 2	- Vírus linfotrópico das células T humanas tipo 1 e 2
IC	- Intervalo de confiança
LIM 41	- Laboratório de Investigação Médica do Sistema Musculoesquelético 41
LIM-05	- Laboratório de Investigação Médica do Sistema Musculoesquelético 05
MHC	- <i>Major histocompatibility complex</i>
min	- Minutos
mm	- Milímetros
mM	- Milimolar
PBS	- <i>Phosphate buffered saline</i>
png	- <i>Portable network graphics</i>
SB-10	- Sulfobetaína-10
SVOC-USP	- Serviço de Verificação de Óbitos da Capital da Universidade de São Paulo
TCLE	- Termo de consentimento livre esclarecido
vs.	- <i>Versus</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	OBJETIVO	23
3	REVISÃO DA LITERATURA.....	25
3.1	REGENERAÇÃO AXONAL E A EVOLUÇÃO DO TRATAMENTO NAS LESÕES SEGMENTARES DE NERVO	26
3.2	A EVOLUÇÃO DOS MÉTODOS DE PRESERVAÇÃO DE ALOENXERTOS DE NERVOS.....	28
4	MÉTODOS.....	31
4.1	DESENHO DO ESTUDO.....	32
4.2	APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA E COMISSÃO CIENTÍFICA	32
4.3	CUSTO.....	32
4.4	CRITÉRIOS DE SELEÇÃO.....	32
4.5	CÁLCULO DA AMOSTRA.....	33
4.6	TÉCNICA CIRÚRGICA.....	34
4.7	FORMAÇÃO DOS GRUPOS	38
4.8	MÉTODOS DE PRESERVAÇÃO	40
4.8.1	Grupo C: conservados a frio	40
4.8.2	Grupo G: conservados em glicerol.....	41
4.8.3	Grupo D: processados com detergente.....	41
4.9	ANÁLISE HISTOLÓGICA	41
4.9.1	Protocolo de processamento de amostra para corte ultrafino	42
4.9.1.1	Fixação	42
4.9.1.2	Desidratação	42
4.9.1.3	Embebição em resina Epon	42
4.9.1.4	Emblocamento.....	42
4.9.1.5	Polimerização da resina.....	43
4.9.1.6	Obtenção de corte semifino	43
4.9.2	Leitura da amostra em microscópio óptico.....	45
4.9.3	Medições	49
4.10	ANÁLISE DOS DADOS	54
5	RESULTADOS.....	55
6	DISCUSSÃO	89
7	CONCLUSÕES	99
	REFERÊNCIAS	101
	ANEXOS	110

1 INTRODUÇÃO

Lesões de nervos periféricos são lesões comuns, que podem levar a importante grau de sequelas motoras e sensitivas, gerando elevado índice de incapacidades.

Após uma lesão de nervo, o tratamento ideal, se possível, é estabelecer uma neurorrafia primária e sem tensão, sobre um leito vascularizado e viável (de Ruitter et al., 2009a).

Na impossibilidade de uma sutura primária, como ocorre em casos de lesões complexas, com distância entre os cotos, ou quando há perda segmentar, existem algumas alternativas, como: uso de autoenxertos, uso de substitutos de nervo (conduítes neurais), transferências de nervo, ou neurotizações e, mais recentemente, o uso de aloenxertos.

Atualmente o uso de autoenxertos é o tratamento mais comumente usado (Lemos et al., 2008) e o padrão ouro para reconstrução de um nervo lesionado com distância entre os cotos (Hall, 2005). Esta técnica se baseia na ressecção de um segmento de nervo do próprio indivíduo e posterior interposição deste no espaço entre os cotos do nervo lesionado, de forma que não haja tensão na sutura (Terzis; Faibisoff; Williams, 1975). Porém não está isenta de riscos, principalmente para a área doadora, como denervação, formação de neuroma, dor crônica e infecção, por exemplo (Staniforth; Fisher, 1978; Rappaport et al., 1993; Lemos et al., 2008).

Os sítios doadores mais comuns são o nervo sural, o nervo cutâneo medial do antebraço, o nervo cutâneo anterolateral do antebraço, entre outros (Jewett; McCarroll, 1980). Porém, além dos riscos para área doadora, o calibre dos enxertos pode ser discrepante em relação ao diâmetro e ao comprimento do nervo receptor (Palhares; Viterbo; Cardoso, 2009), sendo necessário abordagem de mais de um sítio doador, aumentando a morbidade; ou ainda, a realização de um número de suturas fasciculares maior, o que aumenta o processo inflamatório local (Ijpma; Nicolai; Meek, 2006). Além disso, segundo alguns autores, os autoenxertos sensitivos não são ideais para reconstrução de nervos puramente motores (Nichols, 2004; Hall, 2005).

O uso de enxertos autólogos vascularizados também seria uma opção, com taxas de regeneração superiores ao não vascularizado em ratos (Mattar Júnior et al., 1992); porém apresentam os mesmos riscos descritos para o autoenxerto não vascularizado.

Diante destas limitações para o uso de enxerto autólogo, houve necessidade de encontrar novas opções de tratamento.

Para defeitos pequenos, em geral até 4 centímetros, uma possibilidade terapêutica é o uso de conduítes neurais sintéticos ou enxerto venoso autólogo. Os conduítes sintéticos possuem o formato de tubo e são derivados geralmente de silicone ou polissacarídeos, biodegradáveis ou não, e, assim como o enxerto venoso, podem servir de guia para a regeneração axonal (de Ruitter et al., 2009b), criando um microambiente ideal para o crescimento dos axônios, o que pode gerar bons resultados funcionais (Lundborg et al., 1997;

Chiono; Tonda-Turo; Ciardelli, 2009). Porém, os conduítes não possuem conteúdo estrutural e arquitetura celular, o que limita sua utilização para defeitos maiores, além de levar a uma recuperação funcional limitada quando comparada aos autoenxertos (de Ruiter et al., 2009b; Daly et al., 2011).

Outra alternativa que apresenta bons resultados funcionais é o uso de transferências de nervo, ou neurotizações (Brown; Mackinnon, 2008; Mackinnon; Colbert, 2008); que consiste em neurotomia de um nervo doador e transferência deste para o nervo receptor lesionado, para que haja recuperação da função.

Porém, existem alguns pré-requisitos para neurotizações motoras, como: a necessidade de ser um nervo doador que não traga prejuízo funcional, necessidade de sinergismo entre o nervo doador e receptor, proximidade do músculo-alvo e deve haver grande quantidade de neurônios motores puros (Dvali; Mackinnon, 2003).

Além disso, como ocorre no uso de autoenxertos, durante uma neurotização pode haver risco de denervação do músculo doador, além de indisponibilidade de um nervo doador compatível; o que torna esta técnica também limitada.

Assim, diante destas limitações das opções terapêuticas descritas para casos de lesões segmentares de nervos ou para impossibilidade de neurografia primária, o uso de aloenxertos se torna uma opção.

Os aloenxertos são nervos provenientes de cadáveres, e ainda há poucos dados na literatura para seu uso em reconstruções neurais, ou lesões segmentares em humanos.

Pontos favoráveis ao uso de aloenxertos de nervo são: ausência de limitação quanto à disponibilidade e à quantidade de enxerto, ausência de morbidade na área doadora, possibilidade de melhor adequação de comprimento e diâmetro com o nervo receptor, e possibilidade de uso de enxerto puramente motor, sensitivo ou misto. Além disso, os enxertos alógenos apresentam microestrutura e células de Schwann que permitem potencial de regeneração semelhante aos enxertos autólogos (Bain et al., 1988a; Bain et al., 1988b; Midha et al., 1993; Strasberg et al., 1996; Mackinnon et al., 2001; Brenner et al., 2008).

Uma possível desvantagem é o risco de imunogenicidade para o hospedeiro, o que pode aumentar o risco de toxicidade, infecção e necrose (Porayko et al., 1994; Mackinnon; Novak, 1999; Mackinnon et al., 2001; Udina; Gold; Navarro, 2004).

Para diminuir este efeito indesejado, os aloenxertos devem ser processados a fim de preservar a matriz extracelular íntegra, visando manter sua função na regeneração neural (Gulati; Cole, 1994); ao mesmo tempo em que deve ser isenta de debris celulares, o que provocaria aumento do risco de infecção, de toxicidade, e de imunogenicidade. Deve-se então

encontrar um equilíbrio entre a remoção dos restos celulares e manutenção das propriedades estruturais (Strasberg et al., 1996; Sondell; Lundborg; Kanje, 1998; Hudson et al., 2004). Existem muitas técnicas de preparo do aloenxerto acelular, incluindo liofilização, preservação a frio, uso de detergentes, uso de radiação, entre outras, buscando este equilíbrio (Hiles, 1972; Johnson et al., 1982; Sondell; Lundborg; Kanje, 1998; Myckatyn; Mackinnon, 2004).

Porém, há pouco consenso acerca de qual técnica de preservação do aloenxerto, em humanos, melhor preserva a matriz extracelular, possibilitando uma máxima recuperação funcional (Szyndkaruk et al., 2013).

A preservação a frio é um método já estudado em ratos (Atchabahian; Mackinnon; Hunter, 1999), com eficácia na preservação da lâmina basal e da matriz extracelular, além de levar a diminuição da antigenicidade.

Este método também é equivalente ao uso de autoenxertos convencionais em relação aos resultados funcionais, eletrofisiológicos e histológicos na taxa de regeneração nervosa em ratos (Mesquita, 2017).

Porém, para que ocorra uma atenuação do efeito antigênico, é necessário um maior tempo de preservação (Ray et al., 2011), tornando o processamento mais demorado, o que pode ser uma limitação para o uso deste método (Atchabahian; Mackinnon; Hunter, 1999).

O processamento com detergentes é um outro método descrito, que visa melhor preservação da matriz extracelular, e que impediria os possíveis efeitos destrutivos causados pelo congelamento na regeneração axonal (Evans et al., 1998 e 1999). Há uma série de protocolos descritos. Hudson et al. (2004b) demonstram que os aloenxertos expostos repetitivamente a soluções de água destilada, sulfobetaine-10, e Triton X-200/sulfobetaine-16 pelo período de 4 dias apresentam uma preservação superior da matriz extracelular e níveis de descellularização semelhantes aos processos químicos anteriormente utilizados. Além disso este método se mostra mais eficaz na obtenção de melhores taxas de densidade axonal em ratos em relação à preservação a frio, o que pode levar a um maior potencial de regeneração (Evans et al., 1995 e 1998; Hudson et al., 2004a).

Um outro método de processamento descrito é por meio de soluções de glicerol, bastante utilizado na preservação de aloenxertos de pele. Esta substância é capaz de desidratar o tecido, sem alterar as concentrações iônicas celulares, ao mesmo tempo que mantém a arquitetura celular com baixa taxa de antigenicidade (Richters et al., 1997; Mackie, 2002; Khoo et al., 2010; Zidan; Eleowa, 2014).

Já foi descrita a utilização do glicerol como método de preservação de aloenxertos de nervo femoral em ratos, com bons resultados em relação aos aspectos imuno histoquímicos a

longo prazo (Wolff; Walter; Zimmer, 1993). Lemos et al. (2008) compararam autoenxerto, com aloenxerto, com tubo de veia, todos preservados em glicerol a 98% por 7 dias a 4°C, no reparo do nervo fibular em ratos, demonstrando resultados semelhantes nos três grupos, o que sugere que o glicerol é um método eficaz na manutenção da matriz extracelular. Além disso, este método é mais barato, podendo ser utilizado em grande escala, o que traria vantagens para os pacientes e para os sistemas de saúde em geral.

Nakamoto et al.(2021), em estudo experimental em ratos, realizaram a comparação entre os três métodos: preservação a frio, em detergentes, ambos bastante utilizados atualmente, e preservação em glicerol, método utilizado em bancos de pele e que traria melhor custo-benefício para os pacientes, médicos e sistemas de saúde. Foram realizadas avaliações histomorfológica e funcional da taxa de regeneração axonal e demonstrou-se que a presença de debris celulares, após o tratamento com glicerol, foi similar ao tratamento com detergentes e significativamente melhor ao preservado por resfriamento. Além disso, em seu estudo, a preservação do enxerto de nervo em glicerol se mostra similar ao autoenxerto e aos enxertos preservados em solução de detergentes na regeneração do nervo.

Por meio da análise histomorfométrica da contagem e da densidade de axônios e da medição da espessura da bainha de mielina, pode-se prever recuperação funcional e eletrofisiológica (Lovati et al., 2018).

Já existe um aloenxerto derivado de cadáveres utilizado e comercializado nos Estados Unidos da América (EUA) - Avance® (AxoGen, Inc., Alachua, Flórida). Seu uso em lesões de nervo periféricos com perda segmentar apresenta resultados satisfatórios (Lans et al., 2023), porém, conforme a Constituição Federal (Brasil, 1988, art. 199, § 4º), não pode ser comercializado no Brasil.

Em humanos, ainda é incerto qual método de preservação levaria a melhor manutenção das propriedades estruturais do nervo e removeria todos os debris celulares, diminuindo fator imunogênico.

Este impasse é o motivo do presente estudo e traria potenciais avanços no tratamento de lesões complexas de nervo.

2 OBJETIVO

O objetivo deste estudo é comparar qual o método de processamento de nervo provenientes de cadáveres – preservação a frio, com detergentes, ou com glicerol – é melhor, em relação à: contagem de axônios, densidade de axônios, espessura da bainha de mielina, manutenção da matriz extracelular e retirada de debris celulares pela análise histomorfométrica.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 REGENERAÇÃO AXONAL E A EVOLUÇÃO DO TRATAMENTO NAS LESÕES SEGMENTARES DE NERVO

Até o século XIX, não se sabia o mecanismo fisiopatológico exato de regeneração neural e de retorno funcional após uma lesão de nervo.

Waller, em 1850, é o primeiro a descrever os mecanismos celulares decorridos após a lesão, que levam à degeneração do nervo com mudanças intracelulares e morfológicas no coto proximal e distal.

Bunnell e Boyes, em 1939, estudam os resultados funcionais do uso de enxerto de nervo autólogo. Em uma série de 32 casos conseguem obter resultados funcionais satisfatórios.

Seddon, em 1972, classifica as lesões de nervo em três tipos. A neuropraxia, forma mais leve, ocorre quando há uma interrupção da condução do nervo sem a perda da continuidade do axônio e a recuperação se dá sem degeneração Walleriana. Na axoniotmese, ocorre degeneração axonal, com perda da relativa continuidade do axônio e sua cobertura de mielina, mas há a preservação da estrutura do tecido conectivo do nervo. Na neurotmese, forma mais grave de lesão, o nervo é completamente interrompido, com desorganização do axônio causada por uma fibrose tecidual com consequente interrupção do crescimento axonal e a recuperação espontânea é pobre sem intervenção cirúrgica.

Taylor e Ham, em 1976, descrevem o uso de enxerto de nervo vascularizado. Um enxerto de nervo sensitivo radial junto com a artéria radial é utilizado para reconstrução do nervo mediano em caso de seqüela de contratura de Volkmann. Defendem que esta técnica é uma boa opção em casos de leito receptor desfavorável.

Sunderland, em 1978, amplifica a classificação de Seddon dividindo-a em cinco tipos. A neuropraxia foi classificada como tipo I; já a axoniotmese foi dividida em três tipos, que variam de acordo com o grau da lesão, enquanto a neurotmese foi classificada como tipo V. É raramente possível, pela classificação de Sunderland, classificar com exatidão uma lesão axonal com base em dados clínicos e eletromiográficos. O subtipo é geralmente discriminável pelo exame histológico da lesão do nervo.

Gordon et al., em 1979, realizam estudo experimental em ratos utilizando enxertos de nervo pré-degenerados, onde já ocorreu degeneração Walleriana, resultando em tubos ocos para que haja regeneração axonal. Concluem que estes são superiores aos autoenxertos em casos de lesões crônicas.

Koshima, Harii e Orabe, em 1983, demonstram que os enxertos vascularizados têm maior tamanho e densidade axonal, com maior taxa de regeneração nervosa em relação aos enxertos convencionais.

McCullough et al., em 1984, por meio de microangiografia e análise histológica demonstram a importância da manutenção da vascularização quando utilizados enxertos. Em análise funcional da taxa de regeneração do axônio medida eletrofisiologicamente concluem que a velocidade de crescimento axonal evolui em torno de 1,15 milímetros por dia, com um atraso inicial de 4,85 dias nos grupos estudados.

Restrepo et al., em 1985, comparam enxertos vascularizados com enxertos convencionais em coelhos quanto a regeneração nervosa e correlação histológica da espessura da bainha de mielina. A taxa de regeneração é favorável nos enxertos vascularizados.

Seckel et al., em 1986, também comparam enxertos vascularizados com enxertos convencionais quanto a parâmetros eletrofisiológicos e contagem de axônios; porém não encontram diferença entre os dois tipos de enxerto.

Zumiotti, em 1987, em estudo experimental com 14 coelhos, compara o uso de auto enxerto de nervo suturados proximal e distalmente em tempo único com sutura em dois tempos (primeiro a parte proximal e 60 dias após a parte distal). Conclui que sutura em único tempo é favorável e que não há diferença no número de fibras mielinizadas nos dois grupos.

Shibata et al., em 1988, comparam resultados funcionais de enxertos vascularizados *versus* enxertos convencionais em coelhos. Enxertos vascularizados foram superiores na contagem de axônios e no retorno de força muscular após 24 semanas de pós-operatório.

Mattar Júnior, em 1989, compara sutura epineural pura com uso de adesivo de fibrina em nervos ciáticos de ratos analisando contagem de fibras axonais e resistência a tração. Os dois grupos foram semelhantes na contagem de fibras mielinizadas, porém o grupo que se utilizou cola de fibrina apresentou menor resistência a tração.

Mattar Júnior et al., em 1990, demonstram que o enxerto de membrana basal de músculo estriado é capaz de induzir regeneração axonal. A avaliação microscópica notou presença de fragmentos nos cotos proximais e distais 60 dias após o procedimento.

Kanaya et al., em 1992, comparam em ratos: autoenxerto com enxerto de nervo vascularizado com sutura de nervo direta até a 36ª semana. Concluem que enxerto de nervo vascularizado foi superior na avaliação morfológica e eletrofisiológica na 12ª semana, exceto peso muscular e contagem de axônios.

Mattar Júnior et al., em 1992, comparam em ratos enxertos de nervo sural vascularizados com enxertos de nervo não vascularizados. Concluem que a regeneração axonal é maior no grupo enxerto vascularizado, que apresentou maior quantidade de fibras mielinizadas.

Ozcan et al., em 1993, comparam em coelhos enxertos de nervo convencionais com enxertos de nervo vascularizados em segmento criado no nervo intratemporal facial. Os enxertos vascularizados foram superiores em relação aos aspectos fisiológicos e morfológicos.

Nakamura et al., em 2004, descrevem o uso de conduítes derivados de ácido poliglicólico com colágeno em lesões de nervos fibulares em cães. Concluem que após 6 meses os conduítes apresentaram melhores resultados histomorfométricos e eletrofisiológicos que os enxertos convencionais.

Martins et al., em 2006, em estudo experimental em ratos, visando estabelecer relação entre regeneração do nervo com análise eletrofisiológica e histomorfométrica após neurotrauma de nervo ciático, demonstram que há correlações positivas entre o índice funcional ciático e o diâmetro da fibra nervosa proximal e entre o diâmetro da fibra distal. Além disso há uma correlação fraca entre o índice funcional do ciático e as medidas de resultados das avaliações eletrofisiológicas e morfométricas.

Lemos et al., em 2008, comparam aspectos histomorfométricos e funcionais de reinervação pelo uso de autoenxerto, com tubo de veia, com aloenxerto preservado em glicerol a 98% por 7 dias a 4 °C. Concluem que o tubo de veia e o aloenxerto são superiores nos aspectos histológicos, porém os três grupos apresentam resultados funcionais semelhantes.

Mesquita, em 2017, compara autoenxertos com autoenxertos conservados a frio por 14 dias e 50 dias. Os nervos preservados a frio em ambas temperaturas foram superiores nos aspectos funcionais e similares nos aspectos histomorfométricos e eletrofisiológicos aos autoenxertos.

3.2 A EVOLUÇÃO DOS MÉTODOS DE PRESERVAÇÃO DE ALOENXERTOS DE NERVOS

Albert* (1885) apud Evans, Midha e Mackinnon (1994) é o primeiro a reportar o uso de aloenxerto de nervo. Ele transplanta dois segmentos de nervo de 3 cm e de 10 cm retirados de um pé e de uma perna amputados para uma falha segmentar dos nervos mediano e ulnar após ressecção de sarcoma.

Gutmann e Sanders, em 1943, realizam os primeiros estudos de criopreservação de aloenxertos de nervos periféricos em coelhos. Os nervos foram conservados a 2 °C durante 1 semana, 2 semanas e 3 semanas antes de serem implantados. Os nervos preservados a frio apresentaram melhores taxas de regeneração axonal que os aloenxertos sem preservação. Também foram histologicamente e fisiologicamente semelhantes ao autoenxertos.

Sanders e Young, em 1954, em estudo experimental em coelhos, demonstram que o congelamento do aloenxerto diminui o infiltrado linfocitário, alterando assim a regeneração axonal.

* Albert E. Einige operationen an nerven. Wien Med. Presse. 1885;26:1285-8.

Campbell, Bassett e Boehler, em 1963, em ensaio clínico com 24 pacientes, projetam os aloenxertos pré-tratados por congelamento e irradiação. No entanto, a utilização dos aloenxertos de nervo na fase inicial enfrenta limitações, pois os enxertos apresentam crescimento axonal limitado e tardio, provocam alta resposta imunológica e resultam na rejeição do enxerto.

Jacoby et al., em 1970, iniciam pesquisa para remoção de antígenos de aloenxertos por meio do tratamento com liofilização.

Mackinnon et al., em 1985, em estudo experimental em ratos, estudam a compatibilidade de *major histocompatibility complex* (MHC) e obtêm boa regeneração em aloenxertos com correspondência de MHC e regeneração ruim em enxertos sem compatibilidade de MHC.

Hirasé et al., em 1992, em estudo experimental em ratos, obtêm bons resultados funcionais e em taxas de regeneração axonal após neurorrafia de nervos ciáticos criopreservados.

Zalewski et al., em 1993, em estudo experimental em ratos, concluem que os elementos celulares neurais são preservados e podem manter função após a criopreservação quando transplantados. Porém a criopreservação não inibe totalmente a resposta imunogênica e requerem imunossupressão após o transplante.

Wolff, Walter e Zimmer, em 1993, em estudo experimental em ratos, preservam nervos a 4 °C em solução de glicerol a 98%. Obtêm bons resultados funcionais, histomorfométricos pela medida do diâmetro axonal e eletrofisiológicos após três meses da utilização dos enxertos preservados.

Levi et al., em 1994, em estudo experimental com nervos de ratos e nervos de cadáveres humanos, na tentativa de avaliar métodos de preservação para banco de nervos, concluem que a celularidade de enxertos de nervo antes do transplante diminui já na primeira semana de armazenamento a frio.

Evans et al., 1998, em estudo experimental em ratos, demonstram que aloenxertos de nervo preservados a frio não compromete as taxas de regeneração axonal, e, quanto maior o tempo de preservação, maior a diminuição da celularidade e a resposta imunogênica.

Sondell, Lundborg e Kanje, em 1998, em estudo experimental em ratos, criam o protocolo de pré-tratamento de aloenxertos mais usado na literatura. Utiliza Triton X-100 e solução de desoxicolato de sódio para provocar lise química de células quimicamente. Este protocolo resulta na remoção da bainha de mielina e das células de aloenxertos, resultando em uma resposta satisfatória de regeneração nervosa *in vivo*.

Bain, em 2000, relata sete casos de utilização de aloenxertos em lesões de nervo com a utilização temporária de imunossupressores. Descreve bons resultados em relação ao retorno de sensibilidade e tolerância aos imunossupressores.

Mackinnon et al., em 2001, avaliam o resultado clínico de sete pacientes submetidos à reconstrução de lesões segmentares de extremidades superiores e inferiores com aloenxertos. Antes do transplante, os aloenxertos foram coletados e preservados por 7 dias a frio a 5 °C. São utilizados imunossupressores como ciclosporina A ou tacrolimus, azatioprina e prednisona, que foram suspensos 6 meses após a regeneração no aloenxerto ser evidente. Seis pacientes demonstram retorno da função motora e da sensação no membro afetado, e um paciente apresenta rejeição do aloenxerto.

Krekoski et al., em 2001, em estudo experimental em ratos, concluem que as cadeias laterais de glicosaminoglicanos de proteoglicano de sulfato de condroitina, conhecidas por inibir o crescimento axonal pelo bloqueio funcional da laminina, podem ser removidas do nervo por tratamento com uma enzima condroitinase. Esse método mostra que os aloenxertos de nervos pré-tratados com condroitinase melhoraram as propriedades de promoção de regeneração axonal.

Hudson et al., em 2004a, em estudo experimental em ratos, propõem um aloenxerto de nervo que mantém a matriz extracelular. Este estudo demonstra que a preservação com detergentes resulta em densidades de axônios comparáveis aos autoenxertos de nervo em estudos pré-clínicos. Além disso, estes aloenxertos também mostram que a densidade de axônios é 910% maior do que os aloenxertos tratados termicamente e 401% maior do que o protocolo de Sondell.

O aloenxerto de nervo Avance® foi desenvolvido em 2007 usando ambos os métodos de pré-tratamento descritos por Krekoski et al. (2001) e Hudson et al. (2004a). Até o momento, é o único aloenxerto de nervo projetado comercialmente disponível nos EUA para uso clínico.

Whitlock et al., em 2009, em estudo pré-clínico experimental em ratos, mostram que os aloenxertos de nervo Avance® não apresentam reação imunogênica e mantêm a estrutura da matriz extracelular nativa do nervo, incluindo laminina, uma proteína crítica para o crescimento axonal. Além disso, se mostra superior aos conduítes de nervo disponíveis.

Lovati et al., em 2018, em revisão de literatura, concluíram que o pré-tratamento de aloenxertos de nervos com o protocolo de Hudson combinado com o protocolo de Krekoski é considerado o mais eficaz, quando comparado com outros protocolos de processamento de nervos bem estabelecidos.

4 MÉTODOS

4.1 DESENHO DO ESTUDO

Seguiu-se a diretriz para estudos anatômicos *Anatomic Quality Assurance* (ACQUA) (Anexo A).

Trata-se de um estudo anatômico histomorfométrico observacional transversal.

4.2 APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA E COMISSÃO CIENTÍFICA

Projeto com aprovação no Comitê de Ética e Pesquisa, com número do parecer: 4.514.331 (Anexo B). Aprovado na Comissão Científica, com número do protocolo: 1474 (Anexo C) e Manifestação prévia do Serviço de Verificação de Óbitos da Capital da Universidade de São Paulo (SVOC-USP) (Anexo D).

4.3 CUSTO

A pesquisa não necessitou de recursos financeiros extraordinários, uma vez que consistiu em coleta de nervos provenientes do SVOC-USP, mediante aplicação de termo de consentimento livre esclarecido (TCLE) (Anexo E) ao familiar responsável, seguindo as normas exigidas. Para os métodos de preservação, confecção das lâminas e análise histológica foram utilizados recursos e materiais já presentes nos respectivos setores de análise.

4.4 CRITÉRIOS DE SELEÇÃO

Cadáveres provenientes do SVOC-USP com morte recente, média de 8 horas, mediante assinatura de termo de consentimento livre e esclarecido pelo familiar (Anexo E).

Os cadáveres não apresentavam doença neurológica central nem periférica e não tinham cicatrizes na região do acesso cirúrgico.

4.5 CÁLCULO DA AMOSTRA

Para estimar o n mínimo para a mostra, foram considerados um tamanho de efeito de 0,30 (considerado um efeito moderado). Um α de 0,05 e um β de 0,80. Utilizando como base três grupos (conservados a frio, conservados em glicerol e processados com detergente), e a avaliações após a preservação. Sendo assim, o n estimado é de 30 amostras, entretanto, considerando um acréscimo de 10% para possíveis perdas de amostras, o tamanho mínimo estimado é de 33 amostras. O cálculo foi realizado pelo software G*Power versão 3.1.9.6., desenvolvido na Universidade de Düsseldorf (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf), na Alemanha, em colaboração com pesquisadores da Universidade de Kiel (Christian-Albrechts-Universität zu Kiel), também na Alemanha (Faul et al., 2007).

Em estudo preliminar, Nakamoto et al, (2021) utilizaram um n de 40 nervos de ratos para análise semelhante, fundamentada em estudos prévios em animais.

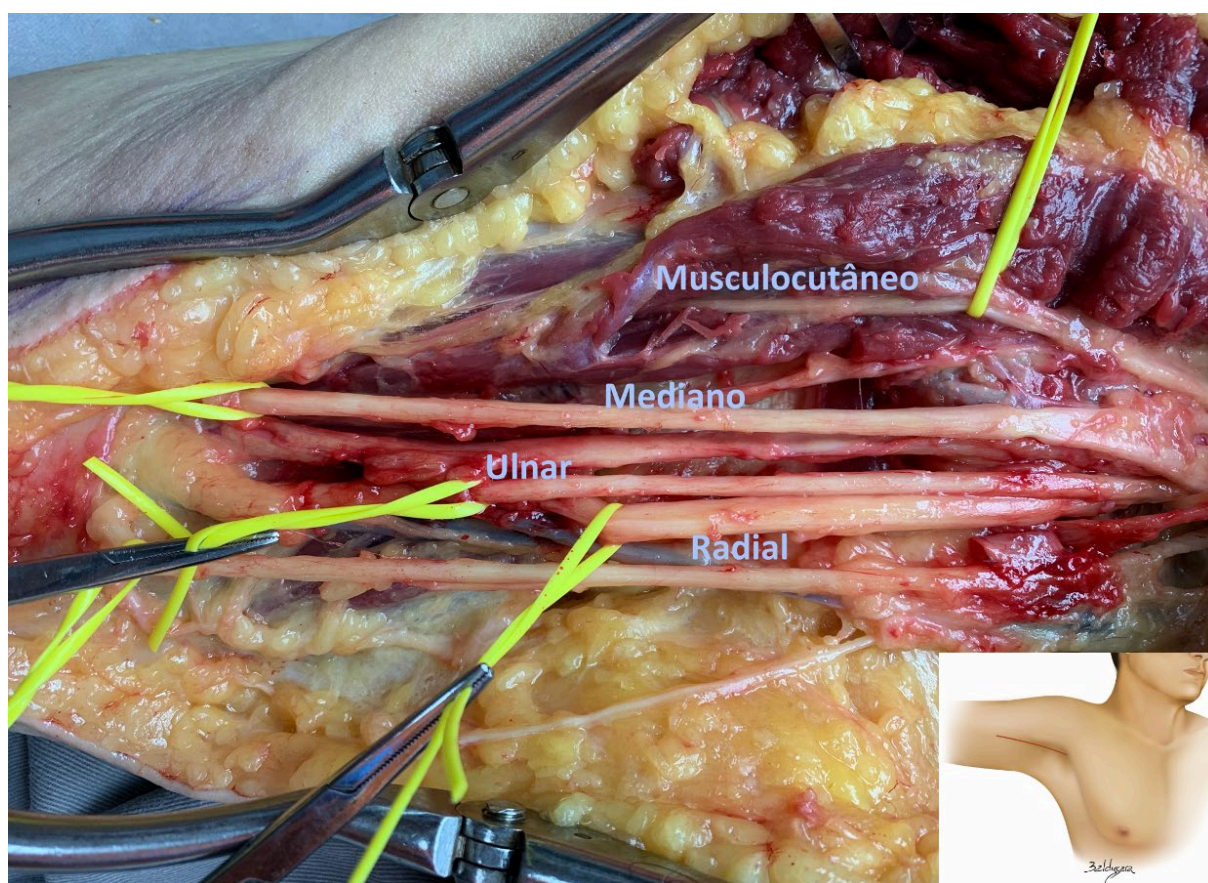
Com base na quantidade mínima do cálculo amostral e no estudo preliminar, foi realizada captação de 44 nervos, que incluem os nervos medianos, ulnares, radiais e musculocutâneos, da região axilar de cadáveres provenientes do SVOC-USP, mediante aplicação de TCLE ao familiar responsável, seguindo as normas exigidas.

4.6 TÉCNICA CIRÚRGICA

As dissecções foram realizadas com lupa de magnificação (Zeiss 3,5x).

Os nervos mediano, radial, ulnar e musculocutâneo são nervos mistos, com parte sensitiva e motora já estabelecidas; de fácil dissecção na região axilar e possuem calibre e comprimentos longos (Sunderland, 1945; Franco et al., 2016). Devido a estes fatores foram os nervos de escolha para o estudo (Figura 1).

Figura 1 - Nervo musculocutâneo, nervo mediano, nervo radial e nervo ulnar na região axilar



Fonte: Acervo pessoal do autor.

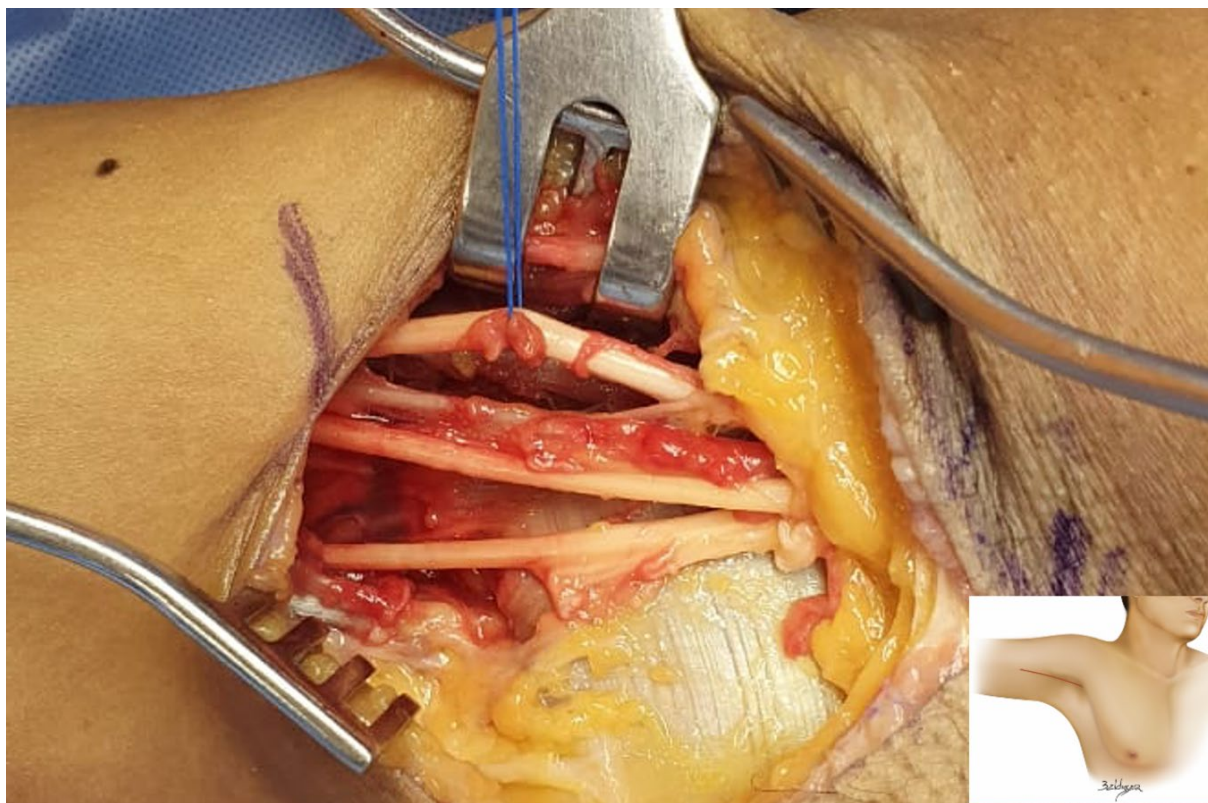
Foi utilizada uma via axilar longitudinal de aproximadamente 20 centímetros e dissecção por planos musculares abaixo do músculo peitoral maior e peitoral menor com extensão distal sub bicipital (Figura 2). Após dissecção por planos, o nervo mediano foi localizado no intervalo entre o bíceps e o tríceps, abaixo do peitoral maior e menor e realizada a sua neurólise em relação aos planos musculares e à artéria braquial (Figura 3).

Figura 2 - Via axilar para acesso aos nervos



Fonte: Acervo pessoal do autor.

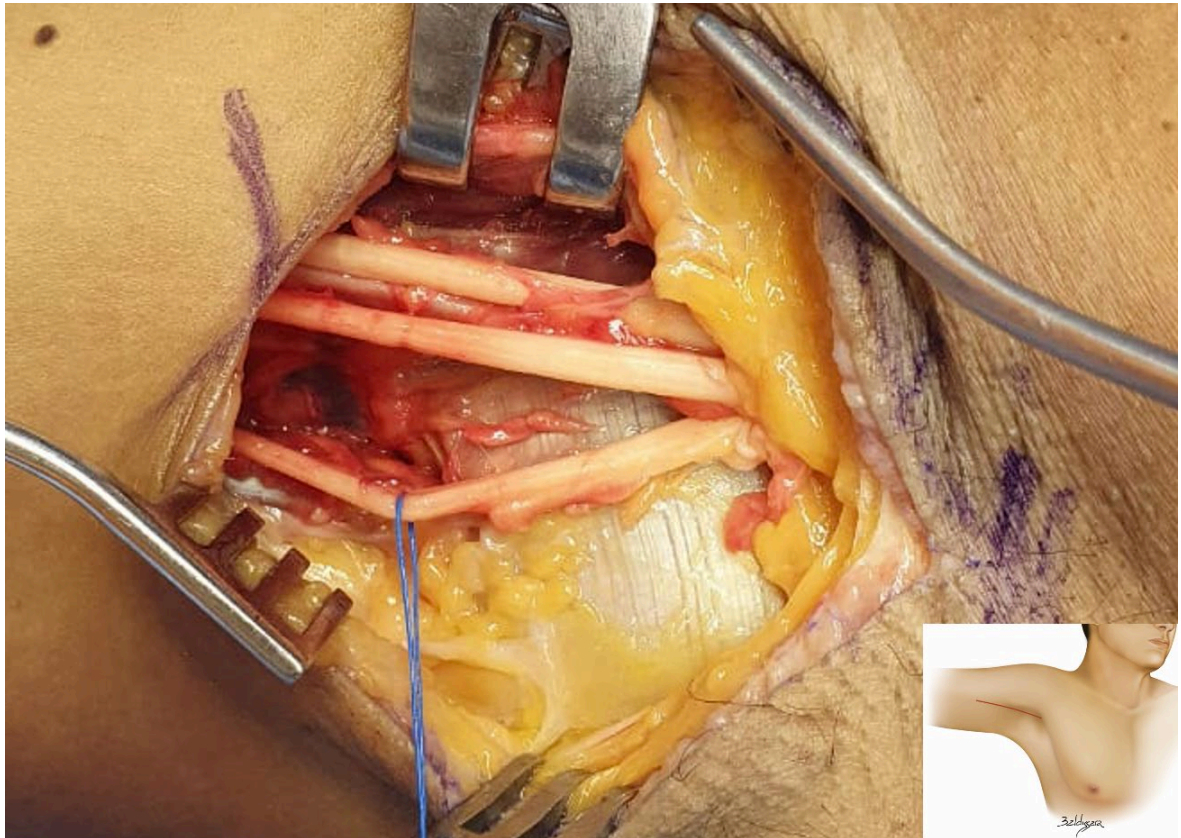
Figura 3 - Nervo mediano marcado com tira de algodão



Fonte: Acervo pessoal do autor.

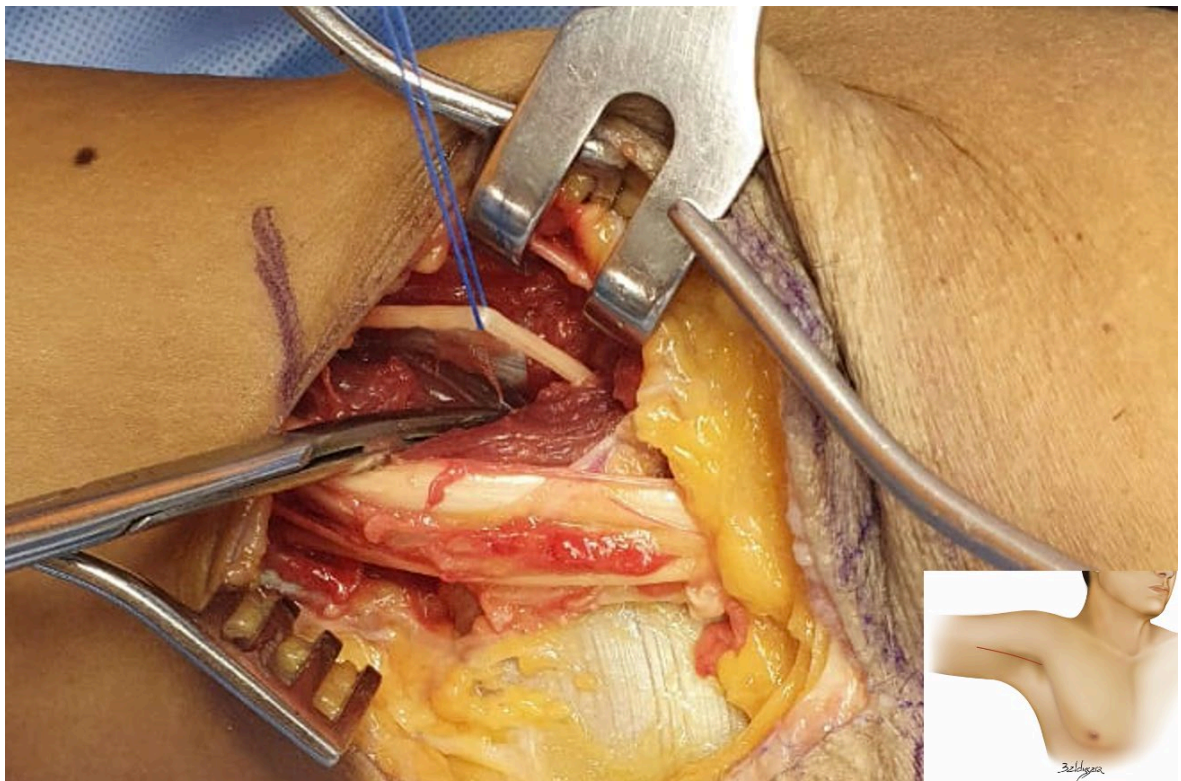
O nervo radial foi dissecado posteriormente à artéria braquial, rente ao úmero (Figura 4), o nervo musculocutâneo dissecado anteriormente, abaixo do bíceps braquial (Figura 5) e o ulnar foi neurolizado medialmente ao nervo mediano (Figura 6).

Figura 4 - Nervo radial marcado com tira de algodão

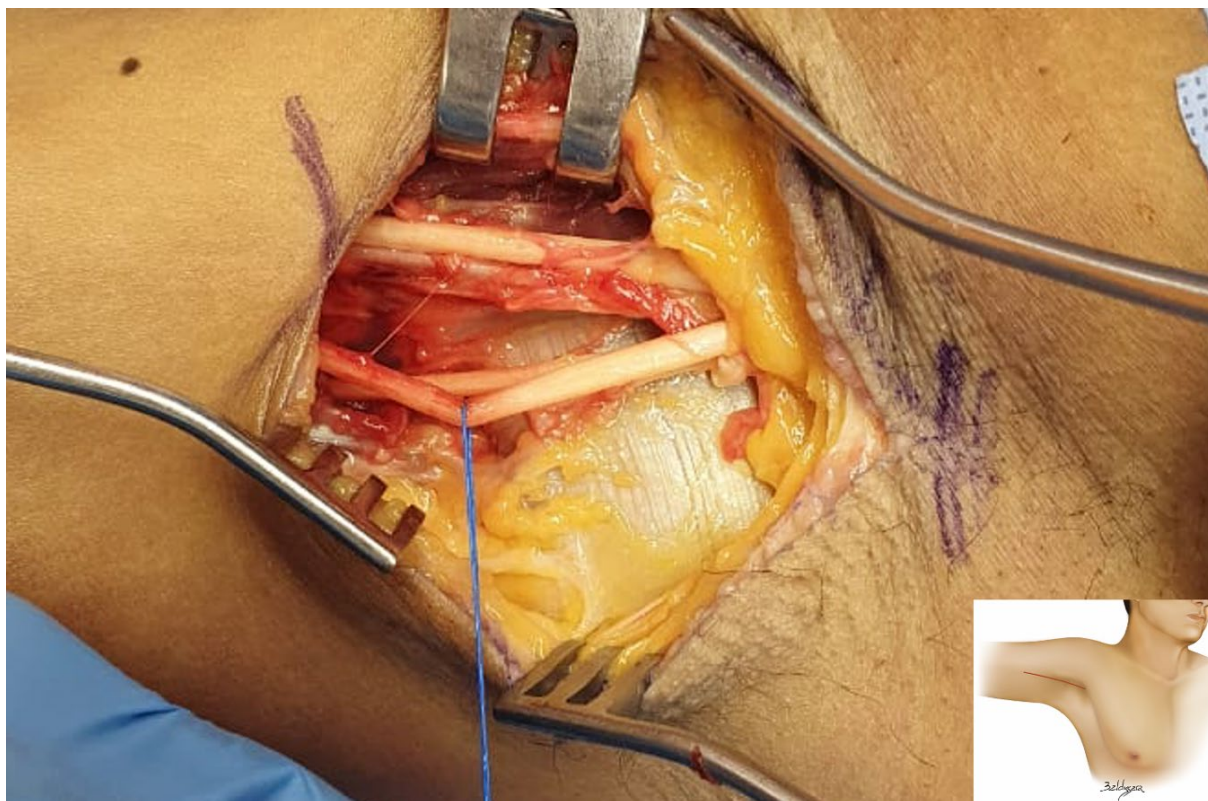


Fonte: Acervo pessoal do autor.

Figura 5 - Nervo musculocutâneo marcado com tira de algodão



Fonte: Acervo pessoal do autor.

Figura 6 - Nervo ulnar marcado com tira de algodão.

Fonte: Acervo pessoal do autor.

Os nervos então foram neurotomizados proximalmente e distalmente com lâmina de bisturi número 15 e ressecados com comprimento de 3 centímetros. O parâmetro anatômico do corte proximal do nervo foi a linha da prega axilar anterior.

4.7 FORMAÇÃO DOS GRUPOS

Foram ressecados 44 nervos numerados de 1 a 44 (Tabela 1).

Tabela 1 - Especificação de nervos radial, musculocutâneo, ulnar e mediano retirados para análise

	Direito				Esquerdo			
	Radial	Musculocutâneo	Ulnar	Mediano	Radial	Musculocutâneo	Ulnar	Mediano
Cadáver 1	1	2	3	4				
Cadáver 2	5	6	7	8				
Cadáver 3	9	10	11	12	13	14	15	16
Cadáver 4	17	18	19	20	21	22	23	24
Cadáver 5	25	26	27	28	29	30	31	32
Cadáver 6	33	34	35	36				
Cadáver 7	37	38	39	40	41	42	43	44

Cada segmento de nervo foi ressecado com 3 centímetros de comprimento (Figura 7) e então divididos em três segmentos menores, de 1 centímetro cada, formando os grupos C, G e D (Figura 8). Cada segmento menor foi encaminhado para um dos três diferentes métodos de preservação dentro dos seus respectivos frascos com marcação dos respectivos grupos e do número da amostra (Figura 9).

- Grupo C: nervos preservados a frio;
- Grupo G: nervos preservados com glicerol;
- Grupo D: nervos processados com detergentes.

Figura 7 - Segmento de nervo



Fonte: Acervo pessoal do autor.

Figura 8 - Segmento de nervo cortado para diferentes métodos de preservação



Fonte: Acervo pessoal do autor.

Figura 9 - Frascos de preservação dos aloenxertos em seus respectivos grupos



Fonte: Acervo pessoal do autor.

4.8 MÉTODOS DE PRESERVAÇÃO

4.8.1 Grupo C: conservados a frio

Os nervos foram colocados em tubos plásticos contendo solução Custodiol® e conservados por 14 dias a 4° C em refrigerador de controle contínuo de temperatura.

A Solução Custodiol® é utilizada para perfusão e preservação de órgãos. Sua composição é: Cloreto de sódio, Cloreto de potássio, Cloreto de magnésio x 6 H₂O, Hidroclorato de histidina x H₂O, Histidina, Triptofano, Manitol, Cloreto de cálcio x 2 H₂O, Alfa-cetoglutarato (Hidrogenato de potássio 2-cetoglutarato), Água para injetáveis e adjuvantes. Possui osmolaridade: 300 mosmol/kg e é aprovada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) sob o registro N° 80185570001. Fabricada em Bensheim na Alemanha, pelo laboratório Dr. Franz Kohler Chemie GMBH e comercializada no Brasil pela empresa Contatti Comércio e Representações.

4.8.2 Grupo G: conservados em glicerol

Os nervos foram colocados em tubos plásticos contendo solução de glicerol a 98% e conservados por 7 dias a 4° C em refrigerador de controle contínuo de temperatura.

4.8.3 Grupo D: processados com detergente

Os nervos foram processados de acordo com o protocolo de Hudson et al. (2004b):

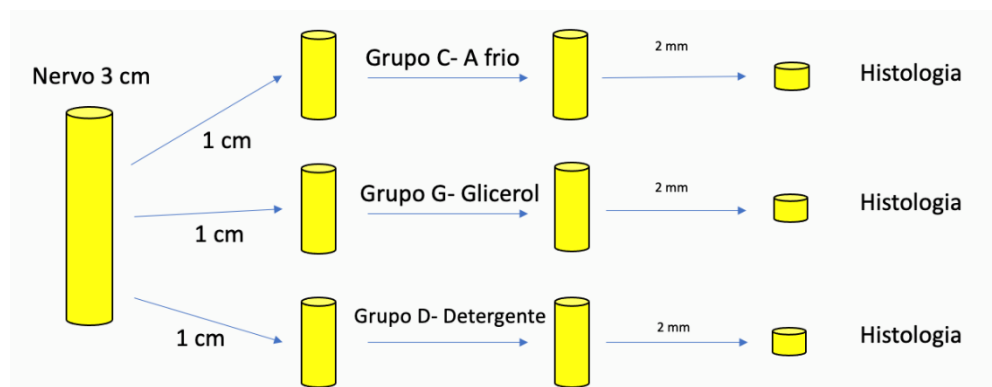
- Tempo zero: 7 mL de água destilada e agitados em temperatura ambiente;
- Após 7 horas: solução tamponada de sódio-fosfato (PBS) 10 mM contendo sulfobetaína-10 (SB-10) 125 mM;
- Após 15 horas: lavados com PBS por 15 min e transferidos para uma solução de PBS contendo 0,6 mM de sulfabetaína-16 e 14% de TritonX-200;
- Após 24 horas: nervos lavados mais três vezes em PBS por 5 min, colocados em solução de PBS contendo SB-10;
- Após 7 horas: lavados novamente em PBS e transferidos para solução contendo SB-16 e Triton X-200;
- Após 15 horas: lavados com PBS por 15 min e armazenados a 4 °C.

4.9 ANÁLISE HISTOLÓGICA

O preparo das lâminas foi realizado no Instituto Adolfo Lutz e o processamento dos nervos e análise histomorfométrica foi realizada no setor de Anatomia Patológica do Laboratório de Investigação Médica do Sistema Musculoesquelético (LIM-41) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP).

Após o processamento do nervo, de acordo com o estipulado para cada grupo, foi retirada uma amostra de 2 mm de comprimento da porção média de cada nervo e encaminhada para fixação e posterior estudo histológico. O fluxograma desde a retirada da amostra de nervos, processamento nos grupos e encaminhamento para análise está na Figura 10.

Figura 10 - Fluxograma da retirada de segmento do nervo, encaminhamento para o processamento específico e análise histológica



Fonte: Acervo pessoal do autor.

4.9.1 Protocolo de processamento de amostra para corte ultrafino

4.9.1.1 Fixação

Coleta do fragmento de nervo e imersão imediata em fixador (paraformaldeído 4%), preservado sob refrigeração (4°C -8°C) por 2 dias. Adicionada solução de lavagem (solução de sacarose) deixando por 30 minutos. Adicionada 1mL de solução de tetróxido de ósmio com ferricianeto e deixado por 2 horas e 30 minutos. Adicionada solução de lavagem deixando por 20 minutos. Este processo foi repetido por quatro vezes.

4.9.1.2 Desidratação

Adicionada acetona 50%, deixando por 30 minutos. Adicionada acetona 70%, deixando “overnight” sob refrigeração (4°C -8°C). Adicionada acetona 100%, deixando por 30 minutos.

4.9.1.3 Embebição em resina Epon

Adicionada resina Epon: acetona (1:1) deixando por 30 minutos. Adicionada resina Epon puro deixando por 24 horas.

4.9.1.4 Emblocamento

Transferido o fragmento em formas de silicone ou capsula de gelatina, de acordo com o tamanho. Preenchido com resina pura (Figura 11).

Figura 11 - Emblocamento e polimerização em resina Epon



Fonte: Acervo pessoal do autor.

4.9.1.5 Polimerização da resina

Levada a forma de silicone ou a capsula de gelatina contendo o fragmento à estufa 56°C por 3 dias.

4.9.1.6 Obtenção de corte semifino

Foi realizado corte semifino da amostra utilizando ultramicrotômo (Sorvall) e navalha de vidro para obtenção dos cortes.

Os cortes foram capturados em microscópio óptico e depositados em gota de água destilada estéril sobre uma lâmina de vidro (Figura 12).

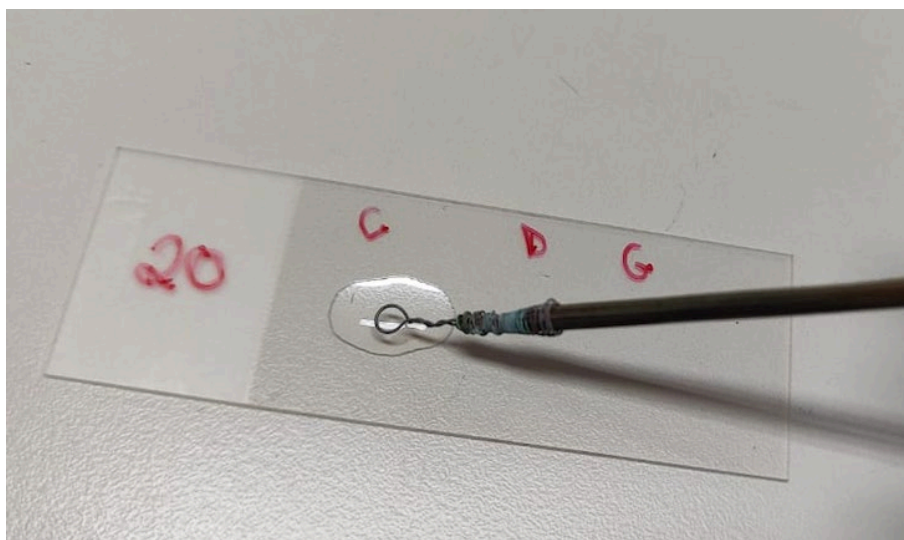
Figura 12 - Microscópio ótico Carl Zeiss Axiolab para captura inicial das lâminas de vidro após métodos de fixação



Fonte: Acervo pessoal do autor.

Posteriormente, os cortes foram fixados a quente, corados com azul de metileno 1%, lavados com água destilada estéril e secos (Figuras 13 e 14).

Figura 13 - Lavagem dos cortes nas lâminas de vidro



Fonte: Acervo pessoal do autor.

Figura 14 - Fixação e corante de azul de metileno 1%



Fonte: Acervo pessoal do autor.

4.9.2 Leitura da amostra em microscópio óptico

Cada segmento de nervo foi fixado com solução de glutaraldeído a 2% e em solução de tetróxido de ósmio a 1%, incluído em resina pura de peróxido de benzoíla a 1% e hidroximetilmetacrilato. Foram realizados cortes de 2 micras de espessura e corados com azul de toluidina a 1% (Figura 15).

Figura 15 - Exemplos das lâminas após os três métodos de fixação

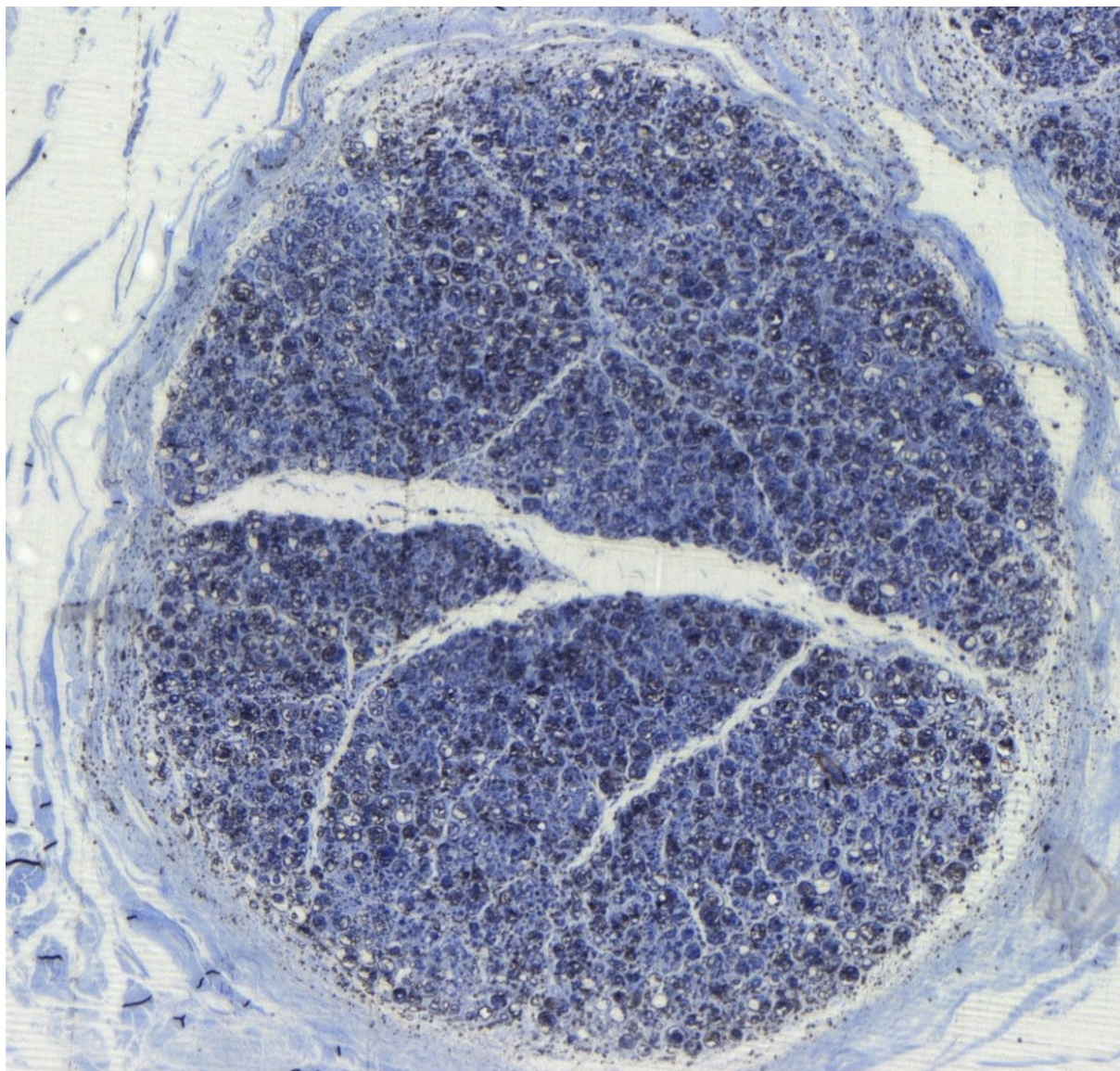


C: conservado a frio; D: detegente; G: glicerol.

Fonte: Acervo pessoal do autor.

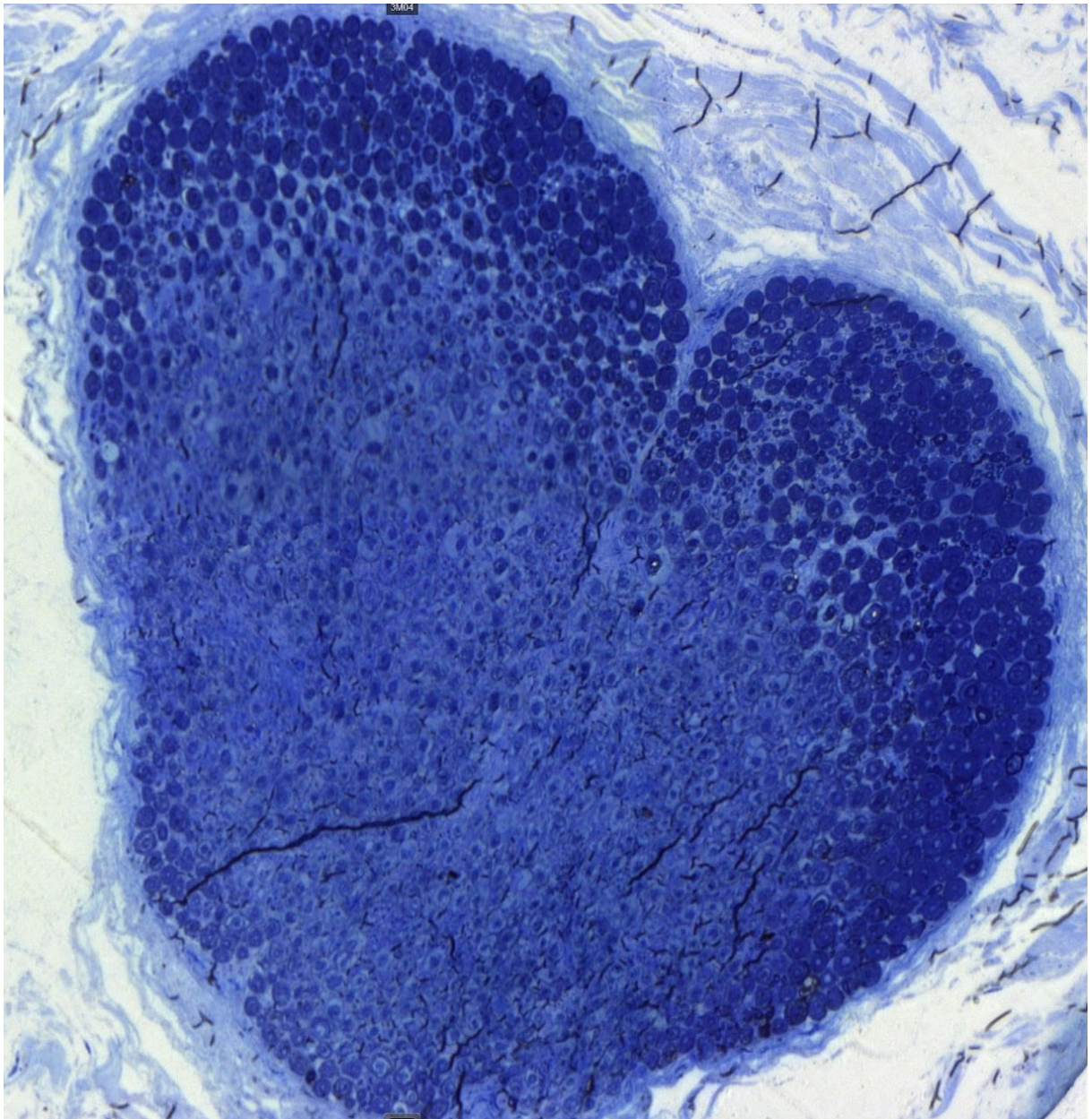
O material corado foi analisado ao microscópio óptico da marca Carl Zeiss Axiolab e foram realizadas fotografias digitais (Figuras 16, 17, 18 e 19) de todas as lâminas com objetiva de imersão (X400) e câmera acoplada. A câmera utilizada foi a JVC TK-1270 Color Vídeo Câmera com resoluções de 720 pixels de largura e 576 pixels de altura.

Figura 16 - Corte histológico de segmento de nervo preservado a frio com aumento de 40 vezes. Exemplo de foto realizada com a câmera JVC TK-1270



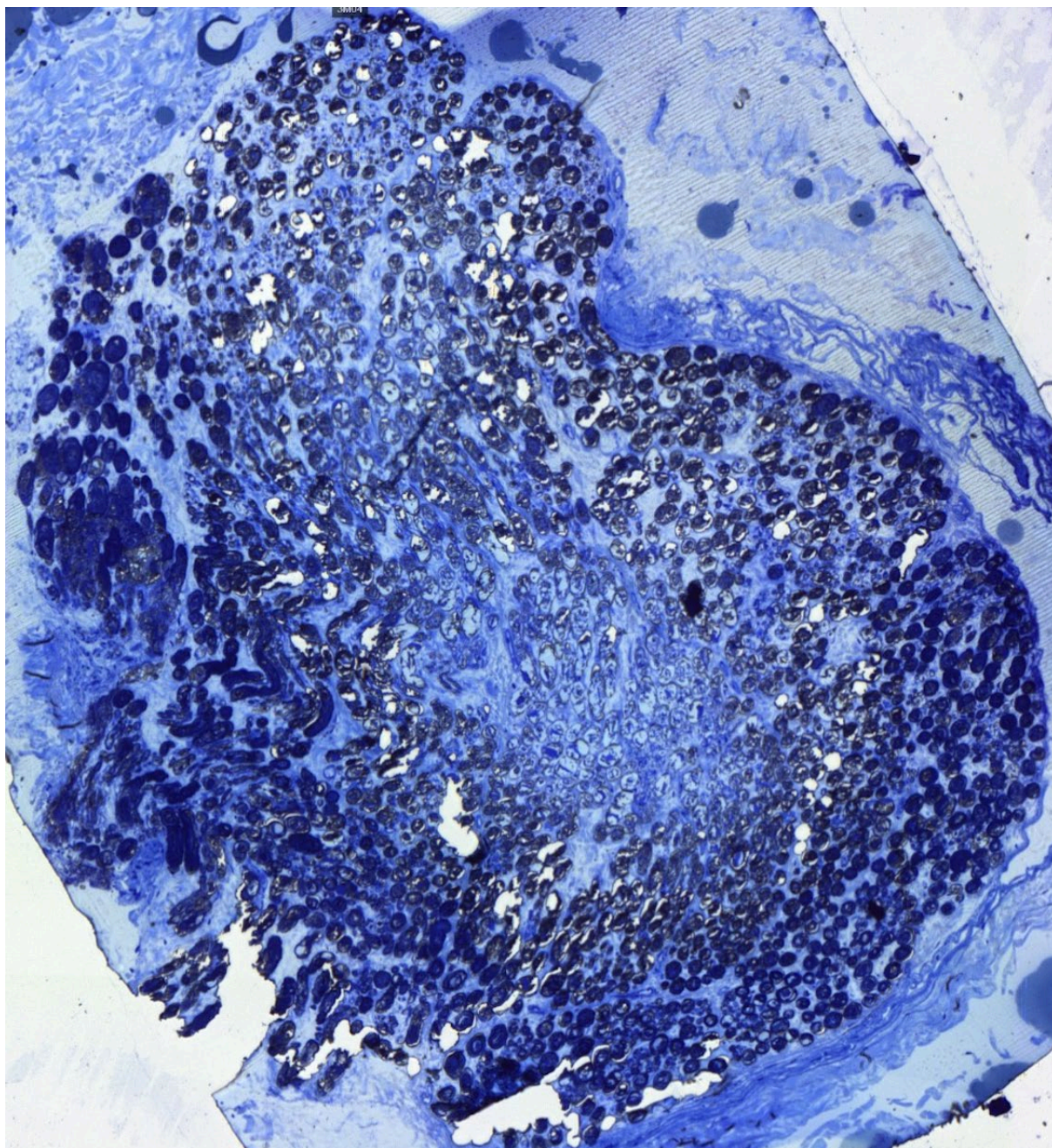
Fonte: Acervo pessoal do autor.

Figura 17 - Corte histológico de segmento de nervo preservado com detergente com aumento de 40 vezes. Foto realizada com a câmera JVC TK-1270



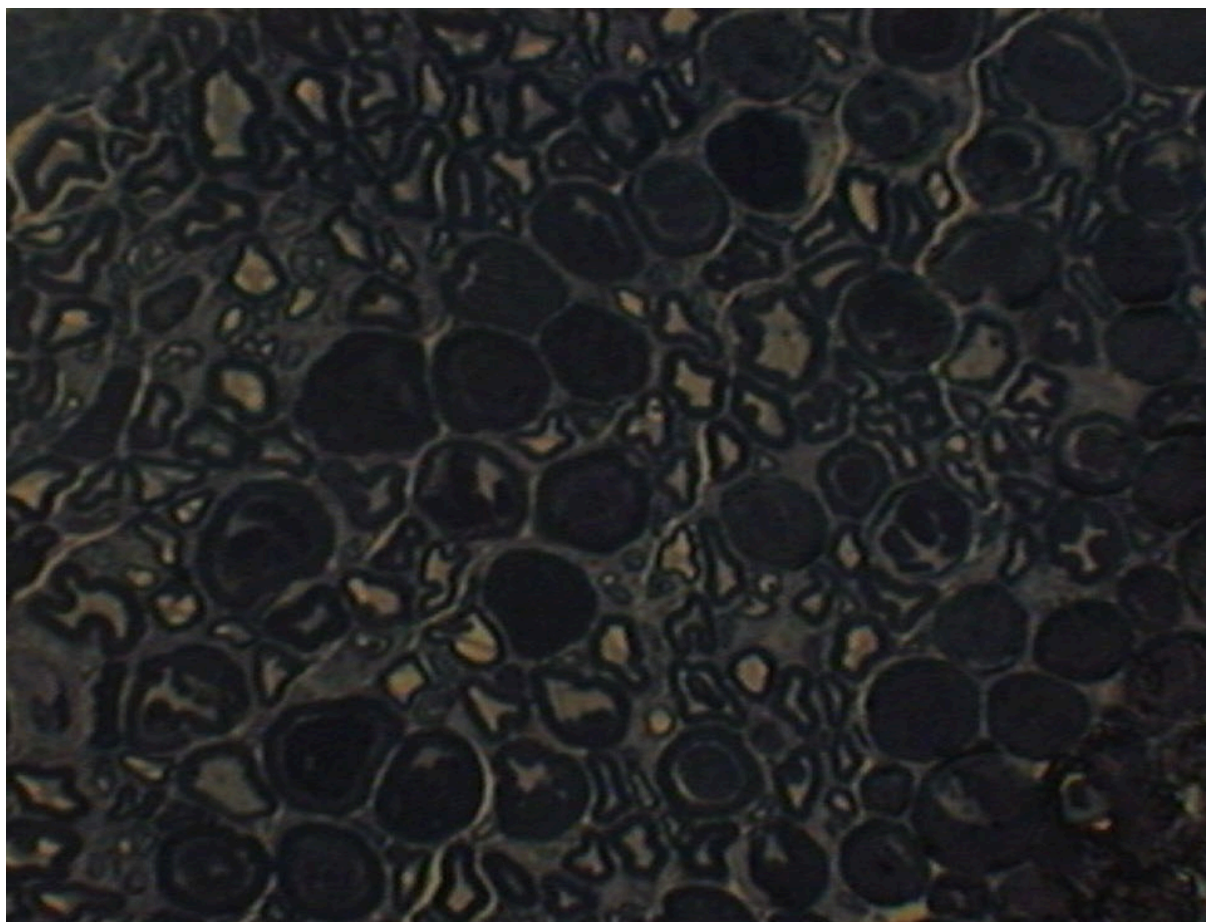
Fonte: Acervo pessoal do autor.

Figura 18 - Corte histológico de segmento de nervo preservado com glicerol com aumento de 40 vezes. Foto realizada com a câmera JVC TK-1270



Fonte: Acervo pessoal do autor.

Figura 19 - Corte histológico de segmento de nervo preservado à frio com aumento de 400 vezes. Foto realizada com a câmera JVC TK-1270



Fonte: Acervo pessoal do autor.

Além das fotografias, todas as amostras também foram escaneadas digitalmente pelo Laboratório de Investigação Médica da USP 05 (LIM-05), em padrão de alta resolução, para ser visualizada no programa SlideViwer 2.6 da 3DHISTECH (<https://www.3dhistech.com/research/software-downloads/>).

4.9.3 Medições

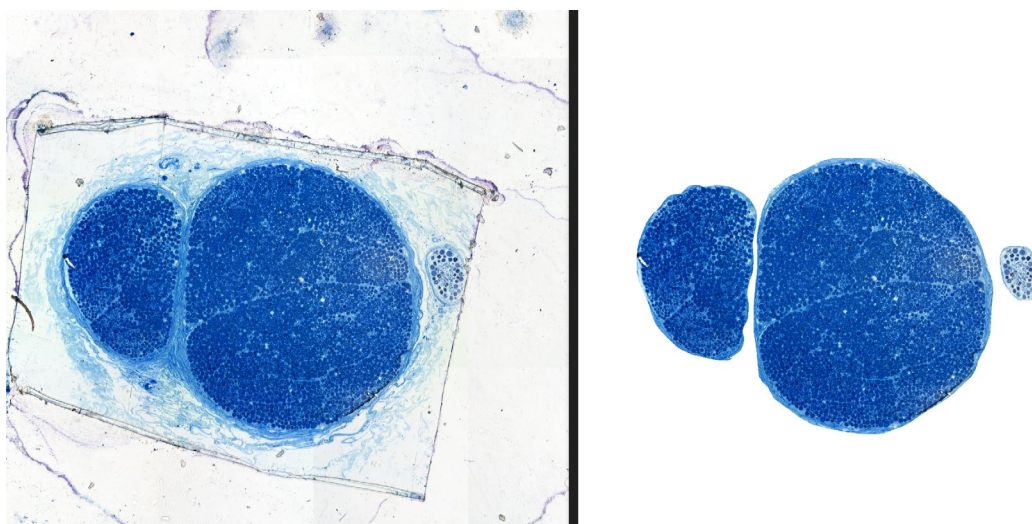
Para sistematizar e automatizar de maneira objetiva a contagem total de axônios, foi utilizada uma ferramenta para análise das lâminas escaneadas digitalmente, chamada de AxoNet 1.0, utilizado como plugin do programa de processamento de imagem Fiji (ImageJ). Este método de contagem de axônios foi validado por Ritch et al.(2020).

Todas as lâminas foram analisadas seguindo o mesmo padrão, em 15.0 x de aumento, em 20.000x20.000 pixels, salvas em formato .png. Por meio dessa padronização foi possível obter a escala em micrometros, que possibilita a análise da densidade de axônios e espessura da

bainha de mielina. Para o cálculo da densidade axonal foi utilizada a equação: número de axônios/área total dos fascículos (Schenck et al., 2016) e medida em número por micrômetros quadrados.

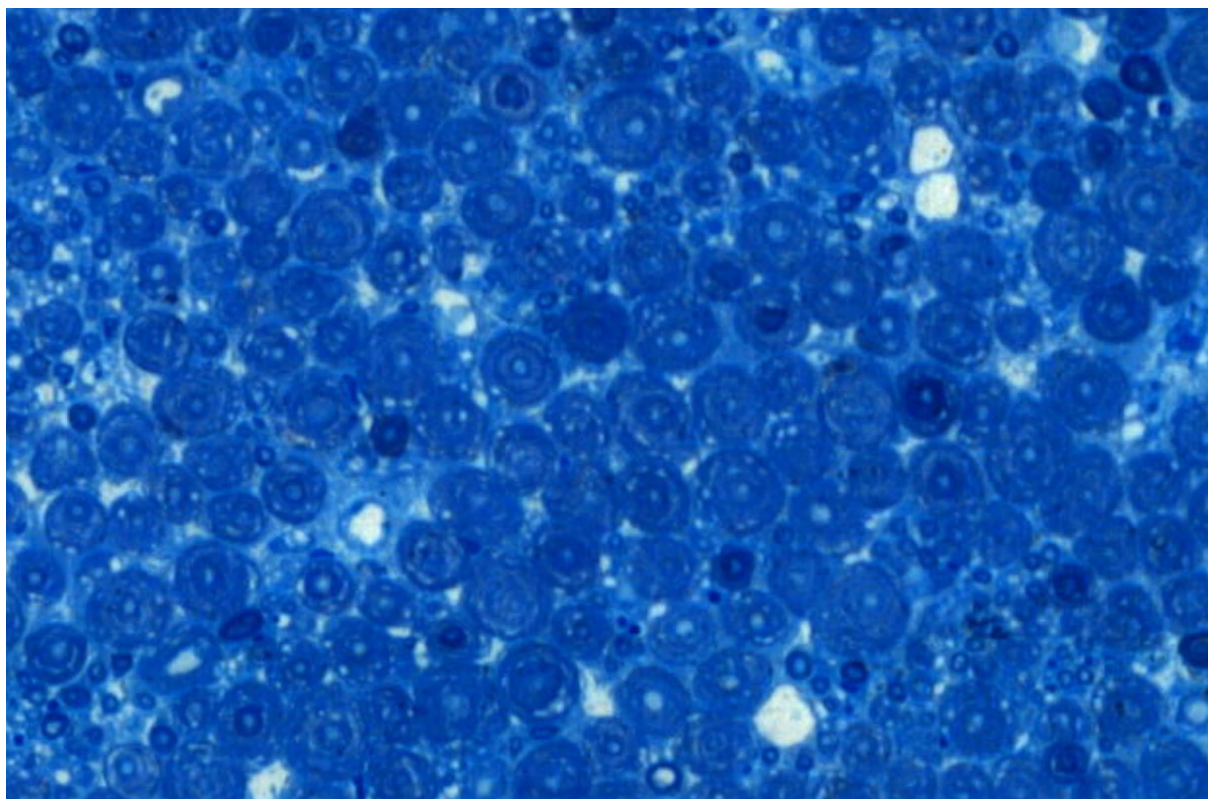
Após captação das imagens em zoom de 15.0x, foi excluída da imagem tudo que era artefato e não era nervo (Figuras 20 e 21). Por meio da imagem minimizada de artefatos, a análise foi realizada. Pelo algoritmo de análise do AxonNet 1.0, as imagens geradas de *Composite* e *Count density map* foram geradas, e a contagem foi realizada de maneira semiautomática (Figura 22).

Figura 20 - Exemplo da lâmina 7C, antes e depois da delimitação da área de análise



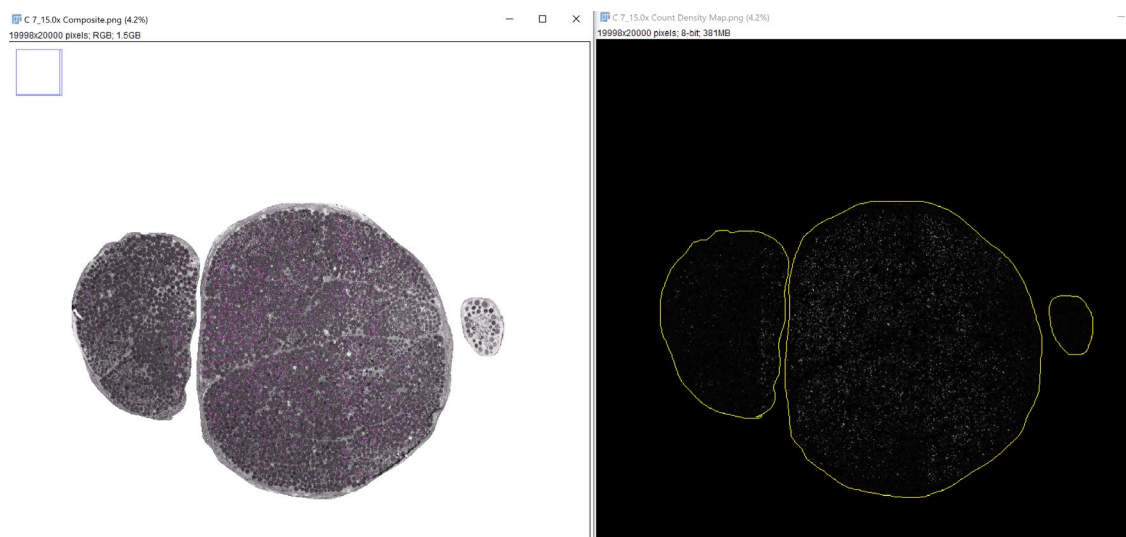
Fonte: Acervo pessoal do autor.

Figura 21 - Lâmina 7C após escaneamento digital. Exemplo da visão com aumento de 100X



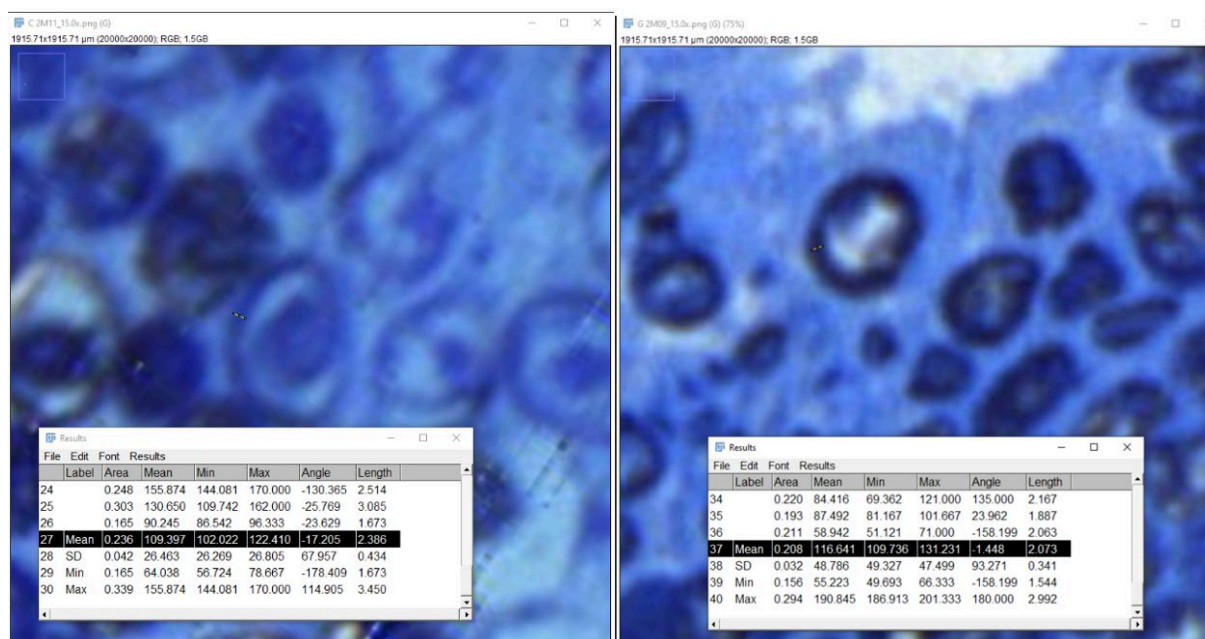
Fonte: Acervo pessoal do autor.

Figura 22 - Exemplo da lâmina 7C. A esquerda, imagem Composite. A direita, Count Density, com a linha em amarelo delimitando a área da secção transversa do neurônio, o que possibilita a estimativa da densidade por $\text{micrometro}^2 \times 1000$ de neurônios em cada tipo de método de conservação



Fonte: Acervo pessoal do autor.

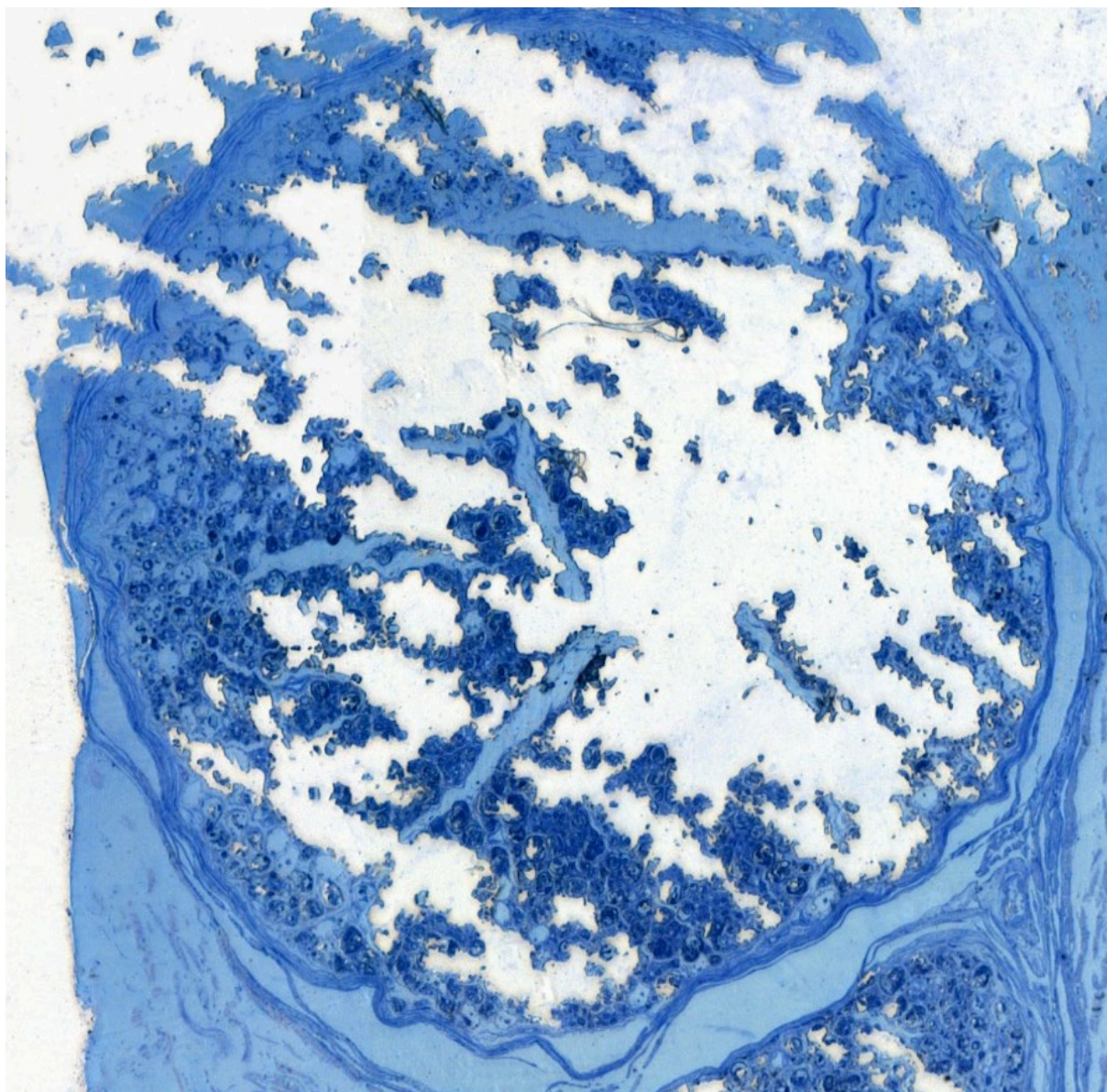
Pelo programa Fiji (ImageJ), também foi medida a espessura da bainha de mielina em micrômetros, por contagem manual, de ao menos 25 axônios aleatórios de todos os quadrantes das lâminas (Figura 23).

Figura 23 - Contagem manual da espessura das bainhas de mielina

Fonte: Acervo pessoal do autor.

Também avaliou-se a arquitetura geral da matriz extracelular pela análise da arquitetura geral do nervo processado, do padrão de organização axonal em fascículos, da disposição do tecido conjuntivo, da presença de escape de fibras axonais para fora dos limites do epineuro, e, por meio destes parâmetros classificou-se a matriz extracelular como destruída (Figura 24) ou normal (Figuras 16, 17 e 18).

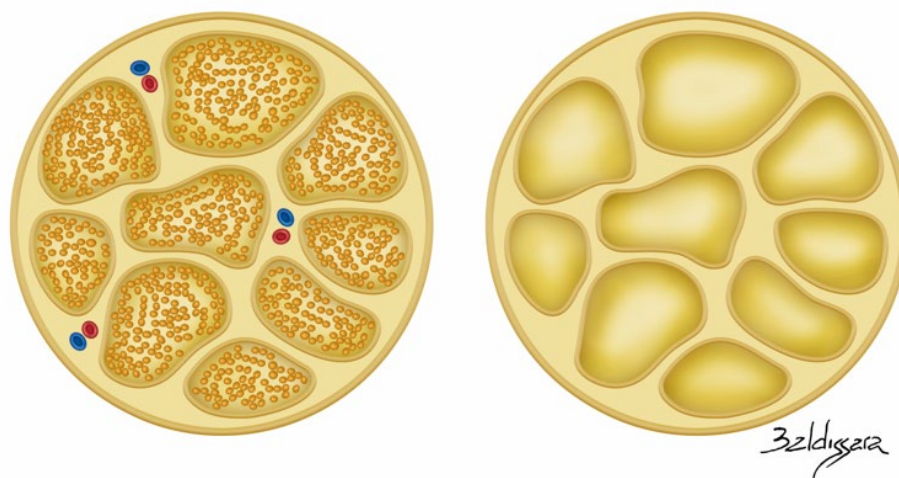
Figura 24 - Exemplo de matriz extracelular destruída



Fonte: Acervo pessoal do autor.

O aloenxerto de nervo ideal apresenta matriz extracelular normal, com baixa contagem de axônios, densidade axonal, espessura da bainha de mielina e de debris celulares (Hundepool et al. (2017) (Figura 25).

Figura 25 - Ilustração demonstrando enxerto de nervo celular a esquerda e aloenxerto de nervo acelular a direita



Fonte: Hundepool et al. (2017) (com permissão no Anexo F).

4.10 ANÁLISE DOS DADOS

Com objetivo de comparar qual dos métodos de preservação é melhor, o presente estudo foi conduzido com sete cadáveres. Destes foram dissecados quatro nervos diferentes- mediano, musculocutâneo, radial e ulnar - totalizando 44 nervos, que foram divididos em três partes, e enviados para preservação em três métodos diferentes: C, D e G. Após o tempo específico designado para cada tipo de preservação, as amostras foram enviadas para análise histológica que analisou o número de axônios, espessura de bainha de mielina, área dos nervos, densidade de axônios e uma avaliação qualitativa que classificou o estado do nervo como normal ou destruído.

Os dados foram armazenados em uma planilha de Excel® e posteriormente importados para o App Jamovi® que utiliza linguagem R, para análise dos dados. Os dados contínuos foram submetidos ao teste de distribuição de Shapiro Wilk, e como a maioria dos dados não obtiveram distribuição normal, os dados foram descritos pela mediana e pelo percentil 25 e 75 (p25 e p75) e testes não paramétricos foram realizados. Além disso, como cada método veio de uma parte do mesmo nervo, assumiu-se que os dados poderiam ser tratados como dados pareados, e desta forma o teste para comparação entre os métodos foi o teste de Friedman, como comparação de pares *post-hoc* com o teste de Durbin-Conover.

Os dados categóricos foram descritos pela sua ocorrência absoluta e sua respectiva proporção dentro da variável e entre os métodos. Teste qui-quadrado foi utilizado para comparação entre os métodos.

Uma probabilidade menor ou igual a 0,05 para o erro do tipo I foi aceita como estatisticamente significativa.

5 RESULTADOS

Um total de 44 amostras de segmentos de nervo foram analisadas, 28 eram do lado direito e 16 eram do lado esquerdo.

Os Quadros *baseline* para a contagem de axônios, área, densidade de axônios, espessura da bainha de mielina, e classificação da matriz extracelular normal ou destruída estão nos Anexos G, H, I, J e K.

Em relação à contagem de axônios, a comparação realizada pelo teste de Friedman mostrou que há diferença entre os métodos, $p = 0,025$.

A Tabela 2 mostra a estatística descritiva da contagem de axônios obtidos dos três métodos de preservação.

Tabela 2 - Estatística descritiva da contagem de axônios nos grupos C, D e G

	N	Média	IC 95%		DP	Mínimo	Máximo	Percentis		
			Lim. Inferior	Superior				25th	50th	75th
Contagem C	44	7790	6555	9026	4063	2153	18791	4622	7046	10077
Contagem D	44	8650	7363	9937	4235	2752	19063	5496	8523	10390
Contagem G	44	8964	7632	10296	4380	2242	20276	5806	8964	11018

IC: intervalo de confiança; DP: desvio-padrão; Lim.: limite.

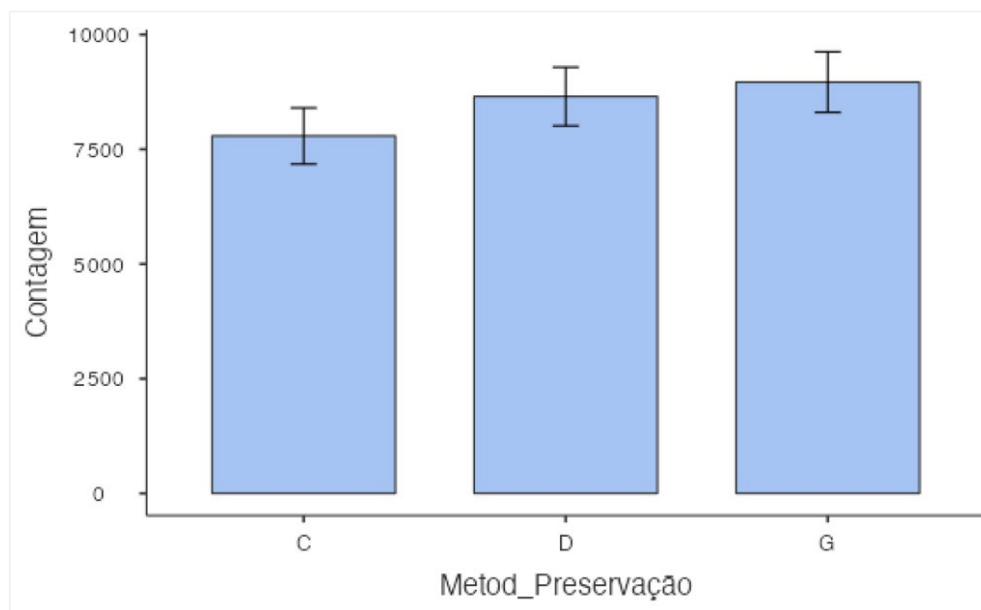
Nota. O IC da média assume que a distribuição amostral da média segue uma distribuição t com N-1 graus de liberdade

Na Tabela 3, pode-se observar na análise *post-hoc*, teste de Durbin-Conover, na comparação entre cada par de método de conservação, em que o método C diferiu do método G, $p = 0,007$.

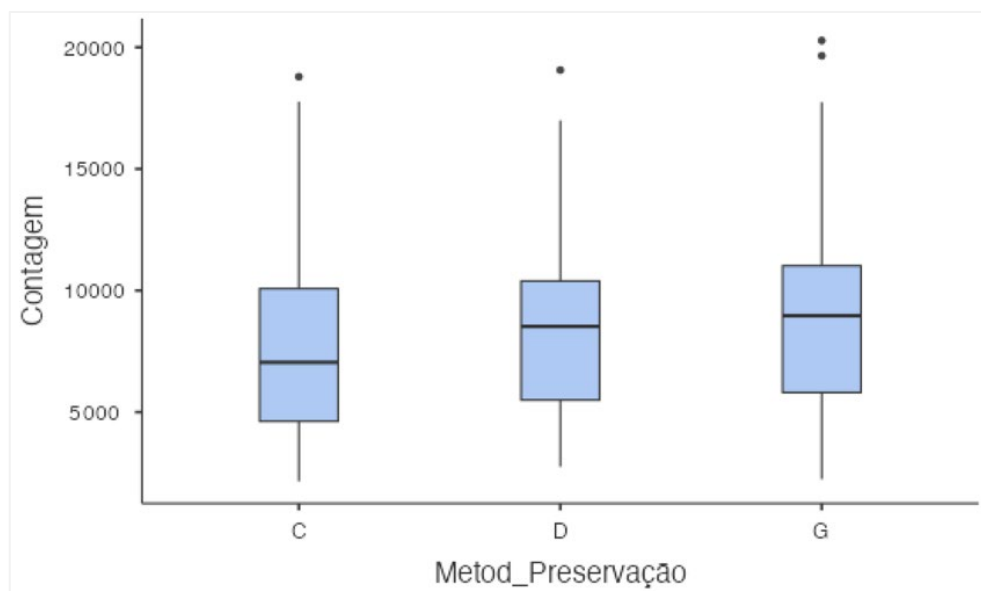
Tabela 3 - Comparações entre os pares de grupos em relação a contagem de axônios

Comparações Múltiplas (Durbin-Conover)	Estatística	p
Contagem C vs. Contagem D	1,872	0,065
Contagem C vs. Contagem G	2,753	0,007
Contagem D vs. Contagem G	0,881	0,381

No Gráfico 1, nota-se a distribuição de acordo com as médias de número de axônios e o desvio-padrão.

Gráfico 1 - Médias de contagem do número de axônios nos três grupos

No Gráfico 2, pode-se avaliar os valores mínimos e máximos do número de axônios e a mediana de cada método de preservação.

Gráfico 2 - Medianas de contagem do número de axônios nos três grupos

A Tabela 4 mostra a estatística descritiva da área de nervos obtidos dos três métodos de preservação. A comparação realizada pelo teste de Friedman mostrou que há diferença entre os métodos, $p = 0,049$.

Tabela 4 - Estatística descritiva da área dos nervos nos grupos C, D e G

	N	Média	DP	Mínimo	Máximo	Percentis		
						25th	50th	75th
Área μm^2 C	44	1.126.476,20	693.873	272.936	2.938.700	647.070	930.893	1.24e+6
Área μm^2 D	44	1266115,523	634.377	384.171	2.852.897	737.739	1.171.686	1.63e+6
Área μm^2 G	44	1257672,432	663.616	264.646	3.289.604	789.946	1.218.237	1.59e+6

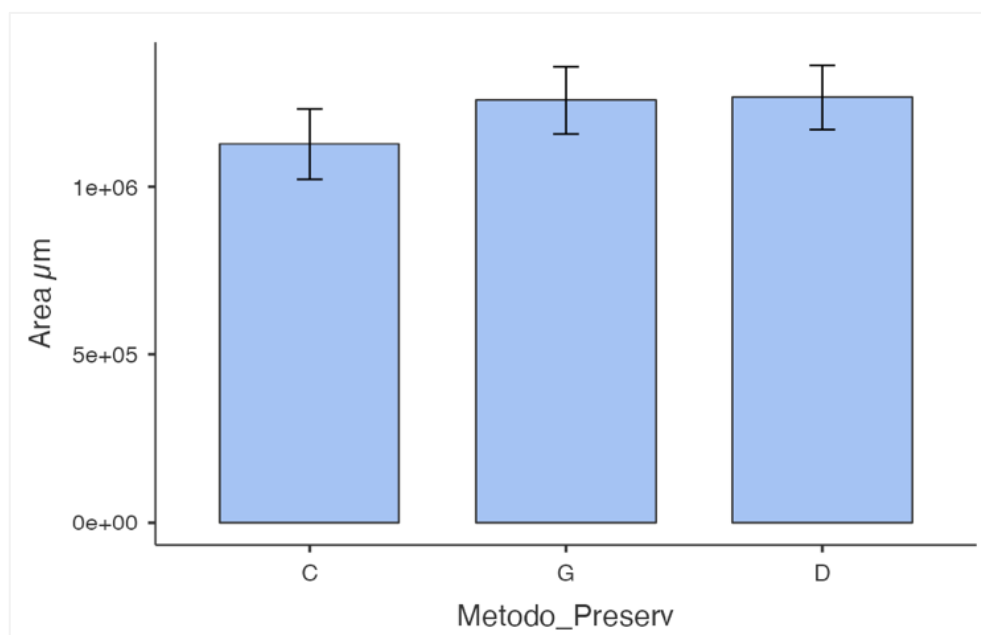
DP: desvio-padrão.

Na Tabela 5 pode-se observar pela análise *post-hoc*, teste de Durbin-Conover, na comparação entre cada par de método de conservação, que o método C diferiu do método D, $p = 0,018$.

Tabela 5 - Comparações entre os pares de grupos em relação a área dos nervos

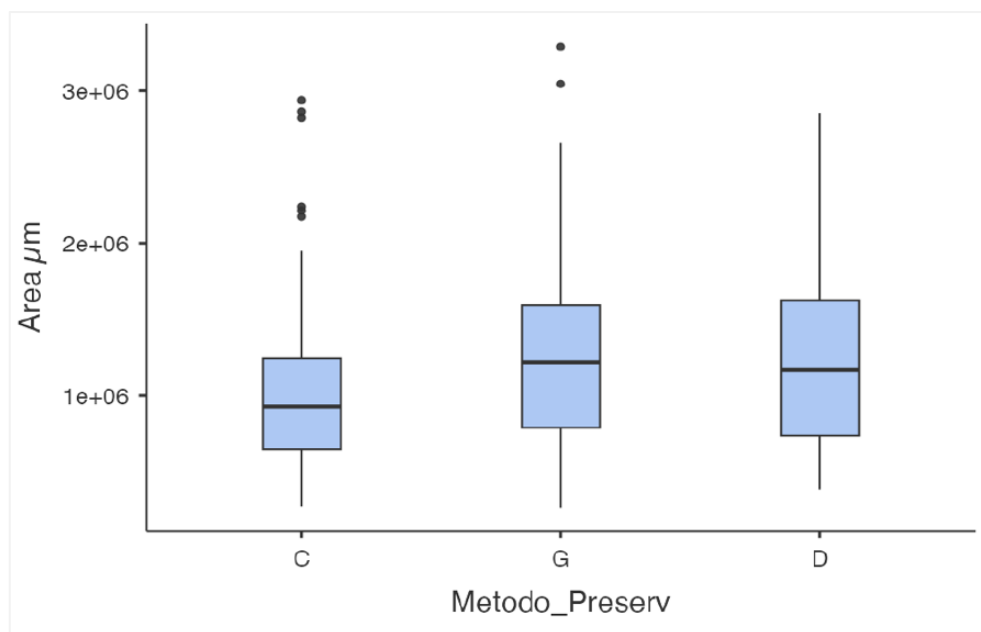
Comparações Múltiplas (Durbin-Conover)	Estatística	p
Área μm^2 C vs. Área μm^2 D	2,402	0,018
Área μm^2 C vs. Área μm^2 G	1,856	0,067
Área μm^2 D vs. Área μm^2 G	0,546	0,586

No Gráfico 3 se observa a distribuição de acordo com as médias de área e o desvio-padrão.

Gráfico 3 - Médias dos valores das áreas nos três grupos

O Gráfico 4 mostra os valores mínimos e máximos em relação a área e a mediana de cada método de preservação.

Gráfico 4 - Medianas das áreas dos nervos nos três grupos



A Tabela 6 mostra a estatística descritiva da densidade dos axônios obtidos dos três métodos de preservação. A comparação realizada pelo teste de Friedman mostrou que há diferença entre os métodos, $p = 0,002$.

Tabela 6 - Estatística descritiva da densidade dos axônios nos grupos C, D e G

	N	Média	DP	Mínimo	Máximo	Percentis		
						25th	50th	75th
Densidade C	44	7,36	2,06	5,26	15,1	6,04	6,74	7,60
Densidade D	44	7,08	2,08	4,89	13,5	5,72	6,09	7,87
Densidade G	44	7,31	1,51	5,50	14,1	6,28	7,13	7,90

DP: desvio-padrão.

Na Tabela 7, observa-se na análise *post-hoc*, teste de Durbin-Conover, a comparação entre cada par de método de conservação, em que o método C diferiu do método D, $p = 0,019$ e o método D diferiu do método G, $p < 0,001$.

Tabela 7 - Comparações entre os pares de grupos em relação a densidade dos axônios

Comparações Múltiplas (Durbin-Conover)	Estatística	p
Densidade C vs. Densidade D	2,39	0,019
Densidade C vs. Densidade G	1,37	0,175
Densidade D vs. Densidade G	3,76	<0,001

Os Gráficos 5 e 6 mostram os valores descritivos da média, desvio-padrão e mediana em relação a cada grupo.

Gráfico 5 - Médias dos valores das densidades de axônios nos três grupos

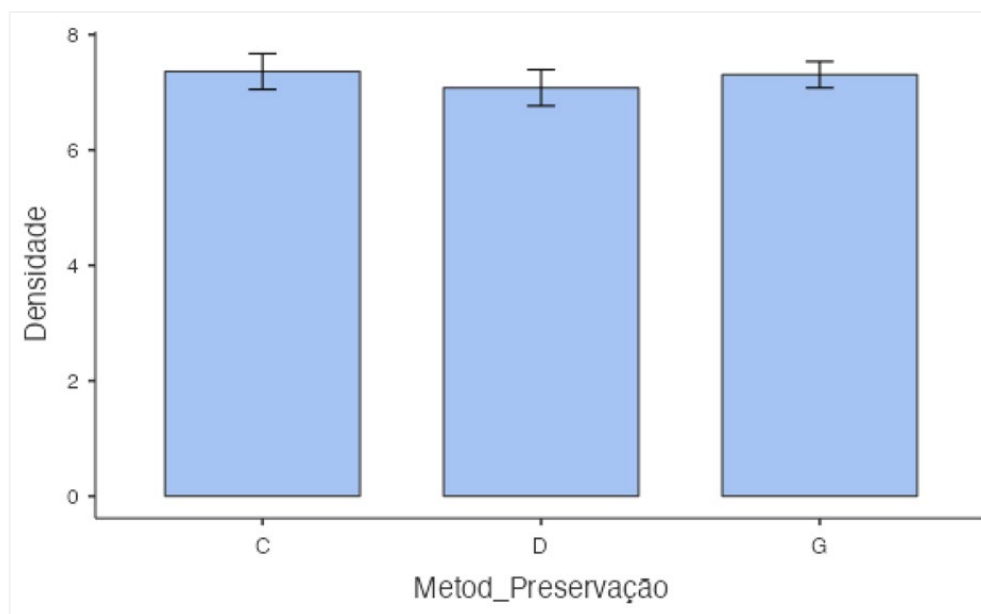
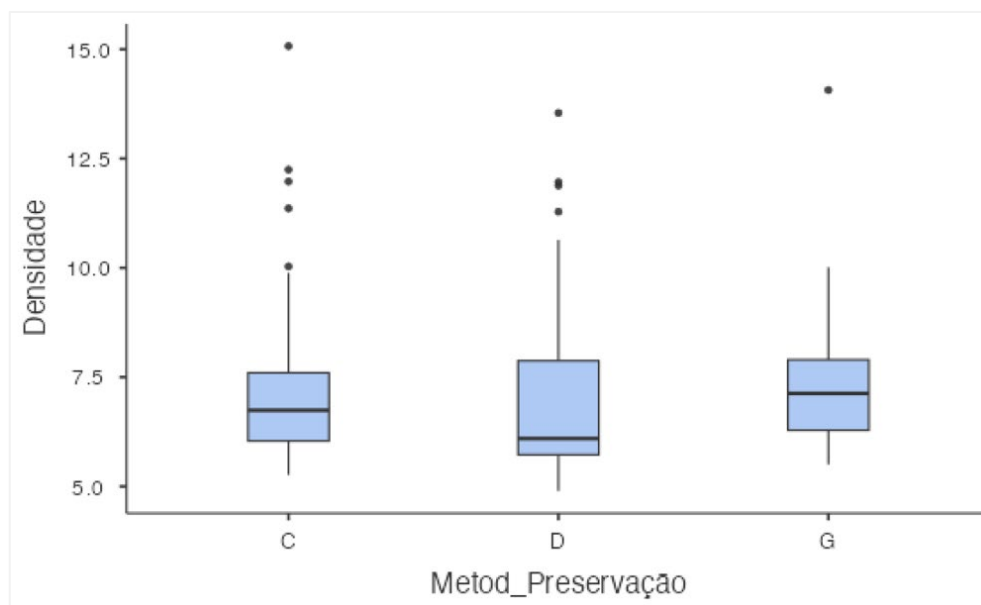


Gráfico 6 - Medianas da densidade dos axônios nos três grupos



A Tabela 8 mostra a estatística descritiva da espessura da bainha de mielina obtida dos três métodos de preservação. A comparação realizada pelo teste de Friedman mostrou que há diferença entre os métodos, $p = 0,003$.

Tabela 8 - Estatística descritiva da espessura da bainha de mielina nos grupos C, D e G

	N	Média	DP	Mínimo	Máximo	Percentis		
						25th	50th	75th
Densidade C	44	1,41	0,341	0,826	2,39	1,19	1,40	1,59
Densidade D	44	1,38	0,383	0,775	2,34	1,08	1,38	1,60
Densidade G	44	1,57	0,339	0,851	2,35	1,36	1,57	1,72

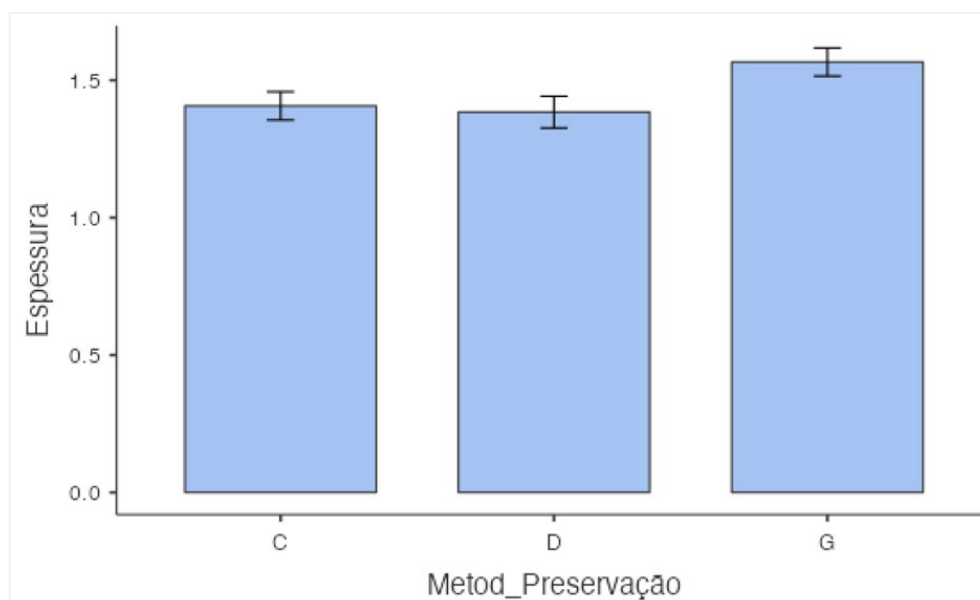
DP: desvio-padrão.

Na Tabela 9, pode-se observar na análise *post-hoc*, teste de Durbin-Conover, na comparação entre cada par de método de conservação, em que o método C diferiu do método G, $p = 0,011$ e o método D diferiu do método G, $p < 0,001$.

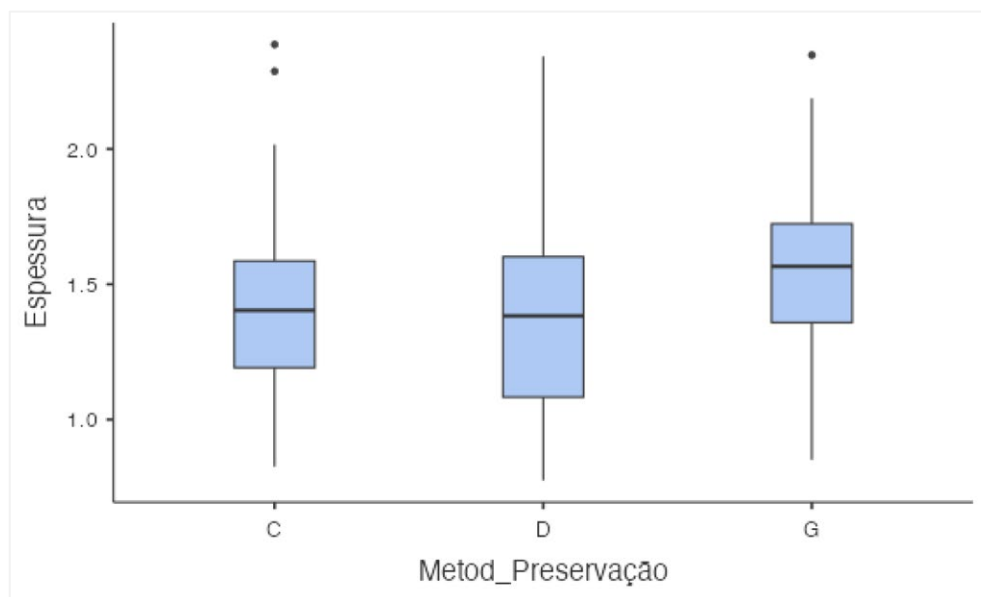
Tabela 9 - Comparações entre os pares de grupos em relação à espessura da bainha de mielina

Comparações Múltiplas (Durbin-Conover)	Estatística	p
Espessura C vs. Espessura D	0,906	0,368
Espessura C vs. Espessura G	2,604	0,011
Espessura D vs. Espessura G	3,510	<0,001

No Gráfico 7 notam-se os valores descritivos da espessura em relação à média e desvio-padrão de cada método.

Gráfico 7 - Médias dos valores das espessuras da bainha de mielina nos três grupos

O Gráfico 8 avaliou os valores mínimo, máximo e mediana da espessura em relação aos três métodos de processamento dos nervos.

Gráfico 8 - Medianas da espessura da bainha de mielina nos três grupos

A análise da diferença entre os quatro nervos avaliados em relação aos três modelos de processamento do nervo não mostrou diferença estatística, exceto em relação à contagem de axônios e à área para o grupo D, $p = 0,004$ e $p = 0,003$ respectivamente, como visto no Anexo L.

Em relação à contagem de axônios para o grupo D, o nervo musculocutâneo apresentou menor número de axônios em relação ao nervo mediano com $p = 0,012$, como visto na Tabela 10.

Tabela 10 - Comparações da contagem de axônios entre pares de nervos no grupo D

Comparações múltiplas - Contagem D	W	p
Mediano vs. Musculocutâneo	-4,32	0,012
Mediano vs. Radial	-2,65	0,240
Mediano vs. Ulnar	-3,39	0,077
Musculocutâneo vs. Radial	3,30	0,091
Musculocutâneo vs. Ulnar	1,81	0,575
Radial vs. Ulnar	-1,44	0,739

Em relação à área de secção axonal para o grupo D, o nervo mediano apresentou maior secção em relação ao musculocutâneo com $p=0,003$, e em relação ao nervo ulnar com $p=0,032$ como visto na Tabela 11.

Tabela 11 - Comparações das áreas dos axônios entre pares de nervos no grupo D: comparações múltiplas Dwass-Steel-Critchlow-Fligner

Comparações múltiplas - Área μm^2 D	W	p
Mediano vs. Musculocutâneo	-4,88	0,003
Mediano vs. Radial	-1,25	0,812
Mediano vs. Ulnar	-3,86	0,032
Musculocutâneo vs. Radial	3,48	0,066
Musculocutâneo vs. Ulnar	1,58	0,680
Radial vs. Ulnar	-1,81	0,576

A estatística descritiva do grupo D, único grupo que apresentou diferença quanto ao tipo de nervo utilizado está na Tabela 12.

Tabela 12 - Estatística descritiva em relação aos tipos de nervo para o grupo D

Método D	Nervo	N	Média	Desvio-padrão	Mínimo	Máximo	Shapiro-Wilk		Percentis		
							W	p	25th	50th	75th
Contagem	Mediano	11	12324,55	4.650.878	3.262.000	19063,00	0,952	0,663	9179,50	12748,00	15513,00
	Musculocutâneo	11	5738,82	2.547.250	2.752.000	9914,04	0,916	0,283	3602,00	5422,00	7731,00
	Radial	11	8974,91	3.357.764	3.778.000	14971,00	0,965	0,829	7167,00	7579,00	11312,50
	Ulnar	11	7562,09	3.480.889	2.763.000	15810,00	0,908	0,230	5980,50	6356,00	8858,00
Área μm^2	Mediano	11	1,79e+6	720.454.021	583783	2852897	0,929	0,398	1.32e+6	1,63e+6	2,37e+6
	Musculocutâneo	11	822056,27	339.194.733	384171	1266115	0,884	0,117	504212,50	905632,00	1,15e+6
	Radial	11	1,42e+6	614.739.794	623314	2225517	0,897	0,171	816823,50	1,47e+6	1,94e+6
	Ulnar	11	1,04e+6	345.352.610	467656	1628979	0,976	0,939	788584,00	1,05e+6	1,19e+6
Densidade	Mediano	11	7,08	1,935	5,004	11,28	0,872	0,083	5,75	6,82	7,78
	Musculocutâneo	11	7,18	2,301	5,706	13,54	0,665	<0,001	5,95	6,31	7,32
	Radial	11	6,74	1,953	5,147	11,88	0,739	0,001	5,62	5,91	7,09
	Ulnar	11	7,32	2,348	4,895	11,96	0,857	0,053	5,74	6,04	8,66
Espessura	Mediano	11	1,49	0,428	0,775	2,22	0,969	0,877	1,34	1,39	1,73
	Musculocutâneo	11	1,27	0,401	0,817	2,21	0,889	0,136	1,03	1,13	1,38
	Radial	11	1,51	0,397	1,000	2,34	0,933	0,443	1,18	1,51	1,74
	Ulnar	11	1,27	0,270	0,871	1,83	0,947	0,611	1,08	1,20	1,41

Nas amostras de nervos analisadas, a estatística descritiva da comparação entre os nervos que apresentavam matriz extracelular normal e destruída nos três grupos estudados é vista nas Tabelas 13, 14 e 15.

Tabela 13 - Frequências de matriz extracelular destruída ou normal no grupo C

C	Contagens	% do total	% acumulada
Destruída	2	4,5%	4,5%
Normal	42	95,5%	100,00%

Tabela 14 - Frequências de matriz extracelular destruída ou normal no grupo D

D	Contagens	% do total	% acumulada
Destruída	5	11,4%	11,4%
Normal	39	88,6%	100,00%

Tabela 15 - Frequências de matriz extracelular destruída ou normal no grupo G

G	Contagens	% do total	% acumulada
Destruída	6	13,6%	13,6%
Normal	38	86,4%	100,00%

Na comparação dentro de cada grupo, não é possível analisar normal vs. destruído no grupo C, pois só existiam $n = 2$ de destruídos. A estatística descritiva da análise da matriz extracelular normal e destruída no grupo C está na Tabela 16.

Tabela 16 - Estatística descritiva entre matriz extracelular normal e destruída para o grupo C

		N	Média	IC 95%		DP	Mínimo	Máximo	Shapiro-Wilk		Percentis		
C				Lim. Inferior	Superior				W	p	25th	50th	75th
Contagem C	Destruída	2	6900,50	-34273,96	48074,96	4582,76	3660,00	10141,00	NaN	NaN	5280,25	6900,50	8520,75
	Normal	42	7832,75	6556,88	9108,62	4094,29	2153,00	18791,00	0,93	0,011	4751,50	7046,00	10040,50
Área μm^2 C	Destruída	2	675271,00	-3810984,94	5161526,94	499324,87	322195	1028347	NaN	NaN	498733,00	675271,00	851809,00
	Normal	42	1147962,17	930169,73	1365754,60	698899,55	272936	2938700	0,86	<0,001	669263,75	930893,00	1410136,25
Densidade C	Destruída	2	10,61	1,09	20,13	1,06	9,86	11,36	NaN	NaN	10,24	10,61	10,99
	Normal	42	7,21	6,59	7,82	1,97	5,26	15,07	0,72	<0,001	6,03	6,63	7,48
Espessura C	Destruída	2	1,40	0,46	2,33	0,10	1,32	1,47	NaN	NaN	1,36	1,40	1,43
	Normal	42	1,41	1,30	1,52	0,35	0,83	2,39	0,95	0,079	1,19	1,40	1,60

IC: intervalo de confiança; Lim.: limite; DP: desvio-padrão.

Nota. O IC da média assume que a distribuição amostral da média segue uma distribuição t com N-1 graus de liberdade.

Foi realizada uma análise normal *vs.* destruída, no grupo D, mas a análise está com alto risco de erro do tipo II, pois só há $n = 5$ de destruídos, isso torna menor a chance de encontrar diferenças. A estatística descritiva da análise da matriz extracelular normal e destruída no grupo D está na Tabela 17.

Tabela 17 - Estatística descritiva entre matriz extracelular normal e destruída para o grupo D

	D	N	Média	IC 95%		DP	Mínimo	Máximo	Shapiro-Wilk		Percentis		
				Lim. Inferior	Superior				W	p	25th	50th	75th
Contagem D	Destruída	5	7219,01	3682,74	10755,27	2848,00	3262,00	9914,04	0,88	0,325	5203,00	8650,00	9066,00
	Normal	39	8833,56	7415,65	10251,47	4374,07	2752,00	19063,00	0,94	0,045	5598,00	8396,00	11312,50
Área μm^2 D	Destruída	5	828578,00	364919,16	1292236,84	373417,32	384171	1266115	0,94	0,647	583783,00	757899,00	1150922,00
	Normal	39	1322210,08	1114066,23	1530353,93	642097,25	422204	2852897	0,94	0,047	862450,50	1266115,00	1636904,00
Densidade D	Destruída	5	9,31	5,12	13,49	3,37	5,59	13,54	0,94	0,647	6,83	8,61	11,96
	Normal	39	6,79	6,24	7,35	1,72	4,89	11,88	0,81	<0,001	5,72	6,04	7,15
Espessura D	Destruída	5	1,36	0,74	1,98	0,50	1,01	2,22	0,78	0,051	1,06	1,13	1,38
	Normal	39	1,39	1,27	1,51	0,37	0,78	2,34	0,97	0,351	1,09	1,38	1,61

IC: intervalo de confiança; Lim.: limite; DP: desvio-padrão.

Nota. O IC da média assume que a distribuição amostral da média segue uma distribuição t com N-1 graus de liberdade.

Assim, o teste não paramétrico de Mann-Whitney não identificou diferença estatisticamente significativa para nenhuma das variáveis (contagem de axônios, área, densidade e espessura, $p > 0,05$).

Foi realizada uma análise normal vs. destruído, no método G, mas a análise está com alto risco de erro do tipo II, pois só há $n = 6$ de destruídos, isso torna menor a chance de encontrar diferenças. A estatística descritiva da análise da matriz extracelular normal e destruída no grupo G está na Tabela 18.

Tabela 18 - Estatística descritiva entre matriz extracelular normal e destruída para o grupo G

	G	N	Média	IC 95%		DP	Mínimo	Máximo	Shapiro-Wilk		Percentis		
				Lim. Inferior	Superior				W	p	25th	50th	75th
Contagem G	Destruída	6	6748,17	-298,28	13794,61	6714,51	2242	20276	0,65	0,002	3781,50	4436,00	5260,75
	Normal	38	9314,05	8028,99	10599,11	3909,61	2666	19652	0,95	0,082	6302,00	8964,00	11130,00
Área μm^2 G	Destruída	6	968708,17	-110219,03	2047635,36	1028102,30	264646	3045184	0,63	<0,001	580508,75	627535,50	668770,00
	Normal	38	1303298,37	1107931,38	1498665,36	594377,41	429782	3289604	0,90	0,004	862429,75	1257672,00	1614191,75
Densidade G	Destruída	6	7,36	5,83	8,89	1,46	5,85	9,63	0,93	0,600	6,27	7,04	8,21
	Normal	38	7,30	6,79	7,80	1,54	5,50	14,07	0,77	<0,001	6,32	7,13	7,78
Espessura G	Destruída	6	1,70	1,12	2,27	0,55	1,10	2,35	0,86	0,183	1,25	1,66	2,14
	Normal	38	1,55	1,45	1,64	0,30	0,85	2,13	0,97	0,295	1,40	1,57	1,71

IC: intervalo de confiança; Lim.: limite; DP: desvio-padrão.

Nota. O IC da média assume que a distribuição amostral da média segue uma distribuição t com N-1 graus de liberdade.

Assim, o teste não paramétrico de Mann-Whitney não identificou diferença estatisticamente significativa para densidade e para espessura, $p > 0,05$. No entanto, no método G, houve diferença entre as matrizes normais e destruídas para contagem de axônios, $p = 0,027$ e para área, $p = 0,025$.

A comparação entre os três tipos de métodos, com exclusão dos casos em que as matrizes foram consideradas destruídas foi realizada, e a estatística descritiva está na Tabela 19.

Tabela 19 - Comparação da contagem de axônios, área, densidade axonal e espessura da bainha de mielina entre os grupos C, D e G após exclusão dos casos com matrix extracelular destruída

	Método	N	Média	IC 95%		DP	Mínimo	Máximo	Shapiro-Wilk		Percentis		
				Lim. Inferior	Superior				W	p	25th	50th	75th
Contagem	C	42	7832,75	6556,88	9108,62	4094,29	2153,00	18791,00	0,93	0,011	4751,50	7046,00	10040,50
	D	39	8833,56	7415,65	10251,47	4374,07	2752,00	19063,00	0,94	0,045	5598,00	8396,00	11312,50
	G	38	9314,05	8028,99	10599,11	3909,61	2666,00	19652,00	0,95	0,082	6302,00	8964,00	11130,00
Área μm^2	C	42	1147962,17	930169,73	1365754,60	698899,55	272936	2938700	0,86	<0,001	669263,75	930893,00	1410136,25
	D	39	1322210,08	1114066,23	1530353,93	642097,25	422204	2852897	0,94	0,047	862450,50	1266115,00	1636904,00
	G	38	1303298,37	1107931,38	1498665,36	594377,41	429782	3289604	0,90	0,004	862429,75	1257672,00	1614191,75
Densidade	C	42	7,21	6,59	7,82	1,97	5,26	15,07	0,72	<0,001	6,03	6,63	7,48
	D	39	6,79	6,24	7,35	1,72	4,89	11,88	0,81	<0,001	5,72	6,04	7,15
	G	38	7,30	6,79	7,80	1,54	5,50	14,07	0,77	<0,001	6,32	7,13	7,78
Espessura	C	42	1,41	1,30	1,52	0,35	0,83	2,39	0,95	0,079	1,19	1,40	1,60
	D	39	1,39	1,27	1,51	0,37	0,78	2,34	0,97	0,351	1,09	1,38	1,61
	G	38	1,55	1,45	1,64	0,30	0,85	2,13	0,97	0,295	1,40	1,57	1,71

IC: intervalo de confiança; Lim.: limite; DP: desvio-padrão.

Nota. O IC da média assume que a distribuição amostral da média segue uma distribuição t com N-1 graus de liberdade.

Os dados foram comparados em relação aos métodos C vs. D, vs. G. Para a comparação das duas primeiras medidas, contagem de axônios e área, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis, pois pode-se observar na Tabela 19 que a distribuição não foi simétrica (teste de Shapiro-Wilk, $p < 0,05$). O teste de Kruskal-Wallis não identificou diferença entre os métodos, para a contagem, $p = 0,211$ e também não identificou diferença estatisticamente significativa para a área, $p = 0,129$.

Os Gráficos 9, 10, 11 e 12 demonstram os valores da contagem de axônios e da área em relação aos três métodos.

Gráfico 9 - Médias da contagem do número de axônios nos três grupos após exclusão dos casos com matriz extracelular destruída

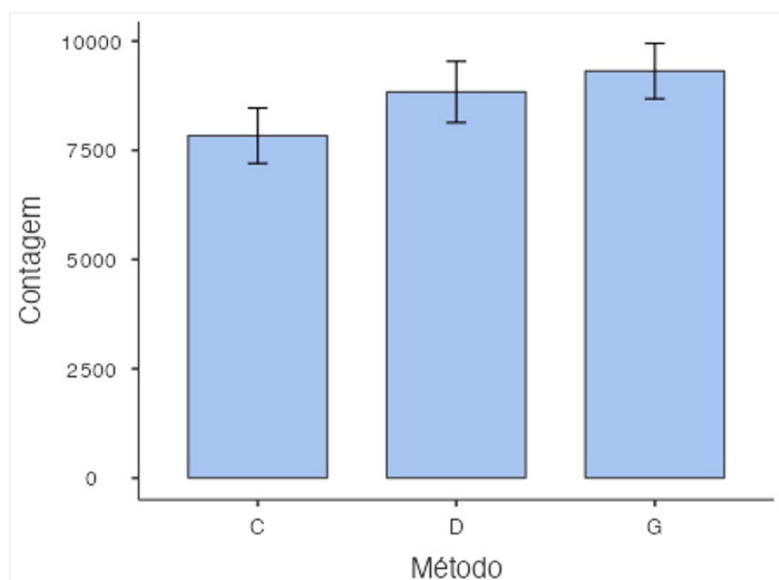


Gráfico 10 - Medianas da contagem do número de axônios nos três grupos após exclusão dos casos com matriz extracelular destruída

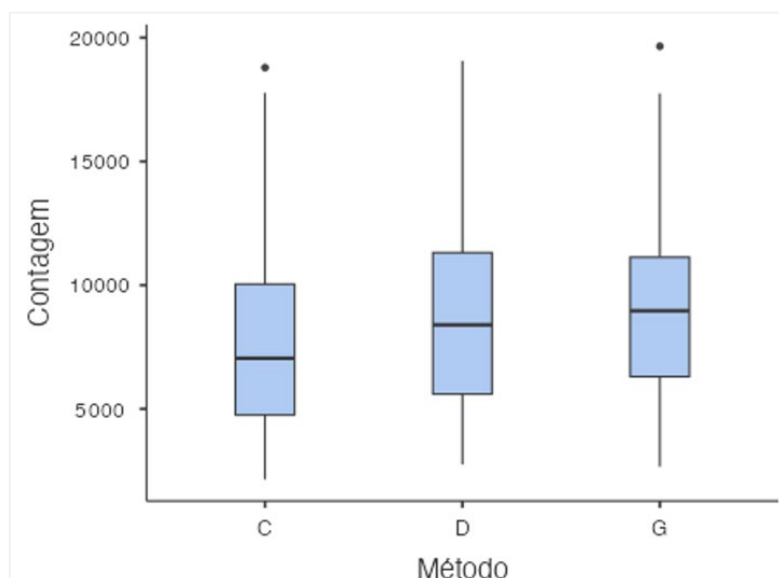


Gráfico 11 - Médias das áreas dos nervos nos três grupos após exclusão dos casos com matriz extracelular destruída

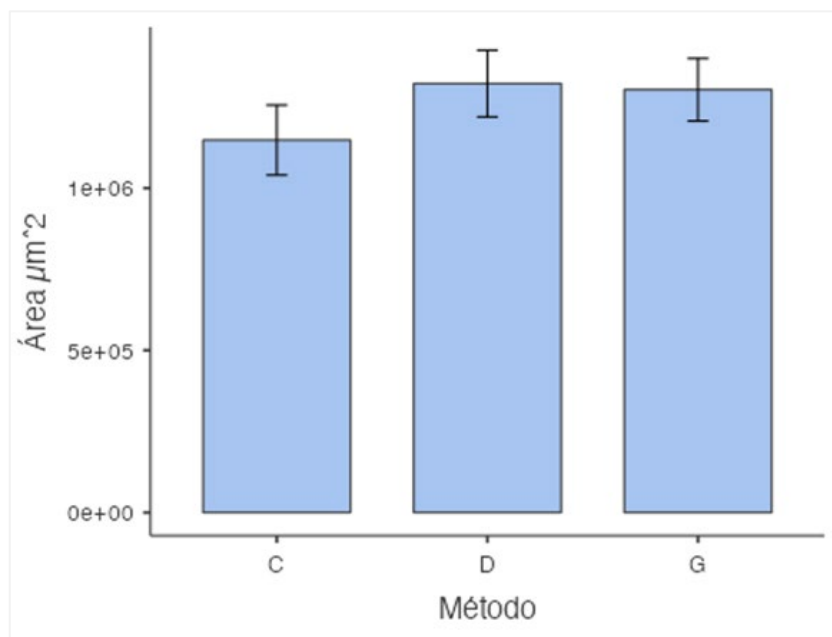
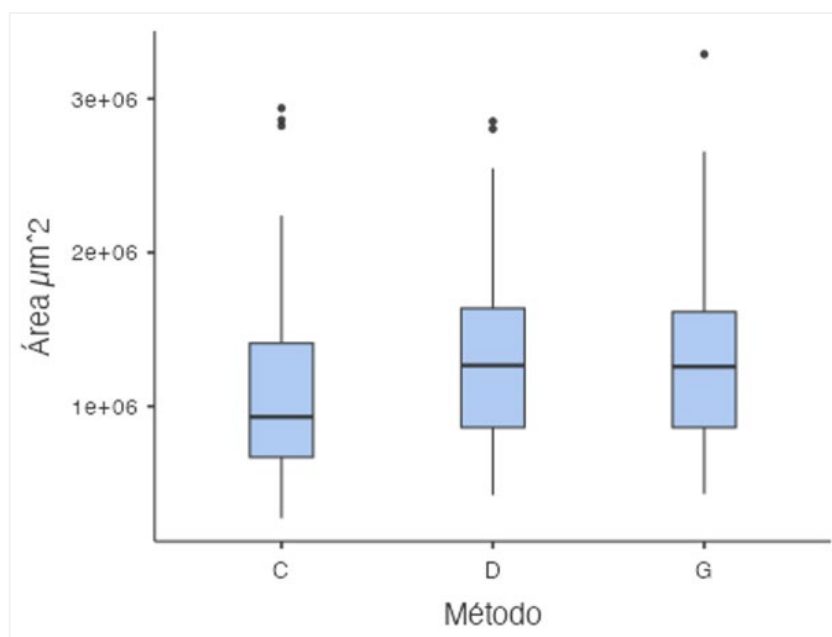


Gráfico 12 - Medianas das áreas dos nervos nos três grupos após exclusão dos casos com matriz extracelular destruída



Os dados também foram comparados em relação aos métodos C vs. D, vs. G para a comparação da densidade dos axônios e também foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis, pois pode-se observar na Tabela 19 que a distribuição não foi simétrica (teste de Shapiro-Wilk, $p < 0,05$). O teste de Kruskal-Wallis identificou diferença estatisticamente significativa entre os métodos, $p = 0,017$.

Os Gráfico 13 e 14 mostram os valores da densidade de axônios dos três métodos.

Gráfico 13 - Médias das densidades dos axônios nos três grupos após exclusão dos casos com matriz extracelular destruída

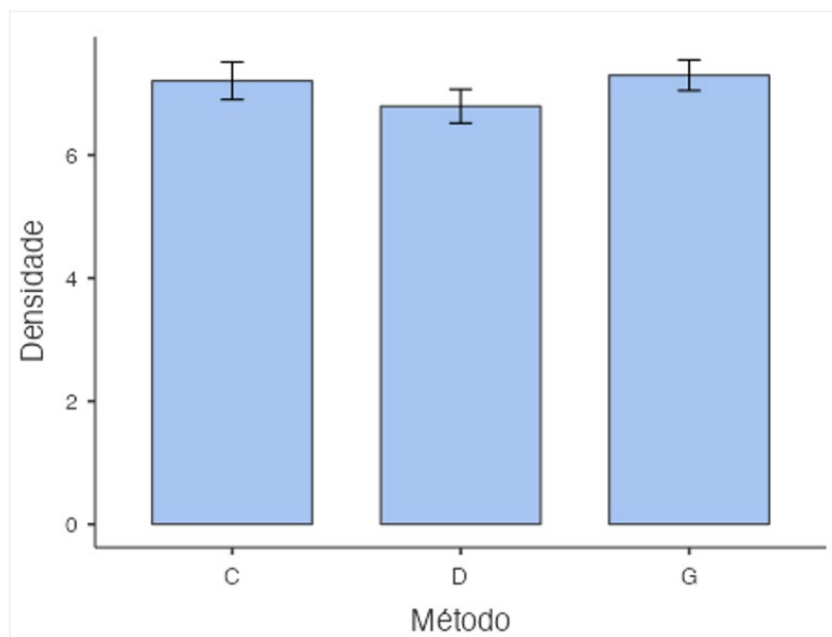
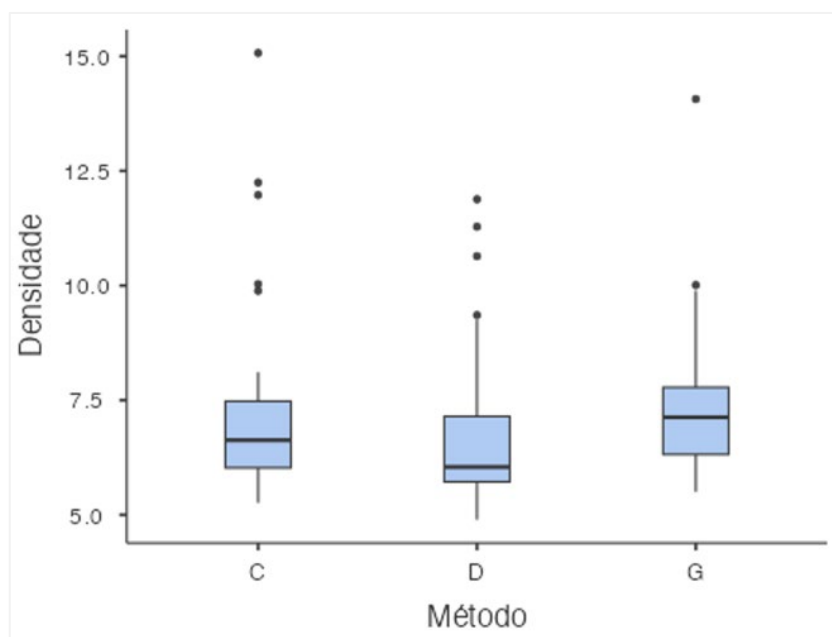


Gráfico 14 - Medianas das densidades dos axônios nos três grupos após exclusão dos casos com matriz extracelular destruída



Desta forma, é necessário fazer comparações entre pares dos métodos C vs. D, C vs. G e D vs. G. Foi utilizado o teste de comparações múltiplas de Dwass-Steel-Critchow-Fligner, e nas comparações entre pares, pode-se verificar que houve diferença estatisticamente significativa da densidade na comparação entre o método D vs. G, $p = 0,018$. (Tabela 20).

Tabela 20 - Comparações entre os pares de grupos em relação a densidade dos axônios após exclusão dos casos com matriz extracelular destruída

Comparações múltiplas - Densidade		w	p
C	D	-2,54	0,171
C	G	1,88	0,379
D	G	3,85	0,018

Os dados também foram comparados em relação aos métodos C vs. D, vs. G para a comparação da espessura da bainha de mielina e foi utilizado o teste de ANOVA de um fator, pois pode-se observar, na Tabela 19, que a distribuição foi simétrica (teste de Shapiro-Wilk, $p > 0,05$). O teste de ANOVA não identificou diferença estatisticamente significativa entre os métodos, $p = 0,069$.

Os Gráficos 15 e 16 mostram os valores da espessura da bainha de mielina em relação aos três métodos.

Gráfico 15 - Médias das espessuras da bainha de mielina nos três grupos após exclusão dos casos com matriz extracelular destruída

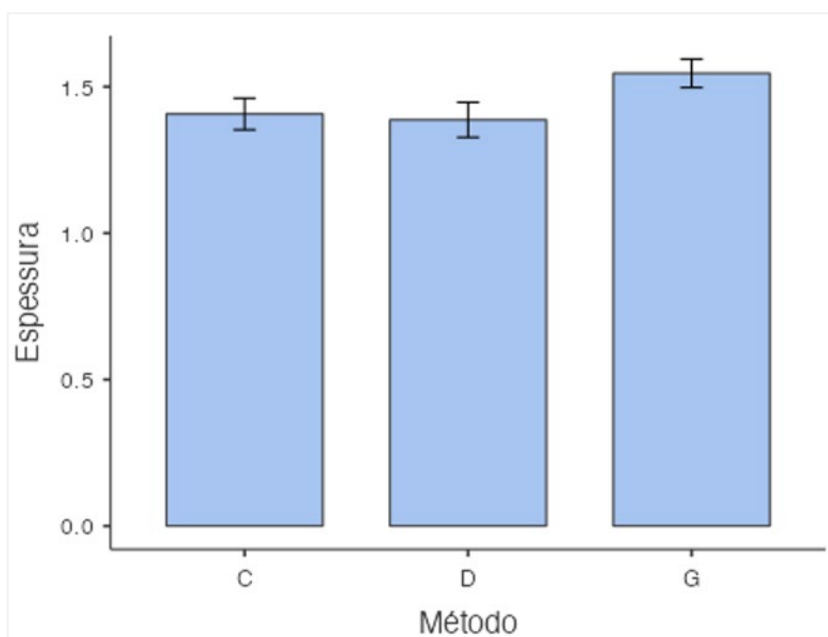
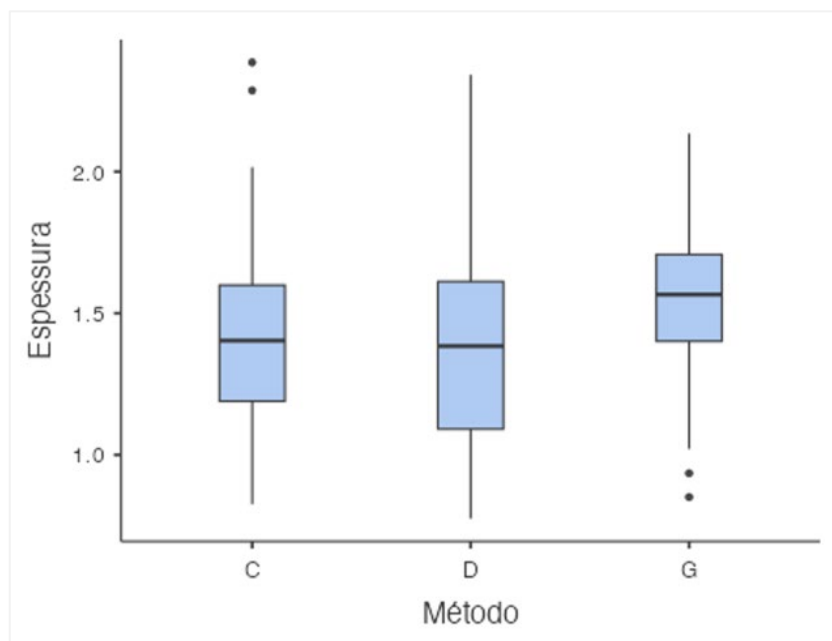


Gráfico 16 - Medianas das espessuras da bainha de mielina nos três grupos após exclusão dos casos com matriz extracelular destruída



A comparação entre os quatro tipos de nervos utilizados, após a exclusão dos que tiveram matriz extracelular destruída também foi realizada e a estatística descritiva está na Tabela 21.

Tabela 21 - Comparação geral entre os quatro tipos de nervos para os grupos C, D e G

	Nervos	Método	N	Média	IC 95%		DP	Mínimo	Máximo	Shapiro-Wilk		Percentis		
					Lim. Inferior	Superior				W	p	25th	50th	75th
Contagem	Radial	C	11	8395,55	5058,44	11732,65	4967,33	2153,00	18791,00	0,94	0,464	5590,50	7099,00	11187,50
		D	11	8974,91	6719,13	11230,69	3357,76	3778,00	14971,00	0,96	0,829	7167,00	7579,00	11312,50
		G	8	9452,75	6205,57	12699,93	3884,09	2886,00	15904,00	0,98	0,938	8278,50	9267,50	11171,25
	Musculocutâneo	C	10	6401,24	4775,08	8027,41	2273,22	3124,00	9660,45	0,94	0,511	4612,00	6968,00	7790,00
		D	9	5334,44	3497,39	7171,50	2389,92	2752,00	8913,00	0,90	0,228	3158,00	5422,00	6812,00
		G	9	9571,44	7531,61	11611,28	2653,72	6233,00	14867,00	0,90	0,280	8964,00	8964,00	11186,00
	Mediano	C	11	9169,55	6773,44	11565,65	3566,64	3983,00	16550,00	0,96	0,726	6798,00	7790,00	11109,50
		D	10	13230,80	10554,56	15907,04	3741,12	8650,00	19063,00	0,91	0,286	9846,00	13979,50	15531,00
		G	10	10969,00	7344,89	14593,11	5066,16	4907,00	19652,00	0,93	0,413	7153,50	9585,00	14292,00
Área μm^2	Ulnar	C	10	7174,70	3647,00	10702,40	4931,38	2555,00	17769,00	0,87	0,106	3395,25	5889,00	9306,00
		D	9	7274,11	4334,85	10213,38	3823,84	2763,00	15810,00	0,87	0,138	5699,00	6327,00	8396,00
		G	11	7498,09	5288,26	9707,92	3289,37	2666,00	14478,00	0,95	0,653	5546,50	6642,00	9238,00
	Radial	C	11	1229576,73	690572,92	1768580,53	802316,87	272936	2823754	0,92	0,341	697983,00	953652,00	1721351,00
		D	11	1419172,82	1006185,01	1832160,63	614739,79	623314	2225517	0,90	0,171	816823,50	1472448,00	1944391,50
		G	8	1236291,00	883958,10	1588623,90	421440,29	478285	1939491	0,95	0,700	1108243,50	1218236,50	1357726,25
	Musculocutâneo	C	10	905345,30	649179,14	1161511,46	358095,60	494985	1679550	0,91	0,274	617843,00	877731,50	1098854,75
		D	9	834169,56	583715,57	1084623,54	325828,54	422204	1266115	0,90	0,277	524204,00	905632,00	1141851,00
		G	9	1349359,44	994842,32	1703876,57	461209,65	759132	2143638	0,87	0,114	1257672,00	1257672,00	1368636,00
	Mediano	C	11	1340372,82	859713,44	1821032,20	715470,14	555368	2862420	0,89	0,160	836939,50	1126476,00	1687032,00
		D	10	1907271,60	1454956,04	2359587,16	632293,55	1266115	2852897	0,85	0,062	1409291,00	1635498,50	2456722,75
		G	10	1617814,90	1022532,46	2213097,34	832147,47	788295	3289604	0,89	0,172	935897,25	1462986,00	1867945,50
	Ulnar	C	10	1089151,30	494789,36	1683513,24	830860,71	387148	2938700	0,79	0,011	531384,00	868823,50	1096855,75
		D	9	1041672,22	761595,48	1321748,96	364366,31	467656	1628979	0,96	0,779	819269,00	1046363,00	1105677,00
		G	11	1028420,55	726558,63	1330282,46	449326,89	429782	1992325	0,91	0,233	786809,00	950177,00	1120565,00

continua

														conclusão
	Nervos	Método	N	Média	IC 95%		DP	Mínimo	Máximo	Shapiro-Wilk		Percentis		
					Lim. Inferior	Superior				W	p	25th	50th	75th
Densidade	Radial	C	11	7,21	5,98	8,45	1,84	5,86	12,25	0,72	<,001	6,12	6,65	7,60
		D	11	6,74	5,43	8,05	1,95	5,15	11,88	0,74	00001	5,62	5,91	7,09
		G	8	7,68	5,46	9,91	2,66	5,98	14,07	0,65	<0,001	6,27	6,94	7,36
	Musculocutâneo	C	10	7,21	6,09	8,34	1,58	5,26	10,03	0,85	0,061	6,34	6,92	7,39
		D	9	6,31	5,79	6,83	0,67	5,71	7,81	0,85	0,067	5,91	6,02	6,52
		G	9	7,26	6,65	7,88	0,80	5,74	8,57	0,89	0,217	7,13	7,13	7,43
	Mediano	C	11	7,49	5,72	9,25	2,62	5,70	15,07	0,61	<0,001	6,03	6,92	7,47
		D	10	7,22	5,81	8,64	1,97	5,00	11,28	0,89	0,190	5,94	6,83	8,25
		G	10	6,92	6,43	7,41	0,69	5,97	7,90	0,93	0,494	6,34	6,98	7,27
	Ulnar	C	10	6,88	5,52	8,24	1,90	5,61	11,97	0,65	<0,001	5,86	6,31	6,59
		D	9	6,86	5,34	8,38	1,98	4,89	10,64	0,83	0,045	5,73	5,91	8,08
		G	11	7,39	6,31	8,46	1,60	5,50	10,01	0,89	0,129	6,25	6,88	8,51
Espessura	Radial	C	11	1,46	1,16	1,76	0,44	0,86	2,39	0,96	0,716	1,14	1,35	1,70
		D	11	1,51	1,24	1,78	0,40	1,00	2,34	0,93	0,443	1,18	1,51	1,74
		G	8	1,61	1,35	1,87	0,31	1,17	2,13	0,92	0,392	1,48	1,66	1,72
	Musculocutâneo	C	10	1,30	1,12	1,48	0,25	0,91	1,73	0,91	0,283	1,19	1,39	1,41
		D	9	1,32	0,99	1,65	0,43	0,82	2,21	0,91	0,352	1,05	1,38	1,38
		G	9	1,55	1,45	1,65	0,13	1,38	1,86	0,82	0,036	1,51	1,57	1,57
	Mediano	C	11	1,48	1,19	1,77	0,43	0,83	2,29	0,94	0,562	1,34	1,41	1,63
		D	10	1,41	1,15	1,68	0,37	0,78	1,96	0,95	0,647	1,31	1,39	1,62
		G	10	1,50	1,25	1,74	0,34	0,85	2,10	0,97	0,886	1,32	1,57	1,60
	Ulnar	C	10	1,37	1,23	1,52	0,20	1,09	1,71	0,96	0,789	1,21	1,41	1,47
		D	9	1,28	1,05	1,50	0,29	0,87	1,83	0,96	0,782	1,09	1,20	1,44
		G	11	1,54	1,29	1,79	0,37	0,94	2,07	0,95	0,620	1,36	1,54	1,83

IC: intervalo de confiança; Lim.: limite; DP: desvio-padrão.

Nota. O IC da média assume que a distribuição amostral da média segue uma distribuição t com N-1 graus de liberdade.

Os Gráficos 17, 18, 19 e 20 demonstram as variáveis estudadas em função dos quatro nervos com matriz extracelular normal.

Gráfico 17 - Comparação dos quatro tipos de nervos em relação à contagem de axônios e os três grupos

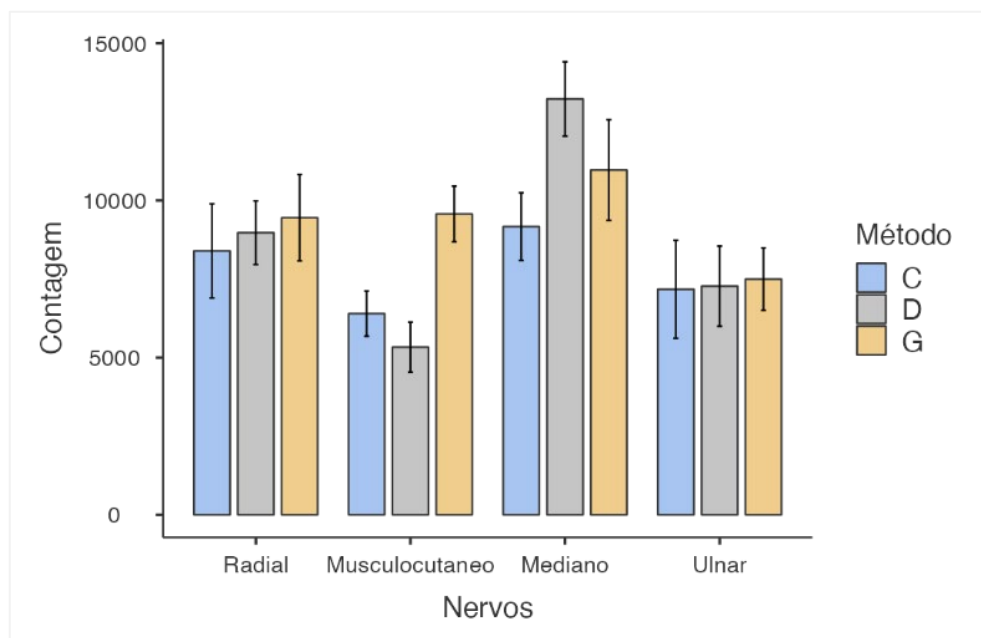


Gráfico 18 - Comparação dos quatro tipos de nervos em relação à área dos nervos e os três grupos

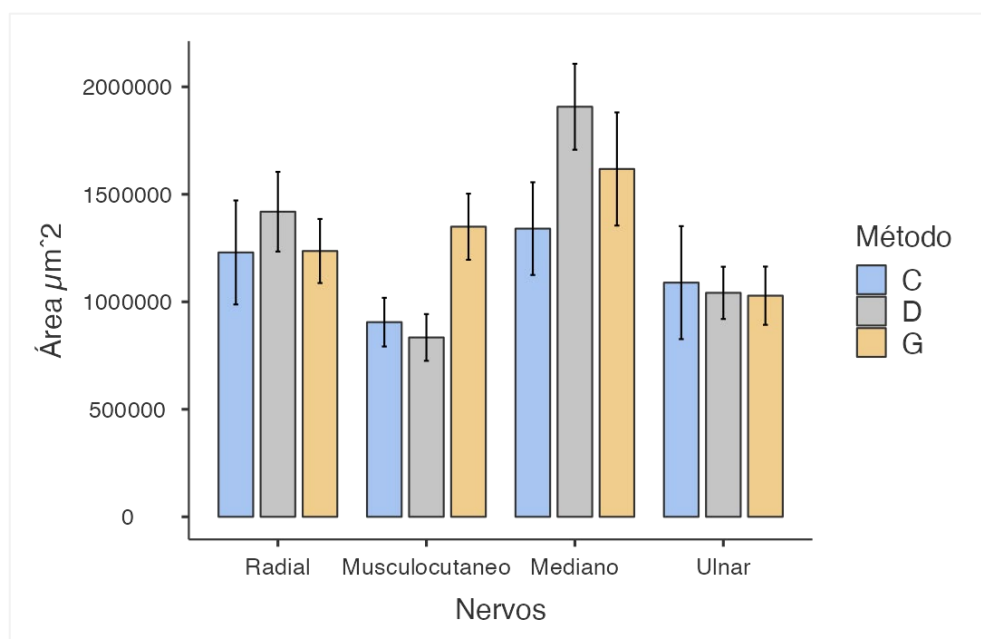


Gráfico 19 - Comparação dos quatro tipos de nervos em relação à densidade de axônios e os três grupos

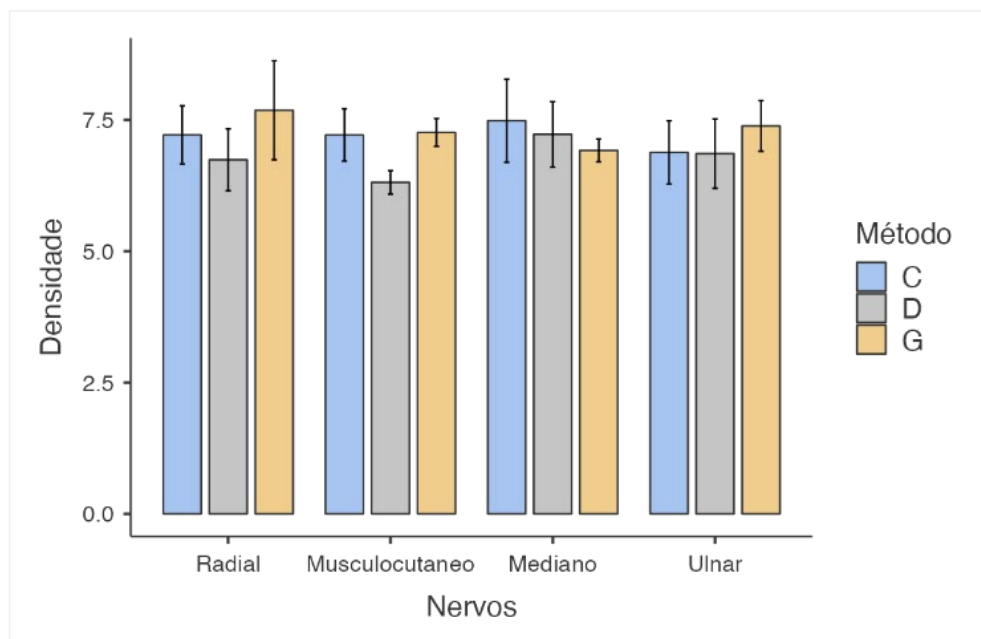
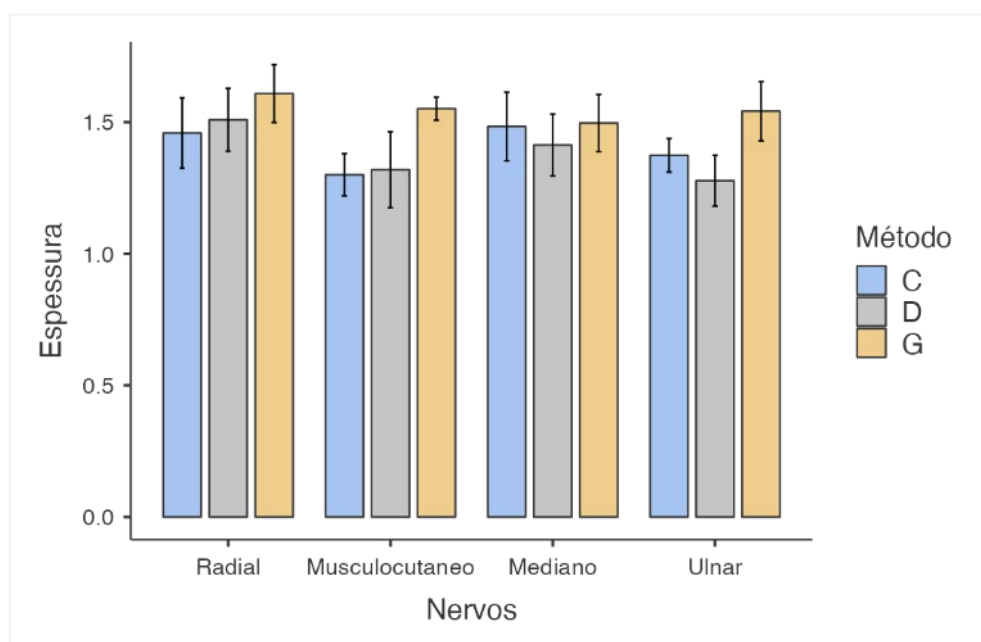


Gráfico 20 - Comparação dos quatro tipos de nervos em relação à espessura da bainha de mielina e os três grupos.



A estatística descritiva somente para o método C encontra-se na Tabela 22.

Tabela 22 - Estatística descritiva em relação aos tipos de nervo para o grupo C após exclusão dos casos com matriz extracelular destruída

	Nervos	N	Média	IC 95%		DP	Mínimo	Máximo	Shapiro-Wilk		Percentis		
				Lim. Inferior	Superior				W	p	25th	50th	75th
Contagem	Radial	11	8395,55	5058,44	11732,65	4967,33	2153,00	18791,00	0,94	0,464	5590,50	7099,00	11187,50
	Musculocutâneo	10	6401,24	4775,08	8027,41	2273,22	3124,00	9660,45	0,94	0,511	4612,00	6968,00	7790,00
	Mediano	11	9169,55	6773,44	11565,65	3566,64	3983,00	16550,00	0,96	0,726	6798,00	7790,00	11109,50
	Ulnar	10	7174,70	3647,00	10702,40	4931,38	2555,00	17769,00	0,87	0,106	3395,25	5889,00	9306,00
Área μm^2	Radial	11	1229576,73	690572,92	1768580,53	802316,87	272936	2823754	0,92	0,341	697983,00	953652,00	1721351,00
	Musculocutâneo	10	905345,30	649179,14	1161511,46	358095,60	494985	1679550	0,91	0,274	617843,00	877731,50	1098854,75
	Mediano	11	1340372,82	859713,44	1821032,20	715470,14	555368	2862420	0,89	0,160	836939,50	1126476,00	1687032,00
	Ulnar	10	1089151,30	494789,36	1683513,24	830860,71	387148	2938700	0,79	0,011	531384,00	868823,50	1096855,75
Densidade	Radial	11	7,21	5,98	8,45	1,84	5,86	12,25	0,72	<,001	6,12	6,65	7,60
	Musculocutâneo	10	7,21	6,09	8,34	1,58	5,26	10,03	0,85	0,061	6,34	6,92	7,39
	Mediano	11	7,49	5,72	9,25	2,62	5,70	15,07	0,61	<0,001	6,03	6,92	7,47
	Ulnar	10	6,88	5,52	8,24	1,90	5,61	11,97	0,65	<0,001	5,86	6,31	6,59
Espessura	Radial	11	1,46	1,16	1,76	0,44	0,86	2,39	0,96	0,716	1,14	1,35	1,70
	Musculocutâneo	10	1,30	1,12	1,48	0,25	0,91	1,73	0,91	0,283	1,19	1,39	1,41
	Mediano	11	1,48	1,19	1,77	0,43	0,83	2,29	0,94	0,562	1,34	1,41	1,63
	Ulnar	10	1,37	1,23	1,52	0,20	1,09	1,71	0,96	0,789	1,21	1,41	1,47

IC: intervalo de confiança; Lim.: limite; DP: desvio-padrão.

Nota. O IC da média assume que a distribuição amostral da média segue uma distribuição t com N-1 graus de liberdade.

No método C, não houve diferença entre os nervos para área, $p = 0,526$, densidade, $p = 0,649$, espessura, $p = 0,615$ e para contagem, $p = 0,222$ (Tabelas 23 e 24).

Tabela 23 - Cálculo de p para área e densidade de axônios para o grupo C após exclusão dos casos com matriz extracelular destruída

Kruskal-Wallis			
	χ^2	gl	p
Área μm^2	2,23	3	0,526
Densidade	1,64	3	0,649

Tabela 24 - Cálculo de p para espessura da bainha de mielina e para contagem de axônios para o grupo C após exclusão dos casos com matriz extracelular destruída

ANOVA a um fator (Welch)				
	F	gl1	gl2	p
Espessura	0,61	3	20,60	0,615
Contagem	1,59	3	20,20	0,222

A estatística descritiva somente para o método D encontra-se na Tabela 25.

Tabela 25 - Estatística descritiva em relação aos tipos de nervo para o grupo D após exclusão dos casos com matriz extracelular destruída

	Nervos	N	Média	IC 95%		DP	Mínimo	Máximo	Shapiro-Wilk		Percentis		
				Lim. Inferior	Superior				W	p	25th	50th	75th
Contagem	Radial	11	8974,91	6719,13	11230,69	3357,76	3778,00	14971,00	0,96	0,829	7167,00	7579,00	11312,50
	Musculocutâneo	9	5334,44	3497,39	7171,50	2389,92	2752,00	8913,00	0,90	0,228	3158,00	5422,00	6812,00
	Mediano	10	13230,80	10554,56	15907,04	3741,12	8650,00	19063,00	0,91	0,286	9846,00	13979,50	15531,00
	Ulnar	9	7274,11	4334,85	10213,38	3823,84	2763,00	15810,00	0,87	0,138	5699,00	6327,00	8396,00
Área μm^2	Radial	11	1419172,82	1006185,01	1832160,63	614739,79	623314	2225517	0,90	0,171	816823,50	1472448,00	1944391,50
	Musculocutâneo	9	834169,56	583715,57	1084623,54	325828,54	422204	1266115	0,90	0,277	524204,00	905632,00	1141851,00
	Mediano	10	1907271,60	1454956,04	2359587,16	632293,55	1266115	2852897	0,85	0,062	1409291,00	1635498,50	2456722,75
	Ulnar	9	1041672,22	761595,48	1321748,96	364366,31	467656	1628979	0,96	0,779	819269,00	1046363,00	1105677,00
Densidade	Radial	11	6,74	5,43	8,05	1,95	5,15	11,88	0,74	0,001	5,62	5,91	7,09
	Musculocutâneo	9	6,31	5,79	6,83	0,67	5,71	7,81	0,85	0,067	5,91	6,02	6,52
	Mediano	10	7,22	5,81	8,64	1,97	5,00	11,28	0,89	0,190	5,94	6,83	8,25
	Ulnar	9	6,86	5,34	8,38	1,98	4,89	10,64	0,83	0,045	5,73	5,91	8,08
Espessura	Radial	11	1,51	1,24	1,78	0,40	1,00	2,34	0,93	0,443	1,18	1,51	1,74
	Musculocutâneo	9	1,32	0,99	1,65	0,43	0,82	2,21	0,91	0,352	1,05	1,38	1,38
	Mediano	10	1,41	1,15	1,68	0,37	0,78	1,96	0,95	0,647	1,31	1,39	1,62
	Ulnar	9	1,28	1,05	1,50	0,29	0,87	1,83	0,96	0,782	1,09	1,20	1,44

IC: intervalo de confiança; Lim.: limite; DP: desvio-padrão.

Nota. O IC da média assume que a distribuição amostral da média segue uma distribuição t com N-1 graus de liberdade.

No método D, não houve diferença entre os nervos para densidade, $p = 0,784$ e espessura, $p=0,518$. Mas foi identificado uma diferença entre os nervos para contagem, $p < 0,001$ e área, $p = 0,001$ (Tabelas 26 e 27).

Tabela 26 - Cálculo de p para densidade de axônios para o grupo D após exclusão dos casos com matriz extracelular destruída

Kruskal-Wallis			
	χ^2	gl	p
Densidade	1,07	3	0,784

Tabela 27 - Cálculo de p para espessura da bainha de mielina, contagem de axônios e área para o grupo D após exclusão dos casos com matriz extracelular destruída

ANOVA a um fator (Welch)				
	F	gl1	gl2	p
Espessura	0,78	3	19,14	0,518
Contagem	9,97	3	19,04	<0,001
Área μm^2	7,93	3	19,26	0,001

Assim, a análise *post-hoc* identificou que para a contagem de axônios, a diferença está entre o nervo radial e o nervo mediano, $p = 0,033$; o nervo musculocutâneo e o nervo mediano, $p < 0,001$ e entre o nervo mediano e o nervo ulnar, $p = 0,003$ (Tabela 28).

Tabela 28 - Cálculo de p em relação à contagem de axônios entre os tipos de nervo para o grupo D após exclusão dos casos com matriz extracelular destruída

Teste <i>Post-Hoc</i> de Tukey - Contagem		Radial	Musculocutâneo	Mediano	Ulnar
Radial	Diferença média	-	3640,46	-4255,89	1700,80
	Valor de p	-	0,097	0,033	0,681
Musculocutâneo	Diferença média	-	-	-7896,36	-1939,67
	Valor de p	-	-	<0,001	0,622
Mediano	Diferença média	-	-	-	5956,69
	Valor de p	-	-	-	0,003
Ulnar	Diferença média	-	-	-	-
	Valor de p	-	-	-	-

A análise *post-hoc* identificou que para a área, a diferença está entre o nervo musculocutâneo e o nervo mediano, $p < 0,001$ e entre o nervo mediano e o nervo ulnar, $p = 0,004$. (Tabela 29).

Tabela 29 - Cálculo de p em relação à área entre os tipos de nervo para o grupo D após exclusão dos casos com matriz extracelular destruída

Teste <i>Post-Hoc</i> de Tukey – Área μm^2		Radial	Musculocutâneo	Mediano	Ulnar
Radial	Diferença média	-	585003,26	-488098,78	377500,60
	Valor de p	-	0,073	0,152	0,375
Musculocutâneo	Diferença média		-	-1073102,04	-207502,67
	Valor de p		-	<.001	0,828
Mediano	Diferença média			-	865599,38
	Valor de p			-	0,004
Ulnar	Diferença média				-
	Valor de p				-

A estatística descritiva somente para o método G encontra-se na Tabela 30.

Tabela 30 - Estatística descritiva em relação aos tipos de nervo para o grupo G após exclusão dos casos com matriz extracelular destruída

	Nervos	N	Média	IC 95%		DP	Mínimo	Máximo	Shapiro-Wilk		Percentis		
				Lim. Inferior	Superior				W	p	25th	50th	75th
Contagem	Radial	8	9452,75	6205,57	12699,93	3884,09	2886,00	15904,00	0,98	0,938	8278,50	9267,50	11171,25
	Musculocutâneo	9	9571,44	7531,61	11611,28	2653,72	6233,00	14867,00	0,90	0,280	8964,00	8964,00	11186,00
	Mediano	10	10969,00	7344,89	14593,11	5066,16	4907,00	19652,00	0,93	0,413	7153,50	9585,00	14292,00
	Ulnar	11	7498,09	5288,26	9707,92	3289,37	2666,00	14478,00	0,95	0,653	5546,50	6642,00	9238,00
Área μm^2	Radial	8	1236291,00	883958,10	1588623,90	421440,29	478285	1939491	0,95	0,700	1108243,50	1218236,50	1357726,25
	Musculocutâneo	9	1349359,44	994842,32	1703876,57	461209,65	759132	2143638	0,87	0,114	1257672,00	1257672,00	1368636,00
	Mediano	10	1617814,90	1022532,46	2213097,34	832147,47	788295	3289604	0,89	0,172	935897,25	1462986,00	1867945,50
	Ulnar	11	1028420,55	726558,63	1330282,46	449326,89	429782	1992325	0,91	0,233	786809,00	950177,00	1120565,00
Densidade	Radial	8	7,68	5,46	9,91	2,66	5,98	14,07	0,65	<0,001	6,27	6,94	7,36
	Musculocutâneo	9	7,26	6,65	7,88	0,80	5,74	8,57	0,89	0,217	7,13	7,13	7,43
	Mediano	10	6,92	6,43	7,41	0,69	5,97	7,90	0,93	0,494	6,34	6,98	7,27
	Ulnar	11	7,39	6,31	8,46	1,60	5,50	10,01	0,89	0,129	6,25	6,88	8,51
Espessura	Radial	8	1,61	1,35	1,87	0,31	1,17	2,13	0,92	0,392	1,48	1,66	1,72
	Musculocutâneo	9	1,55	1,45	1,65	0,13	1,38	1,86	0,82	0,036	1,51	1,57	1,57
	Mediano	10	1,50	1,25	1,74	0,34	0,85	2,10	0,97	0,886	1,32	1,57	1,60
	Ulnar	11	1,54	1,29	1,79	0,37	0,94	2,07	0,95	0,620	1,36	1,54	1,83

IC: intervalo de confiança; Lim.: limite; DP: desvio-padrão.

Nota. O IC da média assume que a distribuição amostral da média segue uma distribuição t com N-1 graus de liberdade.

No método G, não houve diferença entre os nervos para contagem, $p = 0,289$; área, $p = 0,193$; densidade, $p = 0,786$ e espessura, $p = 0,768$ (Tabela 31).

Tabela 31 - Cálculo de p para contagem de axônios, área, densidade de axônios e espessura da bainha de mielina para o grupo G após exclusão dos casos com matriz extracelular destruída

	Kruskal-Wallis		
	χ^2	gl	p
Contagem	3,76	3	0,289
Área μm^2	4,73	3	0,193
Densidade	1,06	3	0,786
Espessura	1,14	3	0,768

6 DISCUSSÃO

O tratamento de lesões de nervos tratadas na fase crônica e/ou quando há presença de falha segmentar entre os dois cotos ainda é um desafio mesmo para os mais experientes cirurgiões.

Na impossibilidade de execução das premissas estabelecidas por Millesi et al., (1981), que determina que a neurografia deve ser realizada em um leito viável, vascularizado, com pontos sem tensão, há algumas outras opções de tratamento.

O autoenxerto é o método mais utilizado, porém oferece riscos que já foram descritos, principalmente para a área doadora.

Existem algumas outras opções: o uso de conduítes de nervo se mostrou eficaz em estabelecer direcionamento para as fibras nervosas, porém não apresenta bons resultados para defeitos maiores; as transferências de nervo apresentam bons resultados funcionais, porém podem levar a denervação do músculo doador.

Mesmo com a evolução nas opções de tratamento nos últimos anos, nenhuma ainda se mostrou superior em oferecer melhor recuperação funcional, com menor risco.

Os aloenxertos de nervo são uma excelente alternativa frente a estes vieses das outras técnicas cirúrgicas, já que não oferecem riscos a área doadora ao mesmo tempo de oferecer maior compatibilidade de diâmetro e comprimento com a área receptora.

Além disso, quando comparados aos enxertos autógenos e aos conduítes para reparar lacunas nervosas de 5 mm a 70 mm, os aloenxertos se mostraram equivalentes aos autoenxertos na taxa de recuperação sensorial e motora e ambos foram superiores aos conduítes. Além disso, os aloenxertos apresentam custos comparáveis aos autoenxertos (Lans et al., 2023).

Para não provocar resposta imunológica indesejada, e assim reduzir capacidade de regeneração do nervo, os aloenxertos devem ser processados para que haja remoção adequada de todos debris celulares (Sondell; Lundborg; Kanje, 1998). A presença de debris celulares estimula resposta imunológica, inibe regeneração e causa um bloqueio oclusivo intraluminal (Hundepool et al., 2017).

Para que haja manutenção das propriedades que levam a regeneração axonal, a matriz extracelular deve ser preservada junto da lâmina basal. Os brotos neurais, em crescimento após a lesão, devem preencher a matriz extracelular em direção ao órgão-alvo durante o processo de regeneração, o que levará à recuperação funcional (Lutz et al., 2000).

Esse equilíbrio entre retirada adequada dos debris e manutenção da matriz extracelular pelos diversos métodos de processamento de nervos disponíveis produziria o aloenxerto de nervo ideal (Hundepool et al., 2017).

Nos EUA já é comercializado o aloenxerto de nervo Avance® cujo preparo acontece em várias etapas. O processamento do Avance® remove material celular imunogênico e componentes de proteoglicanos de sulfato de condroitina inibitórios do tecido neural, preservando a estrutura tridimensional do arcabouço da matriz extracelular. São descclularizados com detergentes baseados nos métodos de Hudson et al. (2004b) e submetidos à degradação enzimática com condroitinase. Os enxertos são então esterilizados com irradiação gama e armazenados a -80°C até o uso (Johnson et al., 2011). Sua aplicabilidade clínica demonstra bons resultados (Leckenby et al., 2020; Adidharma et al., 2024), porém ainda se discute a real indicação e para qual tamanho de lesão segmentar seu uso é mais apropriado (Isaacs; Drinane, 2024). Além disso, a utilização dos aloenxertos comercializados pode sofrer conflitos de interesse entre a indústria e os principais centro de pesquisa. Reese et al. (2025) identificaram 581 autores únicos em 185 estudos, revelando que a maioria dos pesquisadores mais influentes recebeu pagamentos significativos da indústria. Entre eles, 79% receberam pelo menos um pagamento. Uma correlação positiva foi encontrada entre centralização na rede de indicação e valores recebidos, sugerindo que maior influência acadêmica está associada a mais suporte financeiro.

No Brasil não é permitida a comercialização de aloenxerto processado de cadáveres, conforme se encontra na Constituição Federal (Brasil, 1988, art. 199, § 4º), reforçada pela Lei nº 9.434/1997 (Brasil, 1997), que determina que o transplante de órgãos, tecidos e partes do corpo humano só pode ocorrer sem fins lucrativos. Além disso, não se faz distinção quanto à origem dos tecidos, ou seja, a proibição à mercantilização se aplica igualmente aos produtos produzidos no Brasil e aos importados. Portanto, descrever uma forma eficaz, simples e barata, que pudesse atender até mesmo banco de tecidos traria grande benefício para pacientes com lesões de nervo graves, ao mesmo tempo que pouparia recursos financeiros em geral.

Diante deste cenário, vários métodos de preparação de nervos já são utilizados e estudados.

Nakamoto et al. (2021) compararam em ratos dois métodos mais populares - o resfriamento e o processamento com detergentes, como realizado por Moore et al. (2011), com a preservação do aloenxerto de nervo em glicerol. Em seu estudo, a preservação em glicerol permitiu resultados funcionais e uma taxa de regeneração nervosa com número de fibras similares ao autoenxerto e aos enxertos preservados em solução de detergentes e por resfriamento. Em relação à presença de debris celulares, o tratamento com glicerol foi similar ao tratamento com detergentes e significativamente melhor ao preservado por resfriamento.

A tendência favorável ao método glicerol em ratos objetivou este estudo. Marsh et al. (2024) destacam que a validação de terapias em modelos de roedores é essencial para avanços na pesquisa de lesão de nervos e regeneração axonal antes da aplicação em humanos. Assim, neste estudo, foram realizadas medidas histomorfométricas comparando os mesmos três tipos de processamento estudados por Nakamoto et al. (2021), só que desta vez em nervos provenientes de cadáveres humanos.

Na análise histológica optou-se pela contagem do número total de axônios, pela medida da espessura da bainha de mielina e pela densidade de axônios nos três grupos estudados seguindo autores como Hayashi et al. (2004), Salles et al. (2013) e Lovati et al. (2018).

Existem várias soluções que podem ser utilizadas para manter as propriedades químicas e biológicas para órgãos a serem transplantados como a solução Celsior®, a solução de Collins®, a solução de Wisconsin® e a solução de Custodiol®. Diversos estudos atestam a eficácia de seus componentes químicos na preservação de enxertos de nervos a frio (Carone et al., 2007; Moore et al., 2011). A comparação da solução Celsior® com as soluções de Collins® e de Wisconsin® demonstra a superioridade da primeira sobre as demais (Roberts et al., 1999; Mohara et al., 1999). E a comparação da solução Celsior® com solução de Custodiol® demonstra eficácia clínica semelhante (Ackemann et al., 2002; Lema Zuluaga et al., 2013). Porém, uma característica da solução Custodiol® é sua viscosidade muito baixa, o que leva a uma taxa de fluxo mais rápida, o que torna o resfriamento de órgãos mais eficaz. Outro incentivo para o uso da solução Custodiol® é a diferença de preço em comparação a outros conservantes, resultando em uma economia de custos (Ackemann et al., 2002; Lema Zuluaga et al., 2013).

Por isso, no grupo C, a solução de Custodiol® (solução de histidinatriptofano-cetoglutarato de Bretschneider) foi escolhida como conservante. É uma solução utilizada como meio de preservação de tecidos inervados como o miocárdio ou em procedimentos de retirada de múltiplos órgãos. Sua função é minimizar os danos celulares e isquemia ao induzir uma hipotermia controlada e preservar a integridade do órgão até que possa ser transplantado. Contém, além de outros ingredientes, uma quantidade particularmente grande de histidina, um forte tampão biológico, que neutraliza a acidose causada por metabólitos acumulados durante a isquemia. Isso aumenta a produção de energia anaeróbica e, portanto, estabiliza o conteúdo de fosfatos.

Existem várias temperaturas que podem ser utilizadas para conservação de nervo, incluindo a criopreservação. Hundepool et al., em 2017, avaliam que o congelamento neural danifica a ultraestrutura neural, não sendo adequada para preservação. Por isso, a temperatura de 4°C foi utilizada pois proporciona uma recuperação funcional semelhante ao autoenxerto na reconstrução de defeitos segmentares de nervo e também é superior à criopreservação (Bulstra et al., 2020).

O tempo de 14 dias foi escolhido como duração da conservação por resfriamento pois é o tempo necessário para o resultado de análises clínicas de exames do doador do enxerto. São necessários alguns testes sorológicos (HIV, Hepatites A, B e C, HTLV-1 e 2, Sífilis, Chagas, Toxoplasmose e Citomegalovírus, por exemplo) e testes microbiológicos (culturas para microrganismos) no doador do enxerto para que ocorra o transplante com segurança (Tírico, 2015). Além disso, em 2017, Mesquita compara a preservação do aloenxerto de nervo conservado a frio por 14 dias e por 50 dias, não mostrando diferença nos dois grupos.

Existem vários protocolos de preparo com detergentes para a descelularização (Topuz; Aydin, 2022), que ainda podem ser associados com adição de enzimas como nucleases (Shin; Park; Kim et al., 2019; Kang et al., 2021; Bae et al., 2021) e soluções hiper/hipotônicas (Kim et al., 2016; Nieto-Nicolau et al., 2021).

No grupo D foi utilizado o protocolo de Hudson et al. (2004b), que se mostra eficaz na preservação da matriz extracelular e garante taxas equivalentes de descelularização em comparação com técnicas previamente descritas de processamento (Hudson et al., 2004a). Szykaruk et al., em 2013, comparam os três métodos mais utilizados na preparação de aloenxertos acelulares de nervos – a frio, por congelação e detergentes. Em sua revisão, o protocolo de Hudson foi superior, com boas taxas de remoção de células, baixa geração de resposta imunológica e alta capacidade de regeneração em relação aos outros métodos. Além disso, o protocolo de Hudson também é uma das etapas dos métodos de preparação preconizado para o tratamento do aloenxerto comercializado nos EUA, Avance® (Johnson et al., 2011). Moore et al., em 2011, também comparam métodos de preservação de nervos e demonstra taxas de fibras axonais favoráveis ao protocolo de Hudson em relação à preservação a frio e ao uso de conduítes de nervo derivados de silicone.

No grupo G utilizou-se o glicerol. Sua utilização ocorre principalmente como método de preservação de pele para uso de enxertos no tratamento de queimaduras, sendo bastante utilizado em banco de tecidos (Granger, 1981; Friedmann, 1986; Hansbrough, 1992; Doughty; Aakre; Patel et al., 1996; Ghosh et al., 1997; Farrington et al., 2002).

O glicerol tem a vantagem de ser um método de preservação mais barato que as outras soluções estudadas, além de necessitar um menor tempo de preservação de 7 dias. (Wolff; Walter; Zimmer, 1993; Lemos et al., 2008).

Na análise buscou-se comparar os três métodos de processamento diante do número total de amostras de nervos e nas amostras que apresentavam a matriz extracelular íntegra.

Hundepool et al. (2017) comparam diferentes técnicas de processamento de aloenxertos em roedores e defende que o aloenxerto de nervo ideal é aquele que possui integridade da matriz

extracelular e é isento de células e de debris celulares, que podem induzir resposta imune e toxicidade. Por isso, este estudo procurou avaliar a taxa de retirada de debris celulares em todos nervos e a contagem de células somente nos nervos que possuíam a matriz extracelular íntegra, buscando alguma correlação nestes dois cenários.

Observou-se que o método C apresentou menor taxa de danos à matriz extracelular semelhante ao avaliado por Hundepool et al., em 2017. Porém não foi possível estabelecer significância estatística na comparação normal vs. destruído pois o n foi somente de dois casos (Tabela 13). A mesma comparação não mostrou diferença no grupo D (Tabela 14). No grupo G houve diferença entre nervos que apresentavam matriz normal ou destruída em relação à contagem de axônios ($p = 0,027$) e para a área ($p = 0,025$). Esta diferença na prática clínica deve ser interpretada com cautela, pois para que haja regeneração do nervo deve haver manutenção das propriedades da matriz extracelular. Além disso, nesta análise, devido ao n nos três grupos ser pequeno, a relevância estatística está sujeita a erro tipo 2.

Na comparação entre todas as amostras, em relação à contagem do número de axônios, houve diferença na comparação entre o grupo C e o grupo G, com o grupo C apresentando menor número de axônios ($p = 0,007$).

A comparação do grupo C com o grupo D apresentou valor de p bem próximo de 0,05. (Tabela 3).

Os valores máximos e mínimos e as sobreposições dos percentis e das medianas como se observa nos Gráficos 1 e 2 na comparação entre os três grupos não são muito discrepantes, o que sugere que os métodos são semelhantes, com tendência favorável ao grupo C.

O cálculo da área seccional do nervo foi utilizado somente para o cálculo da densidade axonal e a sua estatística pode não ter repercussão clínica quando interpretada de forma isolada.

Em relação à densidade axonal, o método C diferiu do método D ($p = 0,019$); e o método D diferiu do método G ($p < 0,001$) (Tabela 7), sendo o grupo D com menor mediana nas duas comparações. Novamente, a sobreposição de valores de percentis, sugere alguma semelhança entre os métodos (Gráficos 5 e 6).

Em relação à espessura da bainha de mielina, o método C diferiu do método G ($p = 0,011$) e o método D diferiu do método G ($p < 0,001$), sendo o grupo C e o grupo D os grupos com menores medianas para espessura (Tabela 9). Nesta análise, o grupo D apresentou valores de percentis, valores mínimos e valores máximos mais discrepantes, enquanto o grupo C apresentou valores mais concentrados (Gráfico 8).

Na análise da diferença entre os quatro tipos de nervo avaliados, houve diferença no grupo D em relação à contagem de axônios e à área, $p = 0,004$ e $p = 0,003$ respectivamente. O

nervo musculocutâneo apresentou menor número de axônios em relação ao nervo mediano com $p = 0,012$ (Tabela 10) e o nervo mediano apresentou maior secção em relação ao musculocutâneo com $p = 0,003$ e ao ulnar com $p=0,032$ (Tabela 11).

Para o grupo C e o grupo G, o tipo de nervo não interfere na apresentação das variáveis analisadas após o processamento, pois valor de $p > 0,05$. Ou seja, optando-se pelo processamento a frio ou por glicerol, a escolha do nervo não influencia o resultado histológico final. Para outras análises no grupo D, com exceção da contagem de axônios do nervo mediano e do nervo musculocutâneo, não deve haver diferença de qual nervo a ser utilizado. O valor de p para área seccional não vai interferir clinicamente pois estes valores só foram utilizados para o cálculo da densidade axonal.

Na análise após a exclusão dos nervos que tinham a matriz extracelular destruída, em relação à contagem de axônios, não houve diferença estatística entre os métodos ($p = 0,211$). Na interpretação gráfica avaliou-se uma sobreposição dos valores, sendo favorável ao grupo C, que apresentou menor contagem de axônios (Gráfico 10). Na comparação dos grupos em relação à densidade axonal houve significância em favor do grupo D em relação ao grupo G ($p = 0,018$) (Tabela 20 e Gráfico 14), da mesma forma encontrada na análise total dos nervos. E, por último, não houve diferença estatística na análise do valor da espessura da bainha de mielina ($p = 0,069$).

A análise que incluía o n total de nervos, com matriz normal e destruída, mostrou maior relevância estatística em favor dos grupos C e D. Essa mesma tendência se repetiu na análise após exclusão dos nervos com matriz destruída, porém sem as mesmas significâncias estatísticas.

Na comparação entre os quatro tipos de nervos que tinham matriz extracelular normal submetidos aos métodos de processamento, não houve diferença no grupo C (Tabelas 23 e 24), nem no grupo G (Tabela 31), ou seja, o tipo de nervo não deve influenciar no resultado final da técnica proposta. O método D apresentou diferença em relação à contagem de axônios em favor do nervo musculocutâneo, que apresentou menor mediana, principalmente em relação ao nervo mediano ($p < 0,001$) (Tabela 28 e Gráfico 17). Essa mesma tendência foi observada no grupo em que se compararam todos os nervos. Então, o tipo de nervo não deve interferir no resultado final se utilizada solução a frio ou preparação com glicerol, mas, se utilizado processamento com detergentes, há um favorecimento do nervo musculocutâneo.

O estudo em lesões segmentares de ratos que comparou os mesmos três métodos de processamento de nervos (Nakamoto et al., 2021) apresentou bons resultados em favor do glicerol. Estes resultados não foram reproduzidos no presente estudo.

Talvez, os aspectos morfológicos e histológicos dos nervos de humanos - que possuem maior diâmetro e diferentes propriedades estruturais em sua matriz - podem ter favorecido essa discrepância em relação aos ratos.

Propriedades imuno-histoquímicas - como receptores de membrana e canais iônicos - também são diferentes entre ratos e humanos e nestes podem ter levado a maior taxa de destruição da arquitetura celular quando se utilizado o tratamento com glicerol.

O glicerol do ponto de vista econômico, por ser um método barato, que pode ser utilizado em grande escala, já sendo utilizado no processamento em banco de tecidos de pele, seria uma excelente opção para a confecção de aloenxerto acelular de nervo, porém, neste estudo, não se mostrou tão eficaz.

Os métodos a frio e pelo protocolo com detergentes se mostraram semelhantes nas análises estatísticas de contagem de axônios, densidade axonal e espessura da bainha.

São duas opções interessantes, principalmente o processamento a frio, que já é um método bastante utilizado e estabelecido e que não requer tanto tempo de processamento. O tratamento dos enxertos de nervo com detergentes seguindo o protocolo do presente estudo também é factível, porém requer mais etapas de processamento e depende de outros tipos de soluções.

O fato de os nervos coletados para o estudo serem de cadáveres provenientes da SVOC-USP pode gerar um viés de seleção, uma vez que, não se sabe o tempo exato entre a hora morte e a coleta das amostras. As captações eram realizadas em um período determinado e não era possível escolher e medir com precisão o período entre hora do óbito, coleta e início do processamento dos nervos. O tempo médio entre a morte e a hora em que os cadáveres estavam disponíveis para dissecação foi de 8 horas. Eram cadáveres frescos, sem doença neurológica prévia e sem manipulação na via cirúrgica para ressecção dos nervos.

Após a coleta, as amostras já foram imediatamente colocadas nos respectivos frascos com as respectivas soluções, e encaminhadas para as análises de acordo com cada grupo.

Após o processamento dos nervos, principalmente no grupo G, houve dificuldade para fixação e preparo das lâminas, uma vez que a solução de glicerol tendia a deixar as amostras mais liquefeitas, dificultando o preparo e a avaliação microscópica. Isso explica o fato das amostras do grupo G apresentarem mais debris celulares e mais destruição da matriz extracelular.

A contagem de axônios de forma manual é considerada o padrão ouro, mas é um processo lento e trabalhoso, levando em conta que cada lâmina tem cerca de 2 mil a 20 mil axônios. Além disso, há dificuldade para o examinador decidir, em algumas ocasiões, se uma imagem é um

axônio, ou uma bainha de mielina incompleta, ou um axoplasma, ou um artefato, levando a uma discrepância na contagem total. Utilizou-se o programa AxoNet 1.0 para padronizar e facilitar as medidas, que já foram validadas para estudos de nervo (Ritch et al., 2020).

Os métodos histomorfométricos que avaliam a contagem e densidade de axônios e a espessura da bainha de mielina também são passíveis de crítica já que podem não expressar a real capacidade de regeneração nervosa. Um enxerto de nervo acelular quando transplantado pode gerar inúmeras possibilidades de caminho da fibra nervosa: os axônios podem seguir caminhos impróprios, podem ocorrer reinervação muscular aberrante, pode haver escape de fibras neurais, músculos antagonistas mais intensamente reinervados ou aferentes sensoriais que eventualmente alcançaram territórios inadequados, entre outras possibilidades.

Moore et al. (2011) compararam três modelos de aloenxertos nervosos acelulares (preservados a frio, processados com detergente - segundo protocolo de Hudson - e o Avance®) com autoenxertos de nervo e tubos de silicone em um defeito de 14 mm no nervo ciático de ratos. O processamento com detergente foi o método mais eficaz para preservar a estrutura do nervo e facilitar a regeneração neural.

Szynkaruk et al., em 2013, revisaram as evidências experimentais e clínicas sobre o uso de aloenxertos de nervo acelulares como alternativa aos autoenxertos para reparar lesões segmentares em nervos periféricos. Os enxertos tratados com detergente mostraram melhores resultados de regeneração do que os preservados a frio ou congelados, mantendo a matriz extracelular intacta. O processamento a frio reduziu a imunogenicidade, porém diminuiu menos a celularidade.

Lovati et al. (2018) revisaram 33 estudos entre 2007 e 2017 e analisaram diferentes protocolos de acelularização, incluindo métodos químicos e físicos, avaliando a regeneração neural e morfológica dos nervos. Os protocolos químicos (como uso de detergente segundo protocolo de Hudson) foram mais eficazes do que protocolos físicos (congelamento e descongelamento).

Estes estudos e revisões tendem a resultados favoráveis ao uso de detergente, porém, a maioria dos estudos foram experimentais realizados em ratos.

Este trabalho, semelhante a essas revisões comparativas (Moore et al., 2011; Szynkaruk et al. 2013; Lovati et al., 2018), demonstrou boa capacidade de ressecção de debris celulares com manutenção da integridade da matriz extracelular factível em dois métodos de processamento - por detergente, seguindo o protocolo de Hudson, e também por resfriamento. Além disso, demonstrou a superioridade destes métodos sobre o glicerol em análise de nervos em cadáveres, diferente de grandes estudos da literatura, que utilizavam roedores.

Apesar destes vieses, o presente estudo de forma inédita visou comparar em nível histomorfométrico três métodos de processamento de nervos em humanos, com o objetivo de criar alternativas para o tratamento de lesões neurológicas graves e diminuir efeitos adversos das formas atualmente preconizadas de tratamento. Possíveis perspectivas futuras seriam criar banco de aloenxertos acelulares de nervo utilizando as técnicas estudadas e iniciar estudos para o uso de aloenxertos *in vivo*.

7 CONCLUSÕES

A análise comparativa histomorfométrica de nervos de cadáveres submetidos ao processamento por resfriamento, *versus* detergentes, *versus* glicerol demonstrou: superioridade do resfriamento na contagem de axônios; do detergente na densidade axonal e de ambos na espessura da bainha de mielina. O glicerol apresentou tendência a piores resultados.

Não se observou diferença na preservação da matriz extracelular na comparação dos três métodos, exceto no grupo tratado com glicerol para contagem de axônios.

Na análise do tipo de nervo utilizado, o nervo mediano foi inferior na contagem de axônios no grupo processado com detergentes.

REFERÊNCIAS[†]

[†] De acordo com Estilo Vancouver.

- Ackemann J, Gross W, Mory M, Schaefer M, Gebhard MM. Celsior versus custodiol: early postischemic recovery after cardioplegia and ischemia at 5 degrees C. *Ann Thorac Surg.* 2002 Aug;74(2):522-9.
- Adidharma W, Wang Y, Kotsis SV, Wang L, Chung KC. Utilization Trends of Nerve Autograft Alternatives for the Reconstruction of Peripheral Nerve Defects. *Plast Reconstr Surg.* 2024 Apr 1;153(4):863-872.
- ain JR, Mackinnon SE, Hudson AR, Falk RE, Falk JA, Hunter DA. The peripheral nerve allograft: an assessment of regeneration across nerve allografts in rats immunosuppressed with cyclosporin A. *Plast Reconstr Surg.* 1988a Dec;82(6):1052-66.
- Atchabahian A, Mackinnon SE, Hunter DA. Cold preservation of nerve grafts decreases expression of ICAM-1 and class II MHC antigens. *J Reconstr Microsurg.* 1999 May;15(4):307-11.
- Bae JY, Park SY, Shin YH, Choi SW, Kim JK. Preparation of human decellularized peripheral nerve allograft using amphoteric detergent and nuclease. *Neural Regen Res.* 2021 Sep;16(9):1890-6.
- Bain JR, Mackinnon SE, Hudson AR, Falk RE, Falk JA, Hunter DA. The peripheral nerve allograft: a dose-response curve in the rat immunosuppressed with cyclosporin A. *Plast Reconstr Surg.* 1988b Sep;82(3):447-57.
- Bain JR. Peripheral nerve and neuromuscular allotransplantation: current status. *Microsurgery.* 2000;20(8):384-8.
- Brasil. Constituição (1988). Constituição da República Federativa do Brasil de 1988. Brasília, DF: Senado Federal, 1988. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/constituicao/constituicao.htm. Acesso em: 27 mar. 2025.
- Brasil. Lei nº 9.434, de 4 de fevereiro de 1997. Dispõe sobre a remoção de órgãos, tecidos e partes do corpo humano para fins de transplante e tratamento. *Diário Oficial da União: seção 1*, Brasília, DF, 5 fev. 1997. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/19434.htm. Acesso em: 27 mar. 2025.
- Brenner MJ, Moradzadeh A, Myckatyn TM, Tung TH, Mendez AB, Hunter DA, Mackinnon SE. Role of timing in assessment of nerve regeneration. *Microsurgery.* 2008; 28(4):265-72.
- Brown JM, Mackinnon SE. Nerve transfers in the forearm and hand. *Hand Clin.* 2008 Nov;24(4):319-40.
- Bulstra LF, Hundepool CA, Friedrich PF, Bishop AT, Hovius SER, Shin AY. Functional Outcome after Reconstruction of a Long Nerve Gap in Rabbits Using Optimized Decellularized Nerve Allografts. *Plast Reconstr Surg.* 2020 Jun;145(6):1442-50.
- Bunnell S, Boyes JH. Nerve grafts. *Am J Surg.* 1939;44(1):64-75.
- Campbell JB, Bassett AL, Boehler J. Frozen-irradiated homografts shielded with microfilter sheaths in peripheral nerve surgery. *J Trauma.* 1963 Jul;3:303-11.

- Carone AL, Scabora JE, Barros BR, Esquisatto MAM, Figueiredo JF, Langone F. Viability of nerve grafts preserved in different storage medium. *Braz J of Morphol Sci.* 2007;24(1):39-46.
- Chiono V, Tonda-Turo C, Ciardelli G. Chapter 9: Artificial scaffolds for peripheral nerve reconstruction. *Int Rev Neurobiol.* 2009;87:173-98.
- Daly W, Yao L, Zeugolis D, Windebank A, Pandit A. A biomaterials approach to peripheral nerve regeneration: bridging the peripheral nerve gap and enhancing functional recovery. *J R Soc Interface.* 2012 Feb 7;9(67):202-21.
- de Ruiter GC, Malessy MJ, Yaszemski MJ, Windebank AJ, Spinner RJ. Designing ideal conduits for peripheral nerve repair. *Neurosurg Focus.* 2009a Feb;26(2):E5.
- de Ruiter GC, Spinner RJ, Yaszemski MJ, Windebank AJ, Malessy MJ. Nerve tubes for peripheral nerve repair. *Neurosurg Clin N Am.* 2009b Jan;20(1):91-105, vii.
- Doughty MJ, Aakre BM, Patel S. Hydration (water binding) of the mammalian corneal stroma ex vivo and vitro: sample mass and error considerations. *Optom Vis Sci.* 1996 Oct;73(10):666-75.
- Dvali L, Mackinnon S. Nerve repair, grafting, and nerve transfers. *Clin Plast Surg.* 2003 Apr;30(2):203-21.
- Evans PJ, Mackinnon SE, Best TJ, Wade JA, Awerbuck DC, Makino AP, Hunter DA, Midha R. Regeneration across preserved peripheral nerve grafts. *Muscle Nerve.* 1995 Oct;18(10):1128-38.
- Evans PJ, Mackinnon SE, Levi AD, Wade JA, Hunter DA, Nakao Y, Midha R. Cold preserved nerve allografts: changes in basement membrane, viability, immunogenicity, and regeneration. *Muscle Nerve.* 1998 Nov;21(11):1507-22.
- Evans PJ, MacKinnon SE, Midha R, Wade JA, Hunter DA, Nakao Y, Hare GM. Regeneration across cold preserved peripheral nerve allografts. *Microsurgery.* 1999;19(3):115-27.
- Evans PJ, Midha R, Mackinnon SE. The peripheral nerve allograft: a comprehensive review of regeneration and neuroimmunology. *Prog Neurobiol.* 1994 Jun;43(3):187-233.
- Farrington M, Wreghitt T, Matthews I, Scarr D, Sutehall G, Hunt CJ, Santiago T, Gruys E, Voorhout W, Ramos T, Pegg DE. Processing of cardiac valve allografts: 2. Effects of antimicrobial treatment on sterility, structure and mechanical properties. *Cell Tissue Bank.* 2002;3(2):91-103.
- Faul F, Erdfelder E, Lang AG, Buchner A. G*Power 3: Um programa flexível de análise de poder estatístico para as ciências sociais, comportamentais e biomédicas. *Behav Research Methods.* 2007;39:175-91.
- Franco MJ, Nguyen DC, Phillips BZ, Mackinnon SE. Intraneural Median Nerve Anatomy and Implications for Treating Mixed Median Nerve Injury in the Hand. *Hand (N Y).* 2016 Dec;11(4):416-20.
- Friedmann PS. The skin as a permeability barrier. In: Thody AJ, Friedmann PS. *Scientific Basis of Dermatology.* New York: Churchill Livingstone; 1986.

- Ghosh MM, Boyce S, Layton C, Freedlander E, Mac Neil S. A comparison of methodologies for the preparation of human epidermal-dermal composites. *Ann Plast Surg.* 1997 Oct;39(4):390-404.
- Gordon L, Buncke H, Jewett DL, Muldowney B, Buncke G. Predegenerated nerve autografts as compared with fresh nerve autografts in freshly cut and precut motor nerve defects in the rat. *J Hand Surg Am.* 1979 Jan;4(1):42-7.
- Granger HJ. Physicochemical properties of the extracellular matrix. In: Hargens A.R. (Tissue Fluid Pressure and Composition. Baltimore: Williams Wilkins Waverly Press Inc.; 1981.
- Gulati AK, Cole GP. Immunogenicity and regenerative potential of acellular nerve allografts to repair peripheral nerve in rats and rabbits. *Acta Neurochir (Wien).* 1994;126(2-4):158-64.
- Gutmann E, Sanders FK. Recovery of fibre numbers and diameters in the regeneration of peripheral nerves. *J Physiol.* 1943 Mar 25;101(4):489-518.
- Hall S. The response to injury in the peripheral nervous system. *J Bone Joint Surg Br.* 2005 Oct;87(10):1309-19.
- Hansbrough JD. Wound coverage with biologic dressings and cultured skin substitutes. Austin: RG Lands Company; 1992.
- Hayashi A, Yanai A, Komuro Y, Nishida M, Inoue M, Seki T. Collateral sprouting occurs following end-to-side neurorrhaphy. *Plast Reconstr Surg.* 2004 Jul;114(1):129-37.
- Hiles RW. Freeze dried irradiated nerve homograft: a preliminary report. *Hand.* 1972;4(1):79-84.
- Hirasé Y, Kojima T, Uchida M, Takeishi M. Cryopreserved allogeneic vessel and nerve grafts: hind-limb replantation model in the rat. *J Reconstr Microsurg.* 1992 Nov;8(6):437-46.
- Hudson TW, Liu SY, Schmidt CE. Engineering an improved acellular nerve graft via optimized chemical processing. *Tissue Eng.* 2004b Sep-Oct;10(9-10):1346-58.
- Hudson TW, Zawko S, Deister C, Lundy S, Hu CY, Lee K, Schmidt CE. Optimized acellular nerve graft is immunologically tolerated and supports regeneration. *Tissue Eng.* 2004a Nov-Dec;10(11-12):1641-51.
- Hundepool CA, Nijhuis TH, Kotsougiani D, Friedrich PF, Bishop AT, Shin AY. Optimizing decellularization techniques to create a new nerve allograft: an in vitro study using rodent nerve segments. *Neurosurg Focus.* 2017 Mar;42(3):E4.
- Ijpma FF, Nicolai JP, Meek MF. Sural nerve donor-site morbidity: thirty-four years of follow-up. *Ann Plast Surg.* 2006;57(4):391-5.
- Isaacs JE, Drinane JJ. Nerve Allografts: Current Utility and Future Directions. *Hand Clin.* 2024 Aug;40(3):357-67.
- Jacoby W, Fahlbusch R, Mackert B, Braun B, Rolle J, Schnell J. Bridging of peripheral nerve defects with lyophilised and disantigenised homologous grafts. *Munch Med Wochenschr.* 1970 Mar 27;112(13):586-9.

- Jewett DLH, McCarroll R. Nerve regeneration and repair. Its clinical and experimental basis. St Louis: Mosby Company; 1980.
- Johnson PC, Duhamel RC, Meezan E, Brendel K. Preparation of cell-free extracellular matrix from human peripheral nerve. *Muscle Nerve*. 1982 Apr;5(4):335-44.
- Johnson PJ, Newton P, Hunter DA, Mackinnon SE. Nerve endoneurial microstructure facilitates uniform distribution of regenerative fibers: a post hoc comparison of midgraft nerve fiber densities. *J Reconstr Microsurg*. 2011 Feb;27(2):83-90.
- Kanaya F, Firrell J, Tsai TM, Breidenbach WC. Functional results of vascularized versus nonvascularized nerve grafting. *Plast Reconstr Surg*. 1992 May;89(5):92430.
- Kang HV, Im JH, Chung YG, Shin EY, Lee MK, Lee JY. Comparison of two different decellularization methods for processed nerve allograft. *Cell Tissue Bank*. 2021 Dec;22(4):575-85.
- Khoo TL, Halim AS, Saad AZ, Dorai AA. The application of glycerol-preserved skin allograft in the treatment of burn injuries: an analysis based on indications. *Burns*. 2010 Sep;36(6):897-904.
- Kim JK, Koh YD, Kim JO, Seo DH. Development of a decellularization method to produce nerve allografts using less invasive detergents and hyper/hypotonic solutions. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 2016 Dec;69(12):1690-6.
- Koshima I, Harii, K, Orabe K. Experimental studies on vascularized nerve grafts: Part II. Morphometric study of axonal regeneration. *Jpn J Plast Reconstr Surg*. 1983;3:303-12.
- Krekoski CA, Neubauer D, Zuo J, Muir D. Axonal regeneration into acellular nerve grafts is enhanced by degradation of chondroitin sulfate proteoglycan. *J Neurosci*. 2001 Aug 15;21(16):6206-13.
- Lans J, Eberlin KR, Evans PJ, Mercer D, Greenberg JA, Styron JF. A Systematic Review and Meta-Analysis of Nerve Gap Repair: Comparative Effectiveness of Allografts, Autografts, and Conduits. *Plast Reconstr Surg*. 2023 May 1;151(5):814e-827e.
- Leckenby JI, Furrer C, Haug L, Juon Personeni B, Vögelin E. A Retrospective Case Series Reporting the Outcomes of Avance Nerve Allografts in the Treatment of Peripheral Nerve Injuries. *Plast Reconstr Surg*. 2020 Feb;145(2):368e-381e.
- Lema Zuluaga GL, Serna Agudelo RE, Zuleta Tobón JJ. Preservation solutions for liver transplantation in adults: celsior versus custodiol: a systematic review and meta-analysis with an indirect comparison of randomized trials. *Transplant Proc*. 2013 Jan-Feb;45(1):25-32.
- Lemos SPS, Hayashi I, Cunha AS, Silva CS, Barros Filho TEP, Costa MP, Ferreira MC. Nervo alógeno conservado em glicerol. Estudo experimental em ratos. *Acta Ortop Bras*. 2008;16(3):133-7.
- Levi AD, Evans PJ, Mackinnon SE, Bunge RP. Cold storage of peripheral nerves: an in vitro assay of cell viability and function. *Glia*. 1994 Feb;10(2):121-31.

- Lovati AB, D'Arrigo D, Odella S, Tos P, Geuna S, Raimondo S. Nerve Repair Using Decellularized Nerve Grafts in Rat Models. A Review of the Literature. *Front Cell Neurosci*. 2018 Nov 19;12:427.
- Lundborg G, Rosén 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.
- Lutz BS, Chuang DC, Chuang SS, Hsu JC, Ma SF, Wei FC. Nerve transfer to the median nerve using parts of the ulnar and radial nerves in the rabbit--effects on motor recovery of the median nerve and donor nerve morbidity. *J Hand Surg Br*. 2000 Aug;25(4):329-35.
- Mackie D. Postal survey on the use of glycerol-preserved allografts in clinical practice. *Burns*. 2002 Oct;28 Suppl 1:S40-4.
- Mackinnon SE, Colbert SH. Nerve transfers in the hand and upper extremity surgery. *Tech Hand Up Extrem Surg*. 2008 Mar;12(1):20-33.
- Mackinnon SE, Doolabh VB, Novak CB, Trulock EP. Clinical outcome following nerve allograft transplantation. *Plast Reconstr Surg*. 2001 May;107(6):1419-29.
- Mackinnon SE, Hudson AR, Falk RE, Hunter DA. The nerve allograft response--an experimental model in the rat. *Ann Plast Surg*. 1985 Apr;14(4):334-9.
- Mackinnon SE, Novak CB. Nerve transfers. New options for reconstruction following nerve injury. *Hand Clin*. 1999 Nov;15(4):643-66.
- Marsh EB, Snyder-Warwick AK, Mackinnon SE, Wood MD. Interpretation of Data from Translational Rodent Nerve Injury and Repair Models. *Hand Clin*. 2024 Aug;40(3):429-40.
- Martins RS, Siqueira MG, da Silva CF, Plese JP. Correlation between parameters of electrophysiological, histomorphometric and sciatic functional index evaluations after rat sciatic nerve repair. *Arq Neuropsiquiatr*. 2006 Sep;64(3B):750-6.
- Mattar Júnior R, Azze RJ, Starck R, Paula E JL, Ferreira MC. Enxerto de nervo vascularizado - Estudo experimental em ratos. *Rev Bras Ortop*. 1992;27:806-10.
- Mattar Júnior R, Starck R, Guarnieri MV, Azze RJ, Mitteldorf CS, Ferreira MC. Utilização de enxerto de membrana basal de fibra muscular estriada para reparação de nervos periféricos: estudo experimental. *Rev Bras Ortop*. 1990;25(8):287-92.
- Mattar Júnior R. Reparação microcirúrgica de nervos periféricos- estudo comparativo entre sutura perineural e o adesivo de fibrina. [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 1989.
- McCullough CJ, Gagey O, Higginson DW, Sandin BM, Crow JC, Seville A. Axon regeneration and vascularisation of nerve grafts. An experimental study. *J Hand Surg Br*. 1984 Oct;9(3):323-7.
- Mesquita IV. Estudo experimental comparativo entre enxerto de nervo convencional e enxerto de nervo preservado a frio [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina; 2017.

- Midha R, Mackinnon SE, Evans PJ, Best TJ, Hare GM, Hunter DA, Falk-Wade JA. Comparison of regeneration across nerve allografts with temporary or continuous cyclosporin A immunosuppression. *J Neurosurg*. 1993 Jan;78(1):90-100.
- Millesi H, Meissl G. Consequences of tension at the suture site. In: Gorio A, Millesi H, Mingrino S, eds. *Post traumatic peripheral nerve regeneration* New York: Raven Press; 1981.
- Mohara J, Morishita Y, Takahashi T, Oshima K, Yamagishi T, Takeyoshi I, Matsumoto K. A comparative study of Celsior and University of Wisconsin solutions based on 12-hr preservation followed by transplantation in canine models. *J Heart Lung Transplant*. 1999 Dec;18(12):1202-10.
- Moore AM, MacEwan M, Santosa KB, Chenard KE, Ray WZ, Hunter DA, Mackinnon SE, Johnson PJ. Acellular nerve allografts in peripheral nerve regeneration: a comparative study. *Muscle Nerve*. 2011 Aug;44(2):221-34.
- Myckatyn TM, Mackinnon SE. A review of research endeavors to optimize peripheral nerve reconstruction. *Neurol Res*. 2004 Mar;26(2):124-38.
- Nakamoto JC, Wataya EY, Nakamoto HA, Santos GB, Ribaric I, Herrera AKA, Faria JCM. Evaluation of the Use of Nerve Allograft Preserved in Glycerol. *Plast Reconstr Surg Glob Open*. 2021 Apr 15;9(4):e3514.
- Nakamura T, Inada Y, Fukuda S, Yoshitani M, Nakada A, Itoi S, Kanemaru S, Endo K, Shimizu Y. Experimental study on the regeneration of peripheral nerve gaps through a polyglycolic acid-collagen (PGA-collagen) tube. *Brain Res*. 2004 Nov 19;1027(1-2):18-29.
- Nichols CM, Brenner MJ, Fox IK, Tung TH, Hunter DA, Rickman SR, Mackinnon SE. Effects of motor versus sensory nerve grafts on peripheral nerve regeneration. *Exp Neurol*. 2004 Dec;190(2):347-55.
- Nieto-Nicolau N, López-Chicón P, Fariñas O, Bolívar S, Udina E, Navarro X, Casaroli-Marano RP, Vilarrodona A. Effective decellularization of human nerve matrix for regenerative medicine with a novel protocol. *Cell Tissue Res*. 2021 Apr;384(1):167-77.
- Ozcan G, Shenaq S, Mirabi B, Spira M. Nerve regeneration in a bony bed: vascularized versus nonvascularized nerve grafts. *Plast Reconstr Surg*. 1993 Jun;91(7):1322-31.
- Palhares A, Viterbo F, Cardoso RG. Muscle graft as a substitute for peripheral nerve graft in rats. *Acta Cir Bras*. 2009;24(3):221-25.
- Porayko MK, Textor SC, Krom RA, Hay JE, Gores GJ, Richards TM, Crotty PH, Beaver SJ, Steers JL, Wiesner RH. Nephrotoxic effects of primary immunosuppression with FK-506 and cyclosporine regimens after liver transplantation. *Mayo Clin Proc*. 1994 Feb;69(2):105-11.
- Rappaport WD, Valente J, Hunter GC, Rance NE, Lick S, Lewis T. Clinical utilization and complications of sural nerve biopsy. *Am J Surg*. 1993; 166(3):252-6.
- Ray WZ, Kale SS, Kasukurthi R, Papp EM, Johnson PJ, Santosa KB, Yan Y, Hunter DA, Mackinnon SE, Tung TH. Effect of cold nerve allograft preservation on antigen presentation and rejection. *J Neurosurg*. 2011 Jan;114(1):256-62.

- Reese M, Mehta YA, Haupt MR, Dennis D, Becker M, Clark RC, Reid CM. Academic Influence and Industry Funding in Nerve Allograft Research: A Coauthorship Network Analysis. *Plast Reconstr Surg*. 2025 Mar 1;155(3):632e-641e.
- Restrepo Y, Merle M, Michon J, Folliguet B, Barrat E. Free vascularized nerve grafts: an experimental study in the rabbit. *Microsurgery*. 1985;6(2):78-84.
- Richters CD, Hoekstra MJ, van Baare J, du Pont JS, Kamperdijk EW. Immunogenicity of glycerol-preserved human cadaver skin in vitro. *J Burn Care Rehabil*. 1997 May-Jun;18(3):228-33.
- Ritch MD, Hannon BG, Read AT, Feola AJ, Cull GA, Reynaud J, Morrison JC, Burgoyne CF, Pardue MT, Ethier CR. AxoNet: A deep learning-based tool to count retinal ganglion cell axons. *Sci Rep*. 2020 May 15;10(1):8034.
- Roberts RF, Nishanian GP, Carey JN, Sakamaki Y, Starnes VA, Barr ML. A comparison of the new preservation solution Celsior to Euro-Collins and University of Wisconsin solutions in lung reperfusion injury. *Transplantation*. 1999 Jan 15;67(1):152-5.
- Salles GS Jr, Faria JC, Busnardo FF, Gemperli R, Ferreira MC. Evaluation of nerve regeneration in diabetic rats. *Acta Cir Bras*. 2013 Jul;28(7):509-17.
- Sanders FK, Young JZ. The influence of peripheral connexion on the diameter of regenerating nerve fibres. *J Exp Biol*. 1946 May;22:203-12.
- Schenck TL, Lin S, Stewart JK, Koban KC, Aichler M, Rezaeian F, Giunta RE. Sensory reanimation of the hand by transfer of the superficial branch of the radial nerve to the median and ulnar nerve. *Brain Behav*. 2016 Oct 9;6(12):e00578.
- Seckel BR, Ryan SE, Simons JE, Gagne RG, Watkins E Jr. Vascularized versus nonvascularized nerve grafts: an experimental structural comparison. *Plast Reconstr Surg*. 1986 Aug;78(2):211-20.
- Seddon HJ. *Surgical disorders of the peripheral nerves*. Baltimore: Williams and Wilkins; 1972.
- Shibata M, Tsai TM, Firrell J, Breidenbach WC. Experimental comparison of vascularized and nonvascularized nerve grafting. *J Hand Surg Am*. 1988 May;13(3):358-65.
- Shin YH, Park SY, Kim JK. Comparison of systematically combined detergent and nuclease-based decellularization methods for acellular nerve graft: An ex vivo characterization and in vivo evaluation. *J Tissue Eng Regen Med*. 2019 Jul;13(7):1241-52.
- Sondell M, Lundborg G, Kanje M. Regeneration of the rat sciatic nerve into allografts made acellular through chemical extraction. *Brain Res*. 1998 Jun 8;795(1-2):44-54.
- Staniforth P, Fisher TR. The effects of sural nerve excision in autogenous nerve grafting. *Hand*. 1978;10(2):187-90.
- Strasberg SR, Hertl MC, Mackinnon SE, Lee CK, Watanabe O, Tarasidis G, Hunter DA, Wong PY. Peripheral nerve allograft preservation improves regeneration and decreases systemic cyclosporin A requirements. *Exp Neurol*. 1996 Jun;139(2):306-16.

- Sunderland S. Nerve and nerve injuries. 2a ed. Newyork: Churchill Livinstone; 1978.
- Sunderland S. The intraneural topography of the radial, median and ulnar nerves. *Brain*. 1945 Dec;68:243-99.
- Szynkaruk M, Kemp SW, Wood MD, Gordon T, Borschel GH. Experimental and clinical evidence for use of decellularized nerve allografts in peripheral nerve gap reconstruction. *Tissue Eng Part B Rev*. 2013 Feb;19(1):83-96.
- Taylor GI, Ham FJ. The free vascularized nerve graft. A further experimental and clinical application of microvascular techniques. *Plast Reconstr Surg*. 1976 Apr;57(4):413-26.
- Terzis J, Faibisoff B, Williams B. The nerve gap: suture under tension vs. graft. *Plast Reconstr Surg*. 1975 Aug;56(2):166-70.
- Tírico LEP. Protocolo de captação, processamento e transplante de enxertos osteocondrais homólogos a fresco na articulação do joelho [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2015.
- Topuz B, Aydin HM. Preparation of decellularized optic nerve grafts. *Artif Organs*. 2022 Apr;46(4):618-32.
- Udina E, Gold BG, Navarro X. Comparison of continuous and discontinuous FK506 administration on autograft or allograft repair of sciatic nerve resection. *Muscle Nerve*. 2004 Jun;29(6):812-22.
- Waller A. Experiments on the section of the glossopharyngeal and hypoglossal nerves of the frog, and observations of the alterations produced thereby in the structure of their primitive fibres. *Philos Trans R Soc London*. 1850;140:423-9.
- Whitlock EL, Tuffaha SH, Luciano JP, Yan Y, Hunter DA, Magill CK, Moore AM, Tong AY, Mackinnon SE, Borschel GH. Processed allografts and type I collagen conduits for repair of peripheral nerve gaps. *Muscle Nerve*. 2009 Jun;39(6):787-99.
- Wolff KD, Walter G, Zimmer C. Nerve reconstruction with glycerol-preserved allogenic grafts in the rat. *Microsurgery*. 1993;14(5):315-22.
- Zalewski AA, Fahy GM, Azzam NA, Azzam RN. The fate of cryopreserved nerve isografts and allografts in normal and immunosuppressed rats. *J Comp Neurol*. 1993 May 1;331(1):134-47.
- Zidan SM, Eleowa SA. Banking and use of glycerol preserved full-thickness skin allograft harvested from body contouring procedures. *Burns*. 2014 Jun;40(4):641-7.
- Zumiotti AV. Enxerto longo de nervo com emprego de técnica microcirúrgica- trabalho experimental realizado em nervo fibular de coelho [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 1987.

ANEXOS

Anexo A - Diretriz para estudos anatômicos ACQUA



Anatomical Quality Assurance (AQUA) Checklist

"For improving the quality and reporting of anatomical studies."

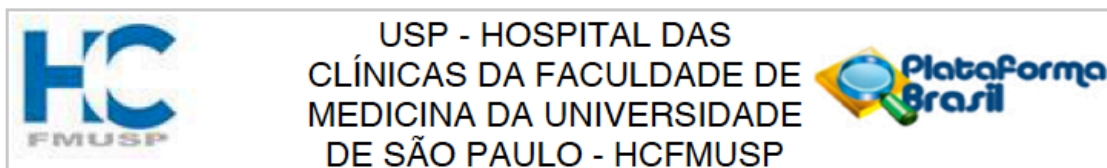
Checklist Component	#	Description and Recommendation:	Page Number*
Title			
Title	1	Identify the main objective or key characteristic of the study in the title.	
Abstract			
Structured Summary	2	Provide a clear and structured summary of the study with emphasis on the aims, methodology, key findings, and conclusions directly supported by study findings.	
Introduction			
Background / Rationale	3	Provide a rationale for the study including a concise, updated scientific background, appropriately referenced. Identify any relevant knowledge gaps to support the study rationale.	
Objective	4	Indicate clearly the main objective(s) of the study, and state any hypotheses to be tested.	
Methodology			
Study Design and Fundamentals	5	Provide precise details with respect to the design and fundamentals of the study, including but not limited to the following: 1. Study design: prospective, retrospective, cross-sectional, etc. 2. Study type: cadaveric (e.g. formalin fixed or fresh frozen), imaging, intraoperative, etc.	
Setting	6	Describe clearly the location where the study was conducted and dates (month/year) between which the data were collected.	
Sample Size	7	When appropriate, statistical power analysis should be used to calculate sample size or effect size. If relevant, justification for the study sample size should be briefly stated.	
Subjects	8	Define clearly the eligibility criteria and methods of subject selection and inclusion, with details of the baseline and demographic selection criteria of the subjects (age, sex, healthy or diseased etc.) included in the study.	
Reference Standard	9	Define clearly and accurately all anatomical definitions (normal anatomy, variations, classifications, etc.) by which data will be collected, analyzed, and compared. Citations should be included when appropriate.	
Outcomes and/or Parameters	10	Define clearly the outcomes and parameters (e.g. prevalence of a variation, mean length and diameter of a structure, etc.) assessed in the study. When present, confounders should be clearly stated.	
Measurement and Assessment	11	Indicate clearly the group of subjects included in each measurement/assessment (source of data). Provide clear details about the methods of measurement/assessment of each outcome and/or parameter (e.g. reference points for length measurements, internal or external diameter, etc.).	
Modality	12	Describe clearly the materials, equipment, and instruments used (with manufacturer/supplier details) to conduct the specific study design.	
Technique	13	Describe precisely the methods (e.g. dissection technique, image reconstruction, etc.) applied in the study to allow for reproducibility. Relevant details (profession, years of experience) regarding the individual(s) performing the technical aspect of the study are recommended.	
Bias	14	Identify any potential source of bias and, when present, describe measures implemented to assess the risk of bias.	
Statistical Approach	15	Describe all statistical methods for analyzing the data, including those of confounders. Statistical methods for additional analyses (e.g. subgroup/sensitivity analyses), when performed, should be described.	
Ethics	16	Provide the details of compliance with ethical guidelines, including the name of the review board or agency, approval number, and date. AQUA endorses the Helsinki Declaration and its later amendments. When appropriate, details of written, informed consent should be clearly stated.	
Results			
Subjects	17	Report the numbers of subjects included in the study, including data on their baseline and demographic characteristics. When needed, provide reason(s) and data on characteristics of the subjects excluded from the study at any stage.	
Main Results	18	Provide unaltered/non-manipulated summary data (number [percentage]) or estimates (with confidence intervals and values of consistency when applicable) from the analyses performed. Tabular presentation of the results is highly recommended.	
Descriptive Anatomy	19	Present clear and comprehensible figures (i.e. images, illustrations, diagrams, etc.), labeled as appropriate, to explain the results where needed AND describe clearly any anatomical findings that could be ambiguous, questionable, or atypical. New classifications of anatomical variations should be complemented by representative figures and corresponding dissection/imaging photographs.	
Confounders	20	Present precise data from assessment/measurement of confounders, if any.	
Additional analyses	21	Provide clear results of additional analyses (e.g. subgroup/sensitivity analyses), if performed. Tabular presentation of the results is highly recommended.	
Discussion			
Key Findings	22	Include summary of key evidence/findings from the study pertaining to the rationale/objectives of the study. No new study results should be presented in the discussion.	
Interpretation and Comparison(s)	23	Provide comprehensive (but judicious) interpretation of the results from the study, and comparison and/or reference to the results from other studies on the topic, appropriately cited. Meaningful clinical impact/significance of the findings from the study should be discussed where relevant.	
Implication(s)	24	State briefly the implications of the findings or potential areas of the study that require further research.	
Limitation(s)	25	Discuss briefly limitations of the study at any stage, including risk of bias, potential confounders, or intraobserver and/or interobserver variability.	
Conclusions			
Summary	26	Summarize the key information (i.e. "take-home message") directly supported by the findings/evidence from the study.	
Other Information			
Acknowledgement	27	Acknowledge individual(s), institution(s), or third parties who significantly contributed to the study.	
Conflict of interest	28	Disclose any conflicts of interests related to the study for all contributing authors.	
Funding	29	Describe sources of funding for the study and any other support.	

* If an item is not applicable to the study, mark N/A in the page number box.

© International Evidence-Based Anatomy Working Group, Krakow, Poland

Tomaszewski KA, Henry BM, Ramakrishnan PK, et al. Development of the Anatomical Quality Assurance (AQUA) Checklist: Guidelines for Reporting Original Anatomical Studies. Clin Anat. 2016; 30: 14–20. doi:10.1002/ca.22899

Page 2 of 2

Anexo B - Comitê de Ética e Pesquisa, com número do parecer: 4.514.331**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: Comparação de métodos de processamento de aloenxertos de nervo acelulares em humano

Pesquisador: Marcelo Rosa de Rezende

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 41040720.1.0000.0068

Instituição Proponente: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.514.331

Apresentação do Projeto:

Lesões de nervos periféricos são lesões comuns, que podem levar a importante grau de sequelas motoras e sensitivas, gerando elevado índice de incapacidades. Após uma lesão de nervo, o tratamento ideal, se possível, é estabelecer uma neurografia primária e sem tensão, sobre um leito vascularizado e viável (De Ruiter et al. 2009). Na impossibilidade de uma sutura primária, como ocorre em casos de lesões complexas, com distância

entre os cotos, ou quando há perda segmentar, existem algumas alternativas, como: uso de autoenxertos, uso de conduítes neurais, neurotizações e, mais recentemente, o uso de aloenxertos. Atualmente o uso de autoenxertos é o tratamento mais comumente usado (Lemos et al., 2008) e o padrão ouro para reconstrução de um nervo lesionado com distância entre os cotos (Hall S, 2005). Esta técnica se baseia na ressecção de um segmento de nervo do próprio indivíduo e posterior interposição deste no espaço entre os cotos do nervo lesionado, de forma que não haja tensão na sutura (Tersis J et al., 1975). Porém não está isenta de riscos, principalmente para a área doadora, como denervação, formação de neuroma, dor crônica e infecção, por exemplo (Staniforth e Fisher, 1978; Rappaport et al., 1993; Lemos et al., 2008). Os sítios doadores mais comuns são o nervo sural, o nervo cutâneo medial do antebraço, o nervo cutâneo antero lateral do antebraço, entre outros (Jewett e McCarroll, 1980). Porém, além dos riscos para área doadora, o calibre dos enxertos pode ser discrepante em relação ao diâmetro e ao comprimento do nervo receptor

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar

Bairro: Cerqueira Cesar

CEP: 05.403-010

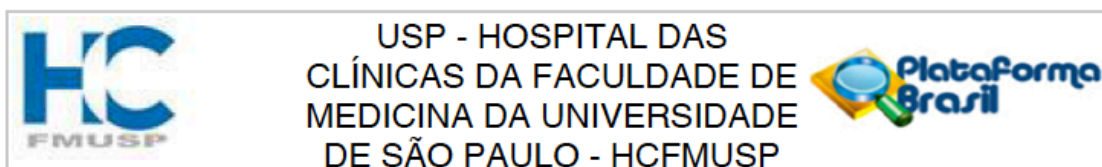
UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)2661-7585

Fax: (11)2661-7585

E-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br

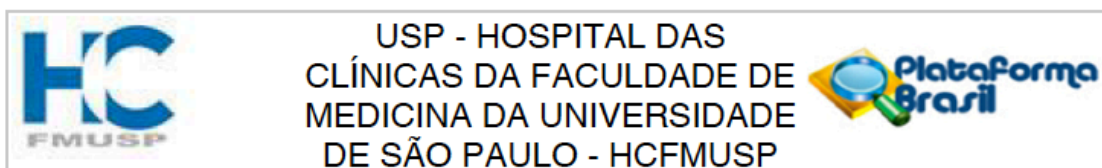


Continuação do Parecer: 4.514.331

(Palhares et al., 2009), sendo necessário abordagem de mais de um sítio doador, aumentando a morbidade; ou ainda, a realização de um número de suturas fasciculares maior, o que aumenta o processo inflamatório local (IJPma et al., 2006). Além disso, autoenxertos sensitivos não são ideais para reconstrução de nervos puramente motores (Hall S, 2005; Nichols CM, 2004). O uso de enxertos autólogos vascularizados também seria uma opção,

com taxas de regeneração nervosa superior ao não vascularizado em ratos (Mattar Júnior R et al., 1992); porém apresentam os mesmos riscos descritos para o autoenxerto não vascularizado. Diante destas limitações para o uso de enxerto autólogo, houve necessidade de encontrar novas opções de tratamento. Para defeitos pequenos, em geral até 4 centímetros, uma possibilidade terapêutica é o uso de conduítes neurais sintéticos ou enxerto venoso. Os conduítes sintéticos possuem o formato de tubo e são derivados geralmente de silicone e polissacarídeos, biodegradáveis ou não, e, assim como o neuro tubo de enxerto venoso, podem servir de guia para a regeneração axonal (De Ruiter et al., 2009), criando um microambiente para o crescimento dos axônios, o que pode gerar bons resultados funcionais (Chiono et al., 2009; Lundborg G et al., 1997). Porém, os conduítes não possuem conteúdo estrutural e arquitetura celular, o que limita sua utilização para defeitos maiores, além de levar a uma recuperação funcional limitada em relação ao uso de autoenxertos (Daly W. et al., 2011; De Ruiter et al. 2009). Uma outra alternativa, que apresenta bons resultados funcionais, é o uso de transferências de nervo, ou neurotizações (Brown JM et al., 2008; Mackinnon SE et al., 2008); que consiste em neurotomia de um nervo doador e transferência deste para o nervo receptor lesionado, a fim de recuperar função. Porém, existem alguns pré requisitos para neurotizações motoras, como a necessidade de ser um nervo doador que não traga prejuízo funcional, necessidade de sinergismo entre o nervo doador e receptor, proximidade do músculo alvo e deve haver grande quantidade de neurônios motores puros (Dvali L et al., 2003). Além disso, como ocorre no uso de autoenxertos, durante uma neurotização pode haver risco de denervação do músculo doador, além de indisponibilidade de um nervo doador compatível; o que torna esta técnica também limitada. Assim, diante destas limitações das opções terapêuticas descritas para casos de lesões segmentares de nervos ou para incapacidade de neurografia primária, o uso de aloenxertos se torna uma opção. Os aloenxertos são nervos provenientes de cadáveres, e ainda há poucos dados na literatura para seu uso em reconstruções neurais, ou lesões segmentares em humanos. Pontos favoráveis ao uso de aloenxertos de nervo são: ausência de limitação quanto à disponibilidade e à quantidade de enxerto, ausência de morbidade na área doadora, possibilidade de melhor adequação de comprimento e diâmetro com o nervo receptor, e possibilidade de uso de enxerto puramente

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappelq.adm@hc.fm.usp.br



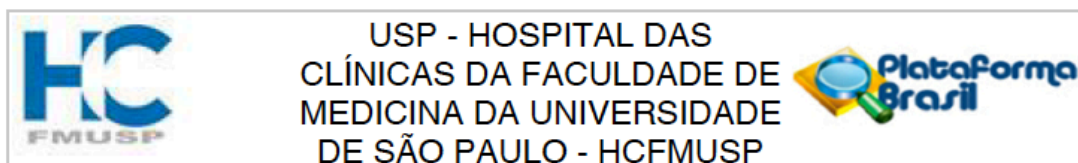
Continuação do Parecer: 4.514.331

motor, sensitivo, ou misto. Além disso, os enxertos alógenos apresentam microestrutura ecélulas de Schwann que permitem potencial de regeneração semelhante aos enxertos autógenos (Bain JR et al., 1988; Strasberg SR et al., 1996; Midha R et al., 1993; Brenner MJ et al., 2008; Mackinnon SE et al., 2001). Uma possível desvantagem é o risco de imunogenicidade para o hospedeiro, o que pode aumentar o risco de toxicidade, infecção e necrose (Poraiko MK et al., 1994; Mackinnon SE et al., 1999 e 2001; Udina E et al., 2004). Para diminuir este efeito indesejado, os aloenxertos devem ser processados afim de preservar a matriz e arquitetura celular íntegra, visando manter sua função na regeneração neural (Gulati AK et al., 1994); ao mesmo tempo em que deve ser isenta de debris celulares, o que provocaria aumento do risco de infecção, de toxicidade, e de imunogenicidade. Deve-se então encontrar um equilíbrio entre a remoção dos restos

celulares e manutenção das propriedades estruturais (Hudson TW et al., 2004; Sondell M et al., 1998; Strasberg SR et al., 1996). Existem muitas técnicas de preparo do aloenxerto acelular, incluindo liofilização, preservação a frio, uso de detergentes, uso de radiação, entre outras, buscando este equilíbrio (Myckatyn TM et al., 2004; Hiles RW, 1972; Johnson PC et al., 1982; Sondell M et al., 1998). Porém, há pouco consenso acerca de qual técnica de preservação aloenxerto, em humanos, melhor preserva a arquitetura celular, possibilitando uma máxima recuperação funcional (Szykaruk et al., 2013). A preservação a frio é um método já estudado em ratos (Atchabahan et al., 1999), com eficácia na preservação da lâmina basal e da matriz extracelular, além de levar a diminuição da antigenicidade. Este método também se mostrou equivalente ao uso de autoenxertos convencionais em relação aos resultados funcionais, eletrofisiológicos e histológicos na taxa de regeneração nervosa em ratos (Mesquita IV, 2017). Porém, para que ocorra uma atenuação do efeito antigênico, é necessário um maior tempo de preservação (Ray WZ et al., 2011), tornando o processamento mais demorado, o que pode ser uma limitação para uso deste método (Atchabahan et al., 1999). O processamento com detergentes

é um outro método descrito, que visa melhor preservação da arquitetura celular, e que impediria os possíveis efeitos destrutivos causados pelo congelamento na regeneração axonal (Evans PJ et al., 1998, 1999). Há uma série de protocolos descritos. Hudson et al. (2004) demonstrou que os aloenxertos expostos repetitivamente a soluções de água destilada, sulfobetaine-10, e Triton X-200/sulfobetaine-16 pelo período de 4 dias apresentaram uma preservação superior da matriz extra celular e níveis de descelularização semelhantes aos processos químicos anteriormente utilizados. Além disso este método se mostrou mais eficaz na obtenção de maior densidade axonal em ratos em relação à preservação a frio, o que pode levar a um maior potencial de regeneração (Evans PJ et al., 1995, 1998; Hudson TW et al., 2004). Um outro método de

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappelq.adm@hc.fm.usp.br



Continuação do Parecer: 4.514.331

processamento é através de soluções de glicerol, bastante usado na preservação de aloenxertos de pele. Esta substância é capaz de desidratar o tecido, sem alterar as concentrações iônicas celulares, ao mesmo tempo que mantém a arquitetura celular com baixa taxa de antigenicidade (Zidan SM et al., 2014; Khoo TL et al., 2010; Richters CD et al., 1997; Mackie DP, 2002). Já foi descrita a utilização do glicerol como método de preservação de aloenxertos de nervo femoral em ratos, com bons resultados em relação aos aspectos imunohistoquímicos a longo prazo (Wolff KD et al., 1993). Souza Lemos et al. (2008) comparou auto enxerto, com alo enxerto, com tubo de veia, todos preservados em glicerol a 98% por sete dias a 4°C, no reparo do nervo fibular em ratos, demonstrando resultados semelhantes nos três grupos, o que sugere que o glicerol é um método eficaz na manutenção da matriz extracelular. Além disso, este método mostrou-se mais barato, podendo ser utilizado em grande escala, o que traria vantagens para os pacientes e para os sistemas de saúde em geral. Nakamoto JC (2020) realizou a comparação entre os três métodos: preservação a frio, em detergentes, ambos bastante utilizados atualmente, e preservação em glicerol, método utilizado em bancos de pele e que traria melhor custo benefício para os pacientes, médicos e sistemas de saúde.

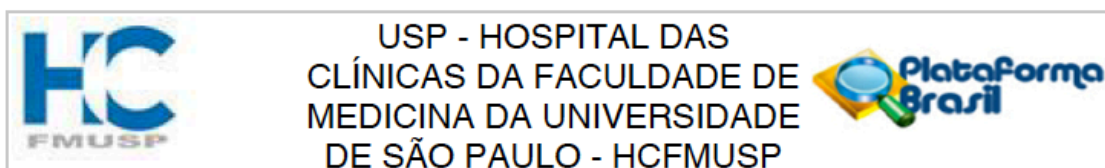
Foram realizadas avaliação histomorfológica e funcional da taxa de regeneração axonal em ratos e demonstrou-se que a presença de debris celulares, após o tratamento com glicerol, foi similar ao tratamento com detergentes e significativamente melhor ao preservado por resfriamento.

Além disso, a preservação do enxerto de nervo em glicerol foi similar ao autoenxerto e aos enxertos preservados em solução de detergentes na regeneração nervosa. Através da análise histomorfométrica do diâmetro do axônio e da espessura da bainha de mielina, pode-se prever recuperação funcional e eletrofisiológica (Lovati et al., 2018). Além disso, a presença de remanescentes de células de Schwann predispõe imunogenicidade e são fatores de rejeição (Gulati AK, 1998; Siemionow et al., 2007). Portanto uma análise imunohistoquímica da coloração das células de Schwann também determina fator de antigenicidade (Hundepool et al., 2017). Em humanos, ainda é incerto qual método de preservação levaria a melhor manutenção das propriedades estruturais do nervo e removeria todos os debris celulares, diminuindo fator anti imunogênico. Este impasse é o motivo do presente estudo e traria potenciais avanços no tratamento de lesões complexas de nervo.

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo primário deste estudo é comparar qual o método de processamento de nervo em

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappesq.adm@hc.fm.usp.br



Continuação do Parecer: 4.514.331

cadáveres – preservação à frio, com detergentes, ou com glicerol- é melhor, em relação à manutenção da matriz extracelular e retirada de debris celulares pela análise histopatológica.

Os objetivos secundários são:

- Comparação do custo benefício de cada método.
- Análise qualitativa imunohistoquímica

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

As disseções seguirão normas de segurança semelhantes a procedimentos cirúrgicos. Todo o material perfuro-cortante utilizado (lâminas de bisturi, agulhas de fios de sutura) será descartado de forma padrão, seguindo as normas hospitalares (descarpak). A manipulação dos materiais de pesquisa necessários para preservação e análise não oferece risco potencial aos executantes.

Benefícios:

Utilização de aloenxertos de nervos em humanos. Avaliar qual método de processamento de nervo é melhor.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto está claramente descrito e delineado.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Documentação apresentada conforme legislação vigente, normas da instituição e a resolução 466

Recomendações:

Não há

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Projeto cadastrado na CAPPesq como CAAE 41040720.1.0000.0068 nesta data conforme o projeto e a dispensa TCLE apresentados.

Considerações Finais a critério do CEP:

Lembramos que, conforme o item XI.2.d da Res. 466/2012 o pesquisador deverá manter o CEP informado sobre o andamento de sua pesquisa através do envio de relatórios parciais (semestrais) e final. De acordo com o cronograma apresentado, está previsto a entrega do relatório parcial em 06 meses após a data da aprovação. Caso haja alterações no cronograma do estudo, por favor, submeter atualização.

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
 Bairro: Cerqueira Cesar CEP: 05.403-010
 UF: SP Município: SAO PAULO
 Telefone: (11)2661-7585 Fax: (11)2661-7585 E-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br



**USP - HOSPITAL DAS
CLÍNICAS DA FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO - HCFMUSP**



Continuação do Parecer: 4.514.331

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1652262.pdf	15/12/2020 23:49:14		Aceito
Outros	Declaracao_do_Chefe_da_Disciplina.pdf	15/12/2020 23:46:12	Marcelo Rosa de Rezende	Aceito
Outros	Declaracao_do_Chefe_do_Grupo.pdf	15/12/2020 23:45:45	Marcelo Rosa de Rezende	Aceito
Outros	Declaracao_de_Compromisso_de_Doutorado.pdf	15/12/2020 23:44:31	Marcelo Rosa de Rezende	Aceito
Outros	Custo_2.pdf	15/12/2020 23:43:15	Marcelo Rosa de Rezende	Aceito
Outros	Parecer_Uso_de_dados_digitais.pdf	15/12/2020 23:42:29	Marcelo Rosa de Rezende	Aceito
Outros	Protocolo_de_Pesquisa.pdf	15/12/2020 23:41:55	Marcelo Rosa de Rezende	Aceito
Outros	Manifestacao_SVO.pdf	15/12/2020 23:40:05	Marcelo Rosa de Rezende	Aceito
Outros	APROVACAO_DOT_FMUSP_SGP_16632.pdf	15/12/2020 23:39:07	Marcelo Rosa de Rezende	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Dispensa_do_TCLE.pdf	15/12/2020 23:38:29	Marcelo Rosa de Rezende	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Detalhado.pdf	15/12/2020 23:37:34	Marcelo Rosa de Rezende	Aceito
Cronograma	CRONOGRAMA.pdf	15/12/2020 23:33:32	Marcelo Rosa de Rezende	Aceito
Folha de Rosto	FOLHA_DE_ROSTO_SGP16632.pdf	15/12/2020 23:33:16	Marcelo Rosa de Rezende	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar

Bairro: Cerqueira Cesar

CEP: 05.403-010

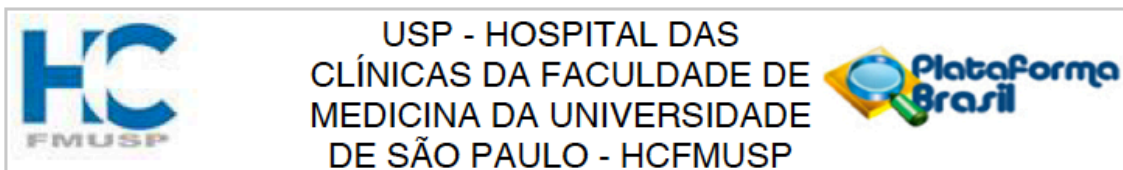
UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)2661-7585

Fax: (11)2661-7585

E-mail: cappelq.adm@hc.fm.usp.br



Continuação do Parecer: 4.514.331

SAO PAULO, 28 de Janeiro de 2021

Assinado por:
ALFREDO JOSE MANSUR
(Coordenador(a))

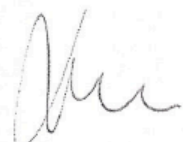
Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappesq.adm@hc.fm.usp.br

Anexo C - Aprovação da Comissão Científica**DEPARTAMENTO DE ORTOPEDIA E TRAUMATOLOGIA**
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo**COMISSÃO CIENTÍFICA****IDENTIFICAÇÃO****Protocolo IOT nº 1474 SGP: 16632****Pesquisador Responsável:** Prof. Marcelo Rosa de Rezende**Pesquisador Executante:** Dr. Erick Yoshio Wataya**Título:** Comparação de métodos de processamento de aloenxertos de nervo acelulares em humano**Grau de Pesquisa:** Doutorado**PARA USO EXCLUSIVO DA COMISSÃO CIENTÍFICA**

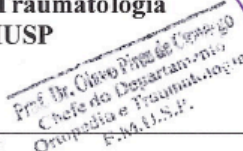
Parecer da Comissão Científica do IOT:

☒ Aprovado☐ Aprovado com restrições (corrigir e/ou completar)☐ Indeferido

São Paulo, 04 de dezembro de 2020


Prof. Raphael Martus Marcon
Presidente
Comissão Científica - DOT**APROVAÇÃO DO DEPARTAMENTO**

São Paulo, 04 de dezembro de 2020


Prof. Olavo Pires de Camargo
Chefe do Departamento
Ortopedia e Traumatologia
FMUSP
Prof. Dr. Olavo Pires de Camargo
Chefe do Departamento
Ortopedia e Traumatologia
FMUSP

Anexo D - Manifestação prévia a respeito dos aspectos técnicos relacionados à obtenção de material de estudo para pesquisa científica na SVO



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
SERVIÇO DE VERIFICAÇÃO DE ÓBITOS DA CAPITAL

**Manifestação prévia a respeito dos aspectos técnicos relacionados
à obtenção de material de estudo para pesquisa científica**

Título da Pesquisa: Comparação de métodos de processamento de aloenxertos de nervo acelulares em humanos.

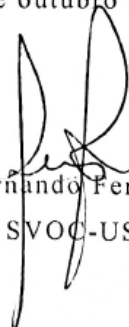
Pesquisador Responsável: Marcelo Rosa de Rezende

Pesquisador Executante: Erick Yoshio Wataya

Em relação aos aspectos técnicos relacionados à obtenção de material de estudo para pesquisa científica mencionada acima, informamos não haver impedimento do ponto de vista técnico e nem risco de mutilação.

Entretanto, alertamos que terá que ser submetido o TCLE ao familiar para que se obtenha a autorização para coleta de material biológico.

São Paulo, São Paulo, 26 de outubro de 2020.


Prof. Dr. Luiz Fernando Ferraz da Silva
Diretor SVOC-USP

Anexo E - Termo de consentimento livre e esclarecido pelo familiar

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DA PESQUISA

Título da pesquisa - Comparação de métodos de processamento de aloenxertos de nervo acelulares em humanos

Pesquisador principal – Dr. Marcelo Rosa de Rezende

Departamento/Instituto – Instituto de Ortopedia e Traumatologia

Caro familiar,

Este estudo visa comparar qual método de processamento e acondicionamento de nervo de humanos é melhor.

O estudo será realizado caso o acompanhante ou o familiar concorde com esses termos, portanto, não sendo obrigado o aceite deste termo e participação no estudo. Porém, consideramos este estudo de muita importância para que seja possível tratar nossos pacientes da melhor forma possível, especificamente os que possuem uma lesão grave de nervo.

Será realizado uma única técnica cirúrgica de ressecção do nervo através de um corte na região da axila, em torno de 10cm, um segmento de nervo de 6 cm será ressecado e então encaminhado para estudo.

Este segmento de nervo ressecado será preparado de 3 formas diferentes: preservação a frio, com glicerol e com detergentes.

Após o preparo, os nervos serão analisados por histologia e imunohistoquímica, com a finalidade de comparar qual método de preservação é melhor, e que futuramente, em um próximo estudo, pode servir como aloenxerto de nervo para pacientes com lesões graves de nervo.

Estou ciente ainda que não haverá de forma alguma alteração na condução do caso pela equipe médica devido ao projeto científico, nem a utilização do segmento de nervo para outro fim.

Nome resumido do projeto: Comparação de métodos de processamento de aloenxertos de nervo acelulares em humano	Confidencial	
Termo de Consentimento Livre e Esclarecido versão 1.0 de 23 de outubro de 2020		
Nome do pesquisador: Marcelo Rosa de Rezende Hospital Das Clínicas Da Faculdade De Medicina Da USP	Rubrica do Participante da Pesquisa/Representante legal Rubrica do Investigador Responsável	

Atualizado-dezembro 2019

Concordo que as informações recolhidas sejam aplicadas somente para elaboração de produção científica, sem fins comerciais, visando melhorias no tratamento dos pacientes e que a qualquer momento, os dados recolhidos podem ser retirados do projeto, caso eu queira.

O material biológico (.....) obtido para esta pesquisa será armazenado de acordo com a resolução 441/2011.

Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento ou dúvidas. O principal investigador é o Dr Marcelo Rosa de Rezende que pode ser encontrado no endereço Rua Ovídio Pires de Campos, 333 Telefone(s) 2661-6909 e-mail marcelo@marcelorosaderezende.com.br. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: (11) 2661-7585, (11) 2661-1548, (11) 2661-1549, **das 7 às 16h de segunda a sexta feira ou por e-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br**

Fui suficientemente informado a respeito do estudo "Comparação de métodos de processamento de aloenxertos de nervo acelulares em humano".

Eu discuti as informações acima com o Pesquisador Responsável Dr. Marcelo Rosa de Rezende ou pessoa (s) por ele delegada (s) Dr. Erick Yoshio Wataya, Dr. Teng Hsiang Wei e Dr. Rames Mattar Junior sobre a minha decisão em autorizar o usos dos dados nesse estudo. Ficaram claros para mim os objetivos, os procedimentos, e as garantias. Concordo voluntariamente na autorização deste estudo, assino este termo de consentimento e recebo um via rubricada pelo pesquisador.

_____ Data ____/____/____

Assinatura do participante /representante legal

Nome do participante /representante legal

_____ Data ____/____/____

Assinatura do responsável pelo estudo

Nome resumido do projeto: Comparação de métodos de processamento de aloenxertos de nervo acelulares em humano	Confidencial	
Termo de Consentimento Livre e Esclarecido versão 1.0 de 23 de outubro de 2020		
Nome do pesquisador: Marcelo Rosa de Rezende Hospital Das Clínicas Da Faculdade De Medicina Da USP		
	Rubrica do Participante da Pesquisa/Representante legal	Rubrica do Investigador Responsável

Atualizado-dezembro 2019

Anexo F - Permissão para reprodução da Figura 24

200 First Street SW
Rochester, Minnesota 55905
507-284-2511

**Mayo Foundation
for Medical Education and Research**

April 8, 2025

Erick Yoshio Wataya
Rua Ovidio Pires de Campos
333 São Paulo, Brazil

To Whom It May Concern:

On behalf of Mayo Foundation for Medical Education and Research, I grant Erick Yoshio Wataya Publisher permission to publish the attached figure without modification, originally published as Figure 1 in Caroline A. Hundepool, Tim H. J. Nijhuis, Dimitra Kotsougiani, Patricia F. Friedrich, Allen T. Bishop, Alexander Y. Shin. Optimizing decellularization techniques to create a new nerve allograft: an in vitro study using rodent nerve segments. *Neurosurg Focus* 42 (3):E4, 2017, for which Mayo Foundation for Medical Education and Research holds copyright in the new work

João Carlos Nakamoto, Hugo Alberto Nakamoto, Marcelo Rosa de Rezende, Elcio Yoshida, Jorge Henrique Higashi, Comparison of processing methods for acellular nerve allografts in humans. *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery*

As copyright Agent for Mayo Foundation, I grant permission to include the attached image in the new work on the condition credit is given as follows, in "Caroline A. Hundepool, Tim H. J. Nijhuis, Dimitra Kotsougiani, Patricia F. Friedrich, Allen T. Bishop, Alexander Y. Shin. Optimizing decellularization techniques to create a new nerve allograft: an in vitro study using rodent nerve segments. *Neurosurg Focus* 42 (3):E4, 2017, Used with permission of Mayo Foundation for Medical Education and Research. All rights reserved."

Sincerely,

A handwritten signature in cursive script that reads "Rosemary Perry".

Rosemary Perry
Copyright Agent

Mayo Foundation for Medical Education and Research

Anexo G - Quadro *baseline* para contagem do número de axônios

NERVOS	GRUPO C	GRUPO D	GRUPO G
1	18.791	14971	10787
2	9.660	9.914	11492
3	10141	8396	4886
4	7790	8650	8964
5	7335	7406	4185
6	3660	5203	6509
7	10056	9066	14478
8	9994	3262	3647
9	2153	5497	2242
10	6900	4046	5452
11	2729	6262	5885
12	10574	19063	17743
13	4668	9725	6222
14	4482	2763	6233
15	2555	2763	8964
16	11645	15211	4907
17	11462	7159	15904
18	5002	6812	11186
19	7056	6327	6642
20	6606	9709	15125
21	2713	3778	8964
22	8837	3158	8964
23	12463	15810	9512
24	6174	15549	5786
25	6904	7579	9052
26	3391	2752	8964
27	5269	6356	2666
28	7790	8650	8964
29	13800	12809	20276
30	7790	8650	8964
31	17769	8650	10962
32	12769	16994	10206
33	7099	10788	2886
34	7790	5494	8964
35	3120	4010	5812
36	3983	10257	6550
37	6513	7175	9483
38	3124	8913	14867
39	6509	9844	7391
40	16.550	15477	11793
41	10913	11837	12324
42	7036	5422	4687
43	4221	5699	5281
44	6990	12748	19652

Anexo H - Quadro *baseline* para área

NERVOS	GRUPO C	GRUPO D	GRUPO G
1	2823754	2225517	1581188
2	977264	1150922	2003387
3	1028347	1039359	602109
4	1126476	1266115	1257672
5	599.002	623314	681.044
6	322195	384171	759132
7	839800	757899	1625193
8	663092	583783	623123
9	272936	656896	264646
10	687779	641225	566304
11	415.132	677259	933457
12	1812207	2183896	2656985
13	796964	1730903	1040991
14	594531	484.221	838754
15	387148	467656	1257672
16	1561857	1626168	788295
17	1949108	1289414	1130661
18	778199	1192450	1368636
19	897847	1104591	964835
20	849032	1644829	1915648
21	450815	672226	1257672
22	1.679.550	524204	1257672
23	2174305	1485897	950177
24	824.847	1377990	790496
25	850946	1472448	1283239
26	572202	422204	1257672
27	908134	1.105.677	429782
28	1126476	1266115	1257672
29	2214647	2089979	3045184
30	1126476	1266115	1257672
31	2938700	1266115	1992325
32	2.240.073	2803847	1668300
33	1.119.926	1.825.240	478285
34	1126476	929624	1257672
35	477426	819269	983458
36	555368	1503194	828639
37	953652	961421	1178801
38	494985	1141851	2143638
39	1159763	1628979	747602
40	2862420	2852897	1724838
41	1493594	2063543	1939491
42	1015991	905632	631948
43	693258	1046363	826.016
44	1122253	2547665	3289604

Anexo I - Quadro *baseline* para densidade de axônios

NERVOS	GRUPO C	GRUPO D	GRUPO G
1	6,65461651	6,72697625	6,82208567
2	9,88519909	8,61399643	5,7362856
3	9,86145727	8,0780558	8,11480978
4	6,91537148	6,83192285	7,12745454
5	12,2453681	11,8816519	6,14497742
6	11,3595804	13,5434481	8,5742664
7	11,9742796	11,962016	8,90848041
8	15,0718151	5,58769269	5,85277706
9	7,88829616	8,36814351	8,47169426
10	10,0322923	6,30979765	9,62733797
11	6,57381267	9,24609344	6,30452179
12	5,83487427	8,72889552	6,67786984
13	5,85722818	5,61845464	5,97699692
14	7,53871539	5,70607223	7,43126113
15	6,59954333	5,90818893	7,12745454
16	7,45586824	9,35389209	6,224827
17	5,88063873	5,55213454	14,0661082
18	6,42766182	5,7126085	8,17310081
19	7,8588	5,72791196	6,88407862
20	7,78062547	5,90274126	7,89550063
21	6,01798964	5,62013371	7,12745454
22	5,26152839	6,02437219	7,12745454
23	5,73194653	10,6400376	10,0107664
24	7,4850245	11,2838264	7,31945513
25	8,11332329	5,14721063	7,05402501
26	5,92622885	6,51817605	7,12745454
27	5,80200719	5,74851426	6,20314485
28	6,91537148	6,83192285	7,12745454
29	6,23124137	6,12876971	6,65838255
30	6,91537148	6,83192285	7,12745454
31	6,0465512	6,83192285	5,50211436
32	5,70026066	6,06095839	6,11760475
33	6,33881167	5,91045561	6,03405919
34	6,91537148	5,90991627	7,12745454
35	6,53504417	4,89460727	5,90975924
36	7,17182121	6,82347056	7,90452779
37	6,8295353	7,46291167	8,04461482
38	6,31130236	7,80574698	6,93540607
39	5,61235356	6,04304905	9,88627639
40	5,78182098	5,42501184	6,83716384
41	7,30653712	5,73625071	6,35424449
42	6,9252582	5,98697926	7,41674948
43	6,08864232	5,44648463	6,39333863
44	6,22854205	5,0037976	5,97397134

Anexo J - Quadro *baseline* para espessura da bainha de mielina

NERVOS	GRUPO C	GRUPO D	GRUPO G
1	1,352	1,498	1,613
2	1,4	1,009	1,51
3	1,324	1,069	1,686
4	1,407	1,384	1,566
5	1,126	1,095	1,297
6	1,471	1,133	1,379
7	1,469	1,064	2
8	1,318	2,218	2,014
9	1,287	1,262	2,187
10	1,46	1,382	1,234
11	1,397	1,087	1,969
12	2,016	1,292	1,599
13	1,883	2,342	2,135
14	1,386	1,381	1,508
15	1,453	0,871	1,566
16	1,579	1,389	1,825
17	1,578	1,552	1,716
18	1,188	1,096	1,856
19	1,134	1,363	1,474
20	1,358	1,591	1,184
21	1,717	1,512	1,566
22	1,729	1,674	1,566
23	1,606	1,122	1,275
24	1,612	1,633	2,096
25	0,858	1,061	1,172
26	0,913	1,046	1,566
27	1,193	1,195	1,021
28	1,407	1,384	1,566
29	2,386	1,786	2,347
30	1,407	1,384	1,566
31	1,709	1,384	2,073
32	2,287	1,961	1,592
33	1,677	1,73	1,715
34	1,407	2,209	1,566
35	1,091	1,443	1,968
36	0,826	0,897	0,851
37	1,022	1	1,204
38	1,203	0,883	1,441
39	1,419	1,518	0,935
40	1,652	1,823	1,296
41	1,157	1,756	1,745
42	0,906	0,817	1,102
43	1,266	1,83	1,448
44	0,852	0,775	1,388

Anexo K - Quadro *baseline* para análise da matriz extracelular

NERVOS	GRUPO C	GRUPO D	GRUPO G
1	NORMAL	NORMAL	NORMAL
2	NORMAL	DESTRUIDO	NORMAL
3	DESTRUIDO	NORMAL	NORMAL
4	NORMAL	NORMAL	NORMAL
5	NORMAL	NORMAL	DESTRUIDO
6	DESTRUIDO	DESTRUIDO	NORMAL
7	NORMAL	DESTRUIDO	NORMAL
8	NORMAL	DESTRUIDO	DESTRUIDO
9	NORMAL	NORMAL	DESTRUIDO
10	NORMAL	NORMAL	DESTRUIDO
11	NORMAL	NORMAL	NORMAL
12	NORMAL	NORMAL	NORMAL
13	NORMAL	NORMAL	NORMAL
14	NORMAL	NORMAL	NORMAL
15	NORMAL	NORMAL	NORMAL
16	NORMAL	NORMAL	NORMAL
17	NORMAL	NORMAL	NORMAL
18	NORMAL	NORMAL	NORMAL
19	NORMAL	NORMAL	NORMAL
20	NORMAL	NORMAL	NORMAL
21	NORMAL	NORMAL	NORMAL
22	NORMAL	NORMAL	NORMAL
23	NORMAL	NORMAL	NORMAL
24	NORMAL	NORMAL	NORMAL
25	NORMAL	NORMAL	NORMAL
26	NORMAL	NORMAL	NORMAL
27	NORMAL	NORMAL	NORMAL
28	NORMAL	NORMAL	NORMAL
29	NORMAL	NORMAL	DESTRUIDO
30	NORMAL	NORMAL	NORMAL
31	NORMAL	DESTRUIDO	NORMAL
32	NORMAL	NORMAL	NORMAL
33	NORMAL	NORMAL	NORMAL
34	NORMAL	NORMAL	NORMAL
35	NORMAL	NORMAL	NORMAL
36	NORMAL	NORMAL	NORMAL
37	NORMAL	NORMAL	NORMAL
38	NORMAL	NORMAL	NORMAL
39	NORMAL	NORMAL	NORMAL
40	NORMAL	NORMAL	NORMAL
41	NORMAL	NORMAL	NORMAL
42	NORMAL	NORMAL	DESTRUIDO
43	NORMAL	NORMAL	NORMAL
44	NORMAL	NORMAL	NORMAL

Anexo L - Comparação ANOVA a um fator (Welch) para o grupo D**ANOVA a um fator**

A a um fator (Welch)

	F	gl1	gl2	p
Contagem	5.966	3	21.8	0.004
Área μm^2	6.407	3	21.4	0.003
Densidade	0.144	3	22.1	0.933
Espessura	1.343	3	21.8	0.286