



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS
CURSO DE GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

ANDRÉ LUIS ESPINDOLA JUNIOR

**Recuperação da força muscular pós cirurgia de regeneração nervosa
retrógrada em ratos**

Florianópolis

2024

André Luis Espindola Junior

Recuperação da força muscular pós cirurgia de regeneração nervosa retrógrada em ratos

Trabalho de Conclusão de Curso submetido ao curso de graduação em farmácia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Farmácia.

Orientador (a): Profa. Morgana Duarte Silva, PhD

Co-orientador(a): Marcos Lisboa Neves, PhD

Florianópolis

2024

Luis Espindola Junior, André

Recuperação da força muscular pós cirurgia de regeneração nervosa retrógrada em ratos / André Luis Espindola Junior ; orientador, Morgana Duarte da Silva, coorientador, Marcos Lisboa Neves, 2024.

50 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2024.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. Regeneração nervosa. 3. Cirurgia retrograda. 4. Cirurgia de enxerto. I. Duarte da Silva, Morgana. II. Lisboa Neves, Marcos. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em Farmácia. IV. Título.

André Luis Espindola Junior

Recuperação da força muscular pós cirurgia de regeneração nervosa retrógrada em ratos

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do título de Farmacêutico e aprovado em sua forma final pelo Curso Farmácia

Local Florianópolis,

Profa. Dra. Christiane Meyre Silva Bittencour
Coordenadora do curso

Banca examinadora

Prof. Morgana Duarte Silva, Dr (a)
Orientadora

Prof. Alfeu Zanotto filho, Dr (a)
Instituição UFSC

Prof. Rafael Scoz Silva, Dr. (a)
Instituição UFSC

Florianópolis, 2024.

AGRADECIMENTOS

De início, gostaria de agradecer toda a minha família que sempre torceram para que eu chegasse até o final deste curso e que não mediram esforços para me ajudar da forma que podiam. Em especial, gostaria de agradecer meu pai e a minha mãe. Minha mãe sempre será a personificação de uma mulher guerreira, pois sempre lutou para me dar a melhor educação e o principal, sempre me acolheu quando mais precisei e nunca me deixou a mercê das dificuldades. Ao meu pai, um exemplo de pessoa organizada, inteligente e acima de tudo, humilde, graças a ti pai eu aprendi que os maiores ensinamentos nem sempre estão nos livros. Amo vocês dois mais que tudo neste mundo.

Gostaria também, de agradecer imensamente a Elizabeth e ao Vânio, meus amados avós, sem vocês não sou nada, sempre me amaram imensamente. Você vó, sempre com o seu jeito elegante de me educar, sempre te reconheci como minha mãe também, pois você sempre zelou por mim. E você vô, és a pessoa mais tranquila e bondosa que eu conheço, mesmo com suas dificuldades devido ao parkinson, nunca deixou de ver a vida com as lentes da bondade e perseverança. E não poderia me esquecer dos meus amados, tio e tia e Amandinha. Vocês são os tios mais jovens que um sobrinho pode ter, vocês estão sempre para frente e trazem alegria onde passam. E você Amandinha, obrigado por ser a princesa do primo, saiba que o primo te ama muito e sempre vai querer o seu bem. No mais, dedico este trabalho a todos que foram citados acima e até mesmo os que não foram, pois daria páginas e mais páginas para agradecer a todos que fizeram parte deste trabalho.

RESUMO

Introdução: Atualmente, a cirurgia mais comumente utilizada no meio cirúrgico para tratar lesões do nervo periférico é a cirurgia nervosa de enxerto. Neste trabalho, utilizamos a técnica de cirurgia retrógrada, diferente ao protocolo de enxerto, para avaliar principalmente os parâmetros de força e reinervação. **Metodologia:** Foram utilizadas ratas wistar com idade entre 60 e 90 dias, divididas em quatro grupos: naive, sham, retrógrado e enxerto. O Naive não sofreu procedimento cirúrgico enquanto o Sham teve apenas o músculo e a pele afastados como se fosse feito o mesmo caminho da cirurgia, porém, sem operar o nervo. O grupo retrógrado sofreu a cirurgia que envolve a regeneração nervosa retrógrada e grupo enxerto sofreu a cirurgia de enxerto. Após um período de onze semanas os animais passaram pelos testes de preensão vertical, eletrofisiologia, escavação e campo aberto. Esses testes foram realizados após a recuperação cirúrgica por um período de trinta semanas. **Resultados:** Nos dados do teste de preensão vertical, em que se avalia a força de flexão dos dedos das ratas, infere-se que os animais do grupo retrógrado e enxerto não recuperaram a força de flexão dos dedos até a trigésima semana. No teste de eletrofisiologia, os animais recuperaram a reinervação muscular na trigésima semana. Nos testes de campo aberto e escavação, não houve diferença estatística entre o grupo controle os grupos de cirurgia retrógrada e enxerto. **Conclusão:** Este estudo demonstrou que a cirurgia retrógrada possui resultados similares, quando comparado com a cirurgia de enxerto. Contudo, faz-se necessário mais estudos, a fim de avaliar a reprodutibilidade desses dados e mais análises.

Palavras chave: Cirurgia nervosa retrógrada, cirurgia de enxerto, regeneração nervosa.

ABSTRACT

Introduction: Currently, the most commonly used surgery to treat peripheral nerve injuries is nerve graft surgery. In this study, we used the retrograde surgery technique, which is different to the grafting protocol, to evaluate the parameters of strength and reinnervation.

Methodology: Wistar rats aged between 60 and 90 days were divided into four groups: naive, sham, retrograde and graft. The Naive group underwent no surgery, while the Sham group only had the muscle and skin removed as if it were the same way as surgery, but without operating on the nerve. The retrograde group underwent surgery involving retrograde nerve regeneration and the graft group underwent graft surgery. After a period of eleven weeks, the animals began to undergo the vertical grip, electrophysiology, digging and open field tests. The animals were tested after surgical recovery for a period of thirty weeks.

Results: In the data from the vertical grip test, in which the flexion strength of the rats' fingers is assessed using an apparatus, it is inferred that the animals in the retrograde and graft group did not recover their finger flexion strength until the thirtieth week. In the electrophysiology test, the animals recovered muscle reinnervation by the 30th week. In the open field and excavation tests, there was no statistical difference between the control and intervention groups. **Conclusion:** This study showed that retrograde surgery has similar results when compared to graft surgery. However, more studies are needed to assess the reproducibility of these data and further analysis.

Key words: Retrograde nerve surgery, graft surgery, nerve regeneration.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Corte transversal do nervo.....	12
Figura 2: Fisiologia da regeneração nervosa.....	15
Figura 3: Regeneração nervosa.....	18
Figura 4: Categorias da escala grimace.....	24
Figura 5: Linha temporal dos testes.....	25
Figura 6: Anestesia intraperitoneal.....	26
Figura 7: Cirurgia retrograda, grupo 3.....	27
Figura 8: Cirurgia de enxerto, grupo 4.....	28
Figura 9: Balança digital.....	29
Figura 10: Escavação.....	31
Figura 11: Teste de campo aberto.....	32
Figura 12: Teste de <i>Grasp</i>	33
Figura 13: Eletrofisiologia.....	34
Figura 14: Escavação.....	35
Figura 15: Campo aberto.....	36

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

SUS- Sistema único de saúde

DATASUS- Departamento de informática do sistema único de saúde

UP REGULATION- Regulação para cima

LANDI- Laboratório de neurobiologia da dor e inflamação

POWER ANALYSIS- Calculadora que estima o número de animais

RESOURCE EQUATION- Método usado para calcular o número de animais

CEUA- Comissão de ética no uso de animais em laboratório

GAP- Espaço

WEB Cam- Câmera

UP-AND-DOWN- Para cima e para baixo

SCORES- Valores

G- Gramas

mL- Mililitro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 JUSTIFICATIVA	20
3 OBJETIVOS	21
3.1 OBJETIVO GERAL.....	21
3.2 OBJETIVO ESPECÍFICO.....	21
4 MATERIAIS E MÉTODOS	22
4.1 ANIMAIS	22
4.1.2 TAMANHO DA AMOSTRA	22
4.2 APROVAÇÃO NA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS	23
4.3 MÉTODOS ADOTADOS PARA A MINIMIZAÇÃO DE ESTRESSE OU SOFRIMENTO ANIMAL.....	23
4.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	25
4.5 GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	25
4.6 CIRURGIAS	26
4.7 TESTES DE FORÇA E LOCOMOÇÃO.....	28
4.7.1 <i>GRASP</i> TESTE	28
4.7.2 ELETROFISIOLOGIA	29
4.7.3 ESCAVAÇÃO.....	30
4.7.4 AVALIAÇÃO DA LOCOMOÇÃO (OPEN FIELD)	31
4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	32
5 RESULTADOS	33

5.1 GRASP TESTE	33
5.2 ELETROFISIOLOGIA.....	34
5.3 ESCAVAÇÃO	35
5.4 AVALIAÇÃO DA LOCOMOÇÃO (CAMPO ABERTO).....	36
6 DISCUSSÃO.....	37
7 CONCLUSÃO	40
REFERÊNCIAS	41
ANEXO.....	50

1 INTRODUÇÃO

As lesões do sistema nervoso periférico (SNP) envolvem danos ou disfunções que afetam os nervos, podendo originar-se de diversas causas, como acidentes, traumas, compressão ou doenças. Essas lesões têm o potencial de desencadear distúrbios sensoriais, somáticos e motores (LIU; DUAN, 2023). No que tange a regeneração nervosa, as células de Schwann são fundamentais neste caso, principalmente em lesões do nervo periférico (CHEN et al, 2007 ; JESSEN et al, 2015). Elas desempenham um papel crucial na remielinização dos axônios e na criação de um microambiente propício ao crescimento neural (GOMEZ-SANCHEZ et al, 2015 ; JESSEN et al, 2015).

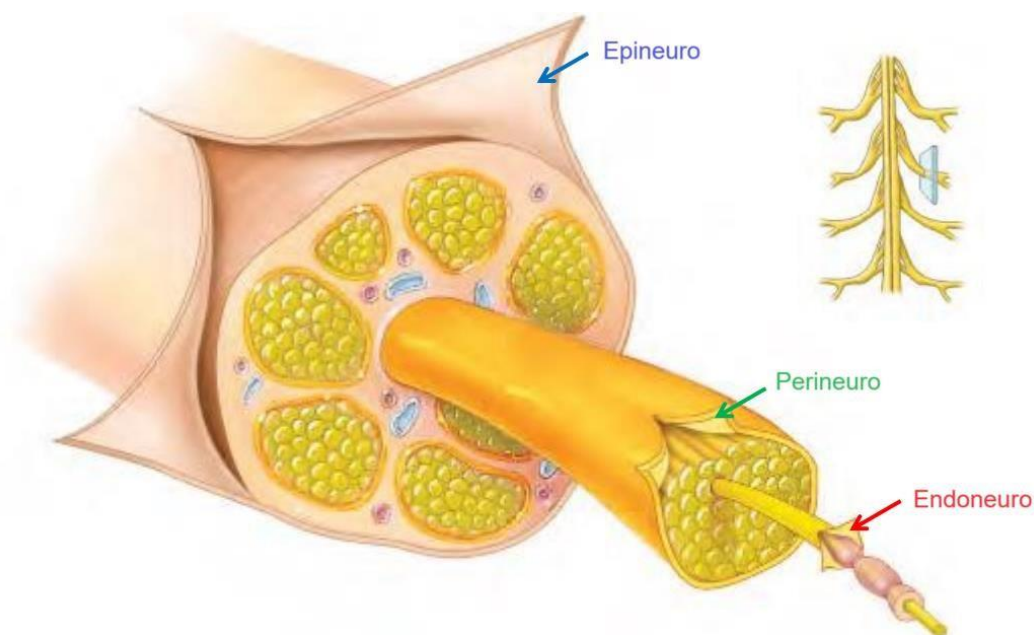
Por meio do fornecimento de suporte estrutural e metabólico aos axônios regenerantes, as células de Schwann promovem a orientação dos axônios e fornecem fatores neurotróficos essenciais para a sobrevivência e crescimento axonal (GORDON, 2009). A plasticidade fenotípica das células de Schwann em resposta a estímulos extrínsecos e intrínsecos, incluindo lesões e sinais bioquímicos, é amplamente discutida (CUNHA et al, 2020; GOMEZ-SANCHEZ et al, 2015). Essas células adaptam-se funcionalmente para auxiliar na regeneração neural e na restauração da função nervosa (JESSEN et al, 2015). Essas ideias são consideradas fundamentais para o desenvolvimento de abordagens terapêuticas destinadas a promover a regeneração nervosa periférica (CHEN et al, 2007 ; JESSEN et al, 2015).

Estudos retrospectivos têm revelado a prevalência de lesões do plexo braquial em diversas regiões. Um estudo realizado no Hospital de Referência para Alta Complexidade na região metropolitana de São Paulo, entre agosto de 2008 e junho de 2013, mostrou uma incidência anual de 1,88 casos por 100.000 habitantes. Essas lesões, que afetam diferentes partes do plexo braquial, representaram uma proporção considerável das condições tratadas no hospital, com 33% das lesões sendo totais, 33% afetando o tronco superior e 28% o tronco superior e médio. Além disso, constatou-se que a maioria dos pacientes, cerca de 66%, necessitou de algum tipo de intervenção cirúrgica, como reparo ou reconstrução nervosa, conforme relatório de (CHO et al, 2020). O impacto dessas lesões é significativo, como indicado por um estudo mais amplo, realizado entre janeiro de 2017 e janeiro de 2023, que notificou 785 casos de cirurgia de enxerto microcirúrgico de nervo periférico apenas no Sistema Único de Saúde (SUS), evidenciando a gravidade dessas condições tanto em

termos sociais quanto econômicos.

Anatomicamente, um nervo é composto por diversos tecidos que o circundam, incluindo o epineuro, perineuro e endoneuro (MAGGI; LOWE; MACKINNON, 2003). Como pode ser visto na figura 1. O epineuro apresenta duas camadas distintas: uma externa e outra interna. A camada externa é principalmente composta por colágeno e fibras elásticas, enquanto a camada interna reveste os fascículos, que consistem em fibras nervosas mielinizadas e não mielinizadas. Cada fascículo é envolto por tecido conectivo conhecido como perineuro, que atua como um local de permeabilidade para substâncias através das junções estreitas e das células perineurais adjacentes. Envolvendo cada axônio encontra-se uma matriz gelatinosa de colágeno chamada endoneuro (MAGGI; LOWE; MACKINNON, 2003).

Figura 1 - Corte transversal do nervo



Fonte: Grabowski, 2000.

A maioria dos axônios regenerativos falha em alcançar os funículos e os tubos endoneurais do coto distal (região mais distante ao corpo celular do neurônio; figura 3) devido à separação dos extremos nervosos. Mesmo quando os extremos estão próximos, muitos axônios regenerativos escapam para o tecido circundante à medida que emergem

do coto proximal aberto. Esse fenômeno é aumentado à medida que a distância entre os extremos nervosos aumenta (SUNDERLAND, 1951).

O quadro clínico das lesões periféricas nervosas é classificado em cinco graus, conforme estabelecido por Sunderland (1951). De acordo com Sunderland 1951, No primeiro grau, tem-se a apraxia nervosa em que os axônios estão intactos mas a condução nervosa é mais lenta. No grau dois, tem-se axônios nervosos quebrados, entretanto, o perineuro e os tecidos íntimos estão intactos. No grau três, tem-se os axônios danificados na região da bainha de mielina e na região do endoneuro, enquanto o perineuro está intacto e normal. No grau quatro, tem-se os feixes nervosos, axônios, endoneuro e perineuro gravemente lesionados, enquanto o epineuro ainda está intacto, mantendo a continuidade do tronco nervoso. No grau cinco, o feixe nervoso e o epineuro estão ambos partidos, o tronco nervoso fica completamente danificado e perde a sua continuidade. Neste trabalho, provocou-se uma lesão de quinto grau, do tipo corte. Em tal condição, os extremos nervosos (cotos) podem permanecer separados ou ser unidos por um filamento atenuado de tecido composto por uma estrutura de células fibroblásticas e de Schwann que facilitam a regeneração axonal.

Esse fenômeno é observado após um período suficiente para permitir a atividade neural, das células de Schwann e fibroblásticas, preencher a lacuna (SUNDERLAND, 1951). Sunderland descreve que algumas dessas fibras regenerativas podem apresentar o sinal de Hoffman-Tinel, embora esse indicador seja considerado pouco confiável para determinar a natureza da lesão e a qualidade do resultado final (SUNDERLAND, 1951).

A recuperação após uma lesão de quinto grau não tratada é reduzida a um nível insignificante devido a uma série de fatores. Os efeitos neuronais retrogradados são severos, resultando em uma alta incidência de degeneração e, conseqüentemente, uma redução significativa no número de axônios sobreviventes (SUNDERLAND, 1951).

Após uma lesão axonal do tipo corte, ocorre a degeneração waleriana (DW), um processo intrínseco de destruição axonal que ocorre após lesões nervosas. Zhang, Jiang e Fang (2021) destacam a importância dos fatores intracelulares e extracelulares que desencadeiam e regulam a DW, incluindo a ativação de vias de sinalização específicas, como a via MAPK (YANG et al, 2015). Além disso, destaca-se o papel fundamental de

proteínas como SARM1 na promoção da degeneração axonal (OSTERLOHN et al, 2012). O trabalho de Zhang, Jiang e Fang (2021) aborda as implicações terapêuticas de alguns achados, sugerindo que a manipulação de certas vias bioquímicas pode ser uma estratégia promissora para retardar ou prevenir a DW (WANG et al, 2006).

Além disso, o trabalho de Zhang, Jiang e Fang (2021) estabelece a interconexão entre DW e processos celulares como autofagia e apoptose, ressaltando a complexidade dos eventos moleculares envolvidos na degeneração axonal (MIZUSHIMA et al, 2008). As descobertas também sugerem uma interação intrincada entre diferentes tipos celulares, como neurônios, células gliais e células imunes, no contexto da DW (PERRY; LUNN; BROWN; CAHUSAC; GORDON, 1990).

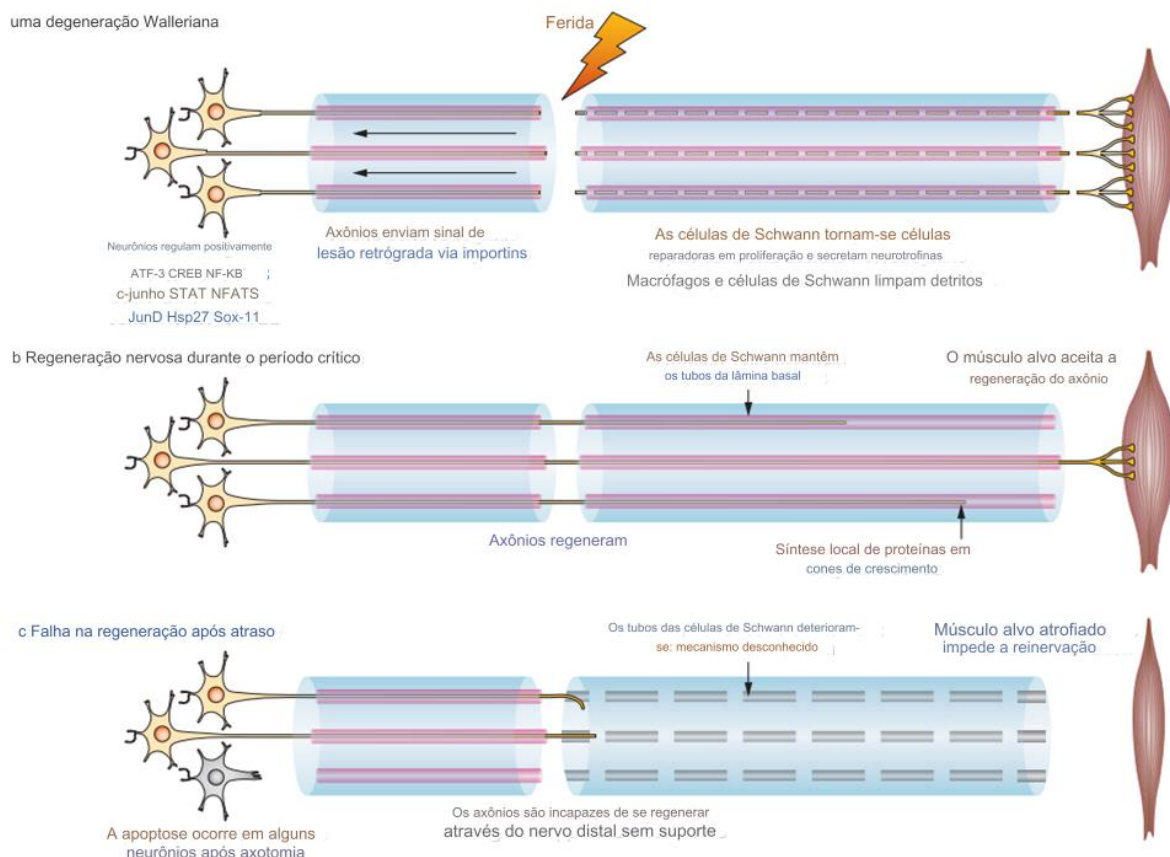
Em suma, o trabalho de Zhang, Jiang e Fang (2021) oferece uma visão abrangente dos mecanismos moleculares e celulares que regem a degeneração waleriana, destacando seu potencial como alvo terapêutico para condições neurodegenerativas e lesões nervosas (VARGAS; BARRES, 2007).

A regeneração nervosa é um processo que envolve uma interação complexa entre diversos eventos celulares e moleculares. Quando ocorre uma lesão no sistema nervoso, desencadeia-se uma resposta inflamatória inicial, com a ativação de células imunes, como macrófagos, que são responsáveis pela remoção de detritos celulares e pela limpeza do local da lesão (ZHANG et al, 2010). Essa resposta inflamatória também desempenha um papel crucial na modulação do ambiente extracelular, promovendo a regeneração dos axônios e a sobrevivência celular. No entanto, disfunções mitocondriais e estresse oxidativo podem comprometer esse processo, interferindo na capacidade das células neurais de se regenerarem e de formarem novas conexões sinápticas (CAMPISI; D'ADDA DI FAGAGNA, 2007). Além disso, a presença do inflamassoma, uma plataforma multiproteica citoplasmática, pode modular a inflamação durante o processo de cicatrização, afetando indiretamente a regeneração nervosa (BAKER et al, 2011). Este processo é complexo e delicadamente regulado por uma série de fatores celulares e moleculares, sendo fundamental para a restauração da função neural após uma lesão.

Os fatores de crescimento nervosos, como o *Nerve Growth Factor* (NGF), desempenham um papel crucial na regeneração nervosa ao promover a sobrevivência,

crescimento e diferenciação dos neurônios. O NGF se liga a receptores específicos na superfície das células neuronais, como o receptor de alta afinidade TrkA e o receptor de baixa afinidade p75NTR (SOFRONIEW; HOWE MOBLEY, 2001). Esta ligação desencadeia uma cascata de sinalização intracelular que culmina na promoção do crescimento axonal e na prevenção da apoptose (SKAPER, 2001). O NGF também influencia a migração e proliferação das células de Schwann, que são essenciais para a regeneração nervosa. Estas células formam a bainha de mielina ao redor dos axônios, facilitando a condução de impulsos nervosos (ANTON et al, 1994). Além disso, a degradação de proteoglicanos de sulfato de condroitina através da condroitinase aumenta o crescimento axonal, removendo inibidores de crescimento presentes na matriz extracelular dos enxertos de nervos acelulares (ZUO et al, 2001). Estudos demonstraram que a liberação controlada de NGF em enxertos de nervos acelulares melhora significativamente a regeneração nervosa, favorecendo a reinnervação funcional (LEE et al, 2003). Outros fatores neurotróficos, como o *Brain-Derived Neurotrophic Factor* (BDNF) e o *Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor* (GDNF), também têm mostrado efeitos positivos na regeneração de nervos periféricos, promovendo o crescimento e a sobrevivência de neurônios motores e sensoriais (BOYD; GORDON, 2003). Ademais, os processos fisiológicos da regeneração nervosa convencional podem ser vistos pela figura 2 abaixo:

Figura 2 – Fisiologia da regeneração nervosa



Fonte: Adaptado de SCHEIB; HÖKE, 2013

Legenda: Na figura acima é possível ver três porções da fibra, a porção a, b, e c. Na porção “a” tem-se a degeneração waleriana, que é um processo natural do corpo em resposta a uma lesão. Após essa lesão, tem-se um sinal inflamatório que é levado até o corpo do neurônio através de uma resposta retrógrada. Após este sinal ser codificado, tem-se então um *up regulate* dos fatores de crescimento, como o *ngf* por exemplo. Estes fatores então são transportados até a região da lesão onde se acoplam com receptores produzidos pelas células de Schwann. Na porção “b”, tem-se a regeneração nervosa propriamente dita, num período que vai de 4 a 8 semanas para que ocorra uma intervenção cirúrgica no rato, e é nessa janela de crescimento que se tem os melhores prognósticos cirúrgicos em animais. Na porção “c”, tem-se um intervalo de tempo de até 24 semanas, em que ocorreu a apoptose neuronal devido a não intervenção cirúrgica na janela de tempo ideal.

Em humanos, o uso de esteróides anabolizantes já é conhecido a um bom tempo, muitos deles foram desenvolvidos para tratar problemas de recuperação pós cirurgica, raquitismo, hipogonadismo, problemas ortopédicos entre outros (BAIN, 2008). No que tange a recuperação farmacológica da lesão do nervo, pode-se citar o uso do decanoato de nadronolona, popularmente conhecido como “Deca-durabolin”, que é um esteróide anabolizante, que vem demonstrando um aumento da regeneração nervosa e por consequência da capacidade funcional e sensitiva em um estudo com ratos (GHIZONI et al, 2013).

Diante das amplas possibilidades de técnicas cirúrgicas para recuperar o plexo braquial, existe o (a) (i) enxerto de nervo e a (ii) Cirurgia retrógrada. O enxerto de nervo é o padrão ouro cirúrgico (LIU; DUAN, 2023). Vale destacar que a essa técnica envolve a remoção de um segmento de nervo saudável de uma área doadora e seu enxerto em uma área receptora lesionada (AUBÁ et al, 2006). Durante o procedimento, os nervos são suturados meticulosamente para permitir a regeneração axonal e a restauração da função nervosa (WEINZWEIG et al, 1996). A microcirurgia de enxerto de nervo exige habilidades cirúrgicas especializadas e cuidados pós-operatórios para promover a recuperação nervosa ideal (LIU; DUAN, 2023). Já a técnica cirúrgica de regeneração nervosa retrógrada, é um procedimento microcirúrgico utilizado para promover a recuperação de lesões nervosas periféricas através da regeneração convencional dos axônios, porém, dá-se por um caminho diferente do anatômico (retrogrado). Durante esse procedimento, uma porção distal do nervo é removida para criar um ambiente propício para a regeneração nervosa em

direção ao segmento proximal, onde está localizado o corpo celular do neurônio (BERTELLI; ROSA; GHIZONI, 2023).

A cirurgia de regeneração retrograda, na qual axônios motores são direcionados para crescer em uma direção oposta à sua rota normal de crescimento, é frequentemente empregada em procedimentos de reconstrução nervosa (BERTELLI; GHIZONI, 2006).

Durante esse procedimento, o nervo lesado é conectado a um nervo doador distante, permitindo que os axônios motores cresçam na direção reversa (RAY et al, 2016). Isso facilita a reinervação muscular e promove a recuperação funcional em áreas afetadas por lesões nervosas (KEMP et al, 2010). A regeneração retrograda é mediada por uma série de fatores, incluindo a degradação da bainha de mielina no local da lesão e a liberação de fatores de crescimento (RAY et al, 2016). Esse fenômeno permite que os axônios motores se reconectem aos músculos alvo, restaurando parcial ou totalmente a função motora nas áreas afetadas (BERTELLI; GHIZONI, 2006). Essa abordagem cirúrgica representa uma alternativa promissora para a reconstrução de nervos em lesões complexas, onde a rota convencional de regeneração pode ser inviável (RAY et al, 2016). No entanto, mais pesquisas são necessárias para entender completamente os mecanismos subjacentes e otimizar os resultados clínicos dessa técnica (KEMP et al, 2010).

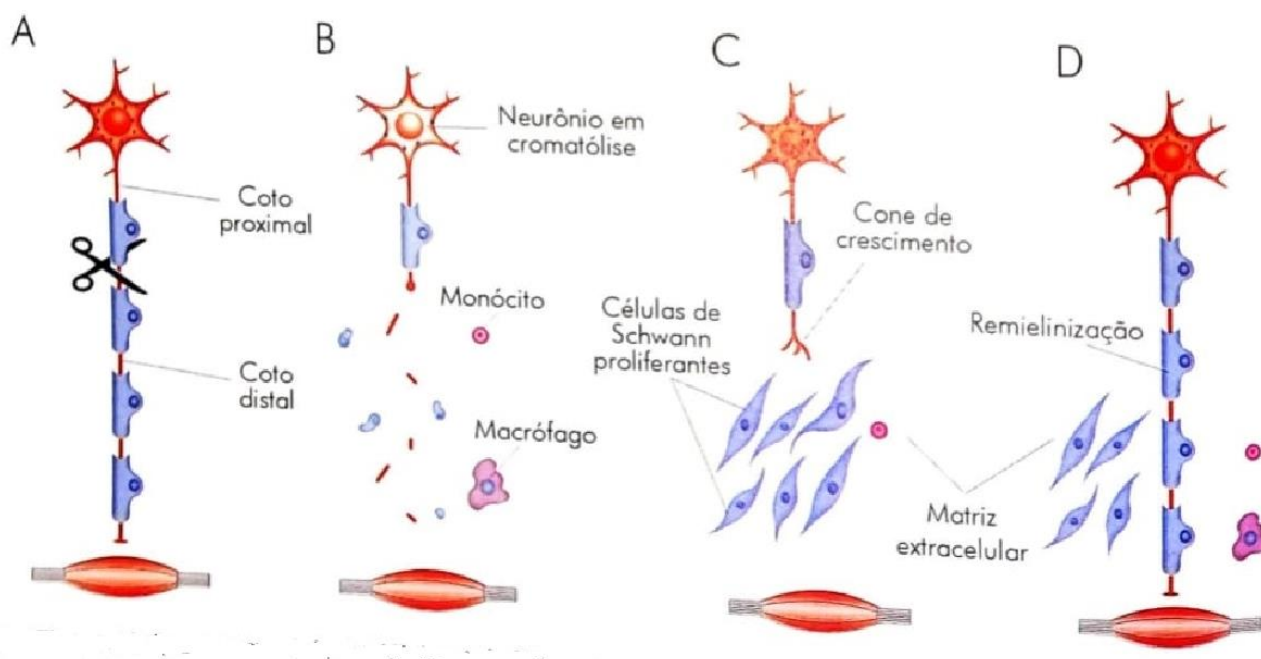
Logo, a cirurgia nervosa retrógrada representa uma estratégia promissora para o tratamento de lesões nervosas periféricas, oferecendo uma alternativa terapêutica viável para animais que enfrentam deficiências motoras e sensoriais decorrentes de danos nos nervos (BERTELLI; ROSA; GHIZONI, 2023). Estudos adicionais são necessários para validar sua eficácia clínica e explorar completamente seu potencial na prática médica (BERTELLI; ROSA; GHIZONI, 2023).

Neste estudo, faz-se necessário enfatizar que na cirurgia retrograda, não há um crescimento retrógrado, de distal para proximal, e sim do corpo celular em direção a porção mais distal (convencional). O termo "retrógrado" refere-se à inversão do caminho percorrido pelo nervo. Em termos simples, movemos a parte mais distal em direção à proximal. Essa abordagem implica em seguir uma rota inversa à usual para alcançar o músculo, conhecida como caminho retrógrado. Pode-se dizer então, que não seguimos o trajeto anatômico convencional do ramo motor (nervo mediano) até o músculo flexor dos dedos. Assim, o

axônio segue uma trajetória oposta à sua rota normal.

A figura 3 abaixo, elucida brevemente como é a regeneração nervosa.

Figura 3 – Regeneração nervosa



Fonte: Cem bilhões de neurônios, 2001.

Legenda: Quando um axônio do sistema nervoso periférico (SNP) é cortado, como na figura (A), é sabido que pode ocorrer a regeneração nervosa. Neste caso, o coto distal e a bainha de mielina degeneram-se, mas o coto proximal sobrevive, embora ocorram sinais de sofrimento do corpo celular (B). Células do sangue invadem o tecido e provocam a proliferação de novas células de Schwann (C). Com a produção de matriz extracelular favorável ao crescimento do axônio, forma-se um cone de crescimento no coto distal, que se move em direção ao alvo, reestabelecendo a conexão (D).

A hipótese deste estudo é a de que a cirurgia retrograda produza melhor recuperação e reinervação nervosa no modelo de lesão do tipo corte de nervo em ratos. Ao promover a

regeneração convencional dos axônios por um caminho diferente; a cirurgia nervosa retrógrada tem o potencial de melhorar a função motora e sensorial, permitindo a recuperação do controle muscular nas áreas afetadas (BERTELLI; ROSA; GHIZONI, 2023). Sendo assim, o presente estudo veio para trazer novos achados no que se refere a forma com que são conduzidas as cirurgias do plexo braquial em modelos pré-clínicos. Essa cirurgia se dará através de um novo caminho que é criado para reinervar o músculo flexor dos dedos de ratas wistar fêmeas.

2 JUSTIFICATIVA

A capacidade geral de regeneração dos nervos periféricos foi reconhecida há mais de um século. Mas, até hoje, os resultados da recuperação funcional após lesões nervosas graves e cirurgia reconstrutiva continua a ser, em muitos casos, deficiente (RONCHI et al, 2019). Além da recuperação funcional, certos tratamentos clínicos continuam limitados, como a microcirurgia do enxerto de nervo (LIU; DUAN, 2023). No momento, o enxerto de nervo autólogo é a técnica de reconstrução mais amplamente reconhecida para preencher uma perda nervosa, considerada como o “padrão ouro” (KONOFAOS; HALEN, 2013).

Estudos com modelos animais permitem a pesquisa de diversos tratamentos e técnicas cirúrgicas. Os ratos são os animais mais comumente utilizados para a pesquisa sobre a regeneração nervosa, devido ao maior tamanho de seus nervos periféricos em comparação com os do camundongo, mas também à presença de modelo transgênico, à existência de testes funcionais padronizados e à facilidade de manipulação do mesmo, o tornam o modelo experimental mais amplamente empregado (RONCHI et al, 2019).

Diante ao que foi exposto, este estudo se mostra necessário visto que poderá trazer boas evidências científicas no que tange a recuperação cirúrgica. E foi através da utilização de dois métodos cirúrgicos, sendo eles uma reparação do defeito do nervo mediano direito por pivotamento do extremo distal, chamado de cirurgia retrograda, e o outro, uma cirurgia para reparação do defeito do nervo mediano por enxerto de nervo obtido do cabo distal do nervo mediano que comparamos os resultados de recuperação de força de roedores. Desta forma, pode-se comparar as duas técnicas e ver qual delas pode ser mais eficaz no tratamento e na recuperação funcional no modelo pré-clínico realizado com ratas, gerando evidências científicas quanto a eficiência principalmente da técnica de regeneração nervosa retrograda.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar o efeito da cirurgia nervosa retrógrada em modelo de lesão nervosa em ratos

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito da cirurgia denominada regeneração nervosa retrógrada sobre a força de flexão dos dedos dos ratos em comparação com a cirurgia de enxerto.
- Avaliar o efeito da cirurgia denominada regeneração nervosa retrógrada sobre a função de locomoção e comportamento de escavar dos ratos em comparação com a cirurgia de enxerto.
- Avaliar a reinervação do músculo flexor dos dedos das ratas que se submeteram a cirurgia de regeneração nervosa retrograda em comparação com a cirurgia de enxerto.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

O presente estudo trata de uma pesquisa experimental, randomizada e quantitativa. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Neurobiologia da Dor e da Inflamação – LANDI - pertencente ao Departamento de Ciências Fisiológicas.

4.1 ANIMAIS

Os experimentos foram realizados *in vivo*, com Ratos Wistar fêmeas que foram transportados do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC para o Biotério Setorial do CFS pelo menos 7 dias antes do início do tratamento.

Para a garantia do bem-estar animal, o alojamento foi mantido a temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$, com umidade relativa do ar de $50 \pm 10\%$ e em ciclo claro-escuro de 12:12h (luzes acesas às 7h). Os animais selecionados tinham aproximadamente 12 semanas de idade, com peso estimado entre 200 e 250 gramas, no início dos experimentos.

Os animais foram alojados em grupos de 4 por caixa (polipropileno, 49 x 34 x 21 cm) As caixas foram forradas com maravalha e disponibilizado ração (BioBase) e água filtrada (filtros Jojaco) livremente. Os animais foram manipulados apenas para limpeza das gaiolas e procedimentos experimentais.

4.1.2 TAMANHO DA AMOSTRA

Em razão da falta de estudos prévios desta natureza não foi possível determinar o tamanho do efeito e por consequência não utilizamos nenhum método de “power analysis”. Para o cálculo das amostras utilizamos o método chamado de “resource equation”. Neste método, o número de animais varia entre 10 e 20, baseados numa análise de variância. A fórmula gerada para cálculo da amostragem foi: $E = \text{número total de animais} - \text{número total de grupos}$. Planejamos um estudo de longo prazo e determinamos o número mais alto em função de possíveis perdas de animais durante o período de avaliação. Tivemos dois grupos experimentais com 20 animais cada, e um grupo controle que não realizou lesão do nervo ($n=10$). Considerando um incremento de 15%, após a aplicação da fórmula mencionada acima, o total de animais utilizados

foi de 54 ratos. A pata contralateral também foi utilizada como controle negativo. Isto para facilitar os estudos de avaliação comportamental. Em estudos prévios feito pelo grupo de pesquisa, determinou-se que o comprometimento bilateral das patas dos ratos não traz problemas na alimentação e ganho de peso (Bertelli et al, 1995; Bertelli et al, 2004).

4.2 APROVAÇÃO NA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)

Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA/UFSC) na reunião de 11/07/2023. protocolada sob o CEUA nº 6926240423. Todos os experimentos foram conduzidos de acordo com as diretrizes para o cuidado dos animais de laboratório e as normas éticas para investigação de dor experimental em animais conscientes (ZIMMERMANN, 1983), assim como as diretrizes para o cuidado dos animais de laboratório (COBEA). Todos os esforços foram feitos para minimizar o número de animais utilizados e seu sofrimento.

4.3 MÉTODOS ADOTADOS PARA MINIMIZAÇÃO DE ESTRESSE OU SOFRIMENTO ANIMAL

A saúde e o bem-estar dos animais foram avaliados em todos os dias de tratamento pelos experimentadores. Os pesquisadores avaliaram a dor espontânea dos animais por meio da Rat Grimace Scale (figura 4) e observaram se havia a piloereção acentuada com sinais de desidratação, ausência de interação (olhar), vocalização não provocada caracterizando angústia, secreção oculonasal intensa, dispnéia, tremor e convulsões persistentes, prostração prolongada (por mais de 1 hora) e automutilação. Além do comportamento, também foram avaliados parâmetros posturais dos animais. Se for observada dor ou qualquer um desses sinais, um veterinário seria consultado para determinar a exclusão dos animais de novas experiências. O peso de cada animal e o consumo alimentar da gaiola foram avaliados a cada 72 horas, para evitar que algum animal perdesse mais de 25% do seu peso anterior.

Figura 4 - categorias da escala grimace em ratos



National Centre
for the Replacement
Refinement & Reduction
of Animals in Research

Escala de Expressão Facial em Rato

Pesquisas têm demonstrado que alterações na expressão facial é um meio para a avaliação de dor em ratos.

A Escala de Expressão Facial em Rato foi elaborada utilizando unidades de ação específicas faciais mostradas abaixo. Essas unidades de ação aumentam na intensidade em resposta à dor pós-procedimento e podem ser usadas como parte da avaliação clínica.

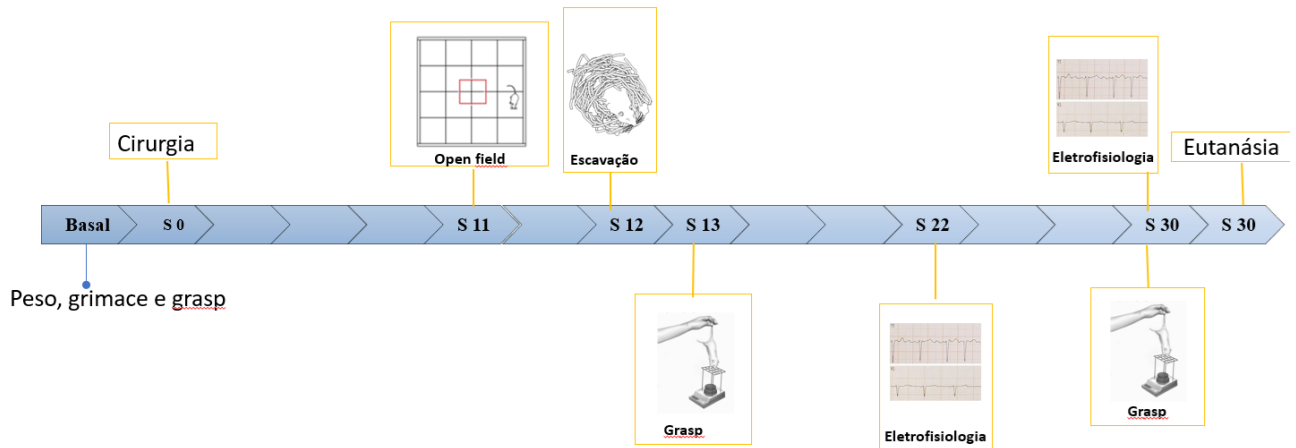
As unidades de ação devem ser usadas apenas em animais acordados. Cada animal deve ser observado por um período curto de tempo para evitar registrar alterações temporárias na expressão facial que não estejam relacionadas ao bem-estar animal.

	Unidades de ação		
	Ausente "0"	Moderadamente presente "1"	Obviamente presente "2"
Estreitamento orbital <ul style="list-style-type: none"> ▪ Fechamento palpebral (constricção da área orbital) ▪ Uma ruga pode ser visível ao redor do olho 			
Achatamento de nariz/bochecha <ul style="list-style-type: none"> ▪ Achatamento e alongamento da ponte nasal ▪ Achatamento das bochechas (com aparência afundada) 			
Alterações das orelhas <ul style="list-style-type: none"> ▪ Orelhas se curvam para dentro e são anguladas para a frente com uma forma pontiaguda ▪ Espaçamento maior entre as orelhas 			
Alteração na vibrissa <ul style="list-style-type: none"> ▪ Vibrissas enrijecem e angulam ao longo da face ▪ Vibrissas podem se aglomerar ▪ Vibrissas perdem sua curvatura natural "para baixo" 			

4.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Os experimentos foram realizados por 30 semanas e iniciados na semana zero, que foi quando realizada as cirurgias (figura 5). Na trigésima semana, todos animais foram eutanasiados com injeção intraventricular de cetamina.

Figura 5- Linha temporal dos testes



Legenda: Semana (S).

Fonte: Autor

4.5 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os animais foram divididos em quatro diferentes grupos, diferindo quanto o n amostral e o procedimento a ser realizado.

Grupo 1 – Animais não sofreram cirurgia nem anestesia (Grupo Naive) (n=5);

Grupo 2 – Animais foram anestesiados, a pele e o tecido muscular foram apenas mobilizados (Grupo Sham) (n=5);

Grupo 3 – Animais receberam cirurgia para reparação do defeito do nervo mediano direito por pivotamento do extremo distal (regeneração nervosa retrograda) (n=22);

Grupo 4 – Animais receberam cirurgia para reparação do defeito do nervo mediano direito por enxerto no nervo obtido do cabo distal do nervo mediano (n=22).

4.6 CIRURGIAS

A cirurgia foi realizada com o auxílio de um microscópio. Os animais foram anestesiados com xilazina (60%) e cetamina (40%), proporção 6:4, 0,5 ml/kg intraperitoneal conforme a figura 6 abaixo.

Figura 6 - Anestesia intraperitoneal



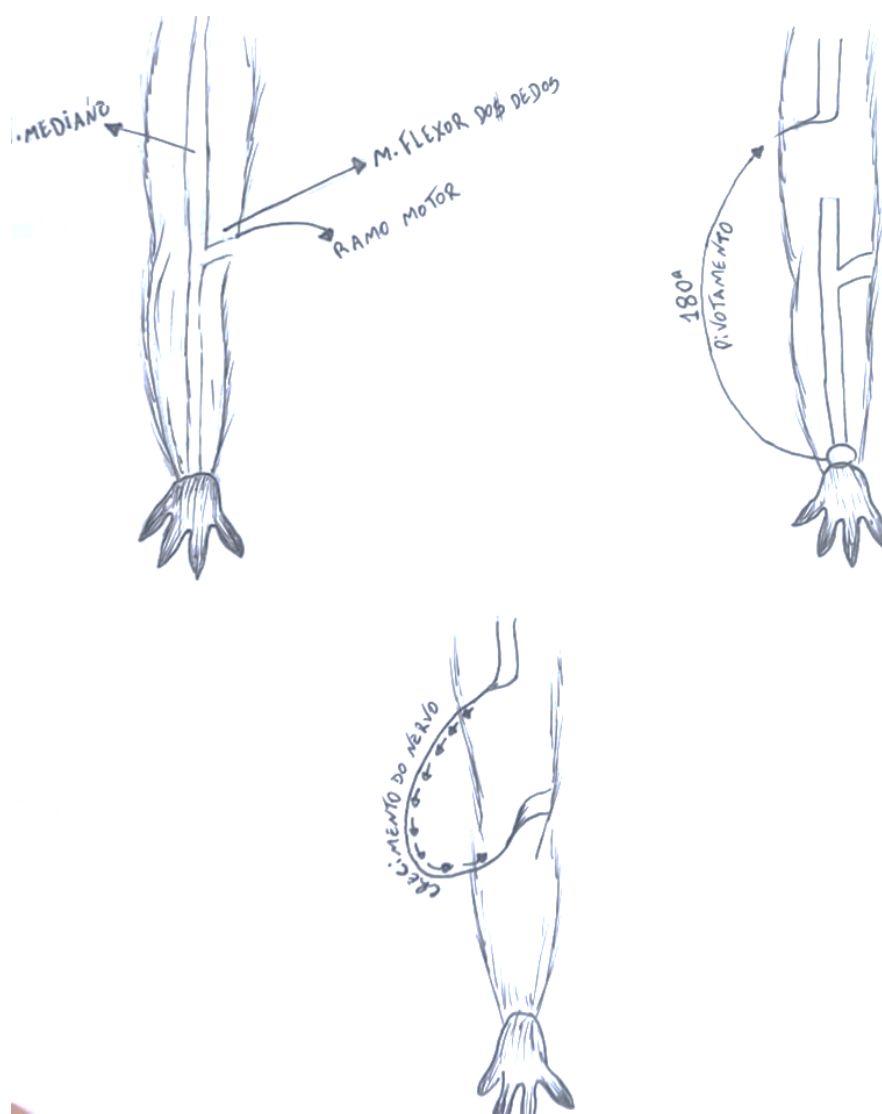
Fonte: Mind the graph

Após verificação do estado de consciência do animal, por meio de pinçamento da cauda e dobras interdigitais posteriores, foi realizada tricotomia e assepsia da pata direita utilizando iodo. A pele foi seccionada e os músculos afastados. Nos dois grupos (G3 e G4) o nervo mediano do membro direito foi seccionado no mesmo nível pois isto influencia na determinação do dia da recuperação funcional. No grupo G3, a cirurgia se baseou numa técnica em que ocorreu a secção (corte) do nervo mediano na porção mais distal do animal, e, posteriormente, inserida na porção que foi gerado o *gap* através de um tombamento (pivotamento) em 180 graus na região proximal ao *gap* (figura 7). Já no grupo 4, a cirurgia se baseou na inserção de uma porção distal do nervo mediano (aproximadamente 5 mm) no *gap* que foi gerado cirurgicamente (figura 8). Nos grupos 1, 2, 3 e 4 removemos também o nervo ulnar para evitar resultados falso positivo nos testes funcionais, já que o nervo ulnar pode inervar os flexores dos dedos. Na pata contralateral, 15 mm do nervo ulnar e mediano foram removidos na mesma intervenção. Todas as brechas realizadas através da remoção de segmentos nervosos foram de 15mm para impedir uma recuperação espontânea, o que acontece em brechas menores que 5mm. No grupo controle (G2), os animais foram anestesiados, a pele e o

tecido muscular mobilizados como os demais grupos, porém os nervos não serão seccionados.

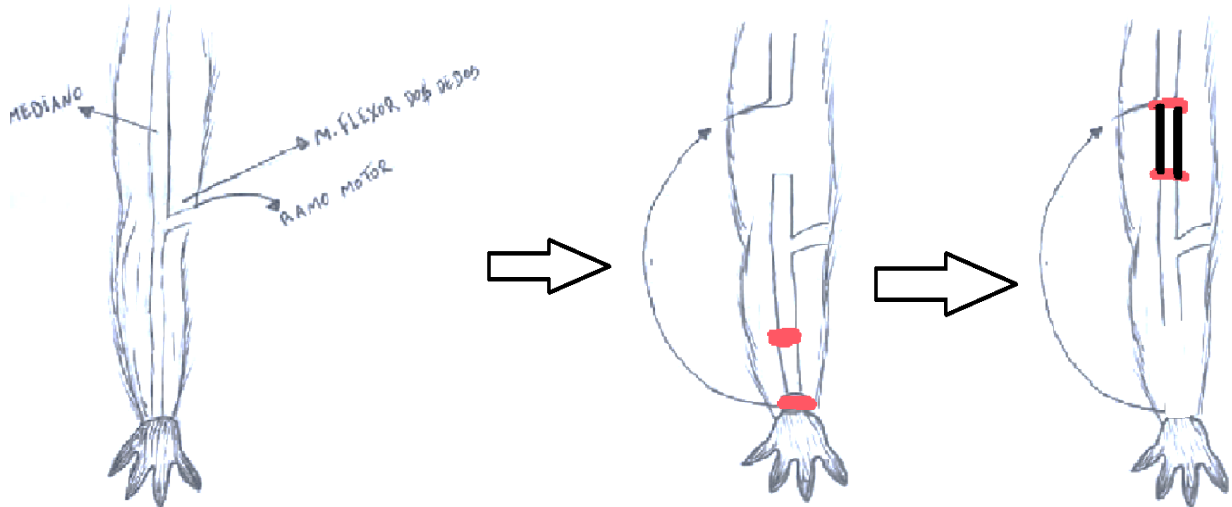
Os animais permaneceram acolhidos em caixas individuais no período pós operatório para evitar que os animais comecem a sutura uns dos outros ao acordar. Permaneceram sob aquecimento através de lâmpadas incandescentes (luz laranja de 100 w) para evitar hipotermia pós anestesia. Vale ressaltar que molhou-se pedaços de papel toalha com solução fisiológica e inseria-se nos olhos das ratas para evitar ressecamento dos mesmos. As ratas também recebiam hidratação até completa recuperação após a anestesia, posteriormente eram levadas para condicionamento nas caixas de alojamento.

Figura 7 – Cirurgia retrograda, grupo 3



Fonte: Imagem do autor

Figura 8 – Cirurgia de enxerto, grupo 4



Fonte: Imagem do autor

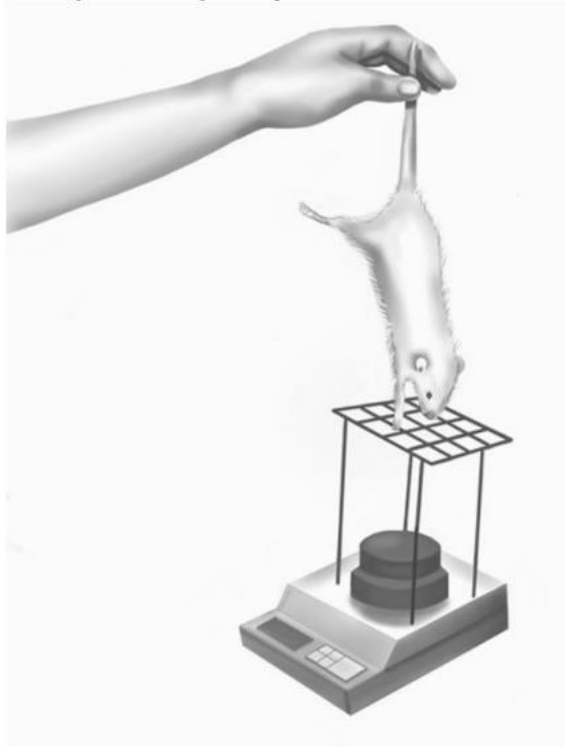
4.7 TESTES DE FORÇA E LOCOMOÇÃO

4.7.1 Grasp teste

Foi realizado pré operatório e após a cirurgia em semanas específicas (13^a e 30^a semana). Utilizou-se uma balança especialmente desenvolvida para o estudo, conforme a figura 9 abaixo.

Os ratos foram segurados pela cauda e, tão logo agarrem a grade, foram elevados firmemente até que a soltem, o valor da força de flexão das ratas é fornecido em gramas e foi anotado em uma folha e posteriormente tabulado. Estas avaliações nos forneceram dados sobre a qualidade da recuperação funcional. Foram feitas três repetições verticais em cada rato. O valor coletado para cada experimento feito no rato foi a média das três repetições (BERTELLI; MIRA, 1995).

Figura 9 - Balança digital



Fonte: Imagem do autor

4.7.2 Eletrofisiologia

O teste de eletromiografia foi realizado na 22^a e na 30^a semana após a cirurgia de reconstrução. Um total de 5 ratas do grupo sham, retrógrado e enxerto foram anestesiadas com xilazina (60%) e ketamina (40%), o nervo mediano reconstruído foi dissecado, seccionado e o extremo distal conectado a um estimulador de nervo Cidepe, Sao Paulo. O terceiro dedo foi conectado através de um fio de seda a um transdutor de força (PowerLab, Adinstruments, Australia). O transdutor de força foi conectado com um sistema de aquisição de dados (PowerLab, Adinstruments, Australia). Um estímulo supra maximal de 2v foi liberado pelo estimulador elétrico e a força produzida pela contração da flexão dos dedos foi avaliada. Logo, foi a reinervação muscular o nosso alvo de avaliação neste testes, semelhantemente ao o estudo de Manoli et al (2014).

4.7.3 Escavação

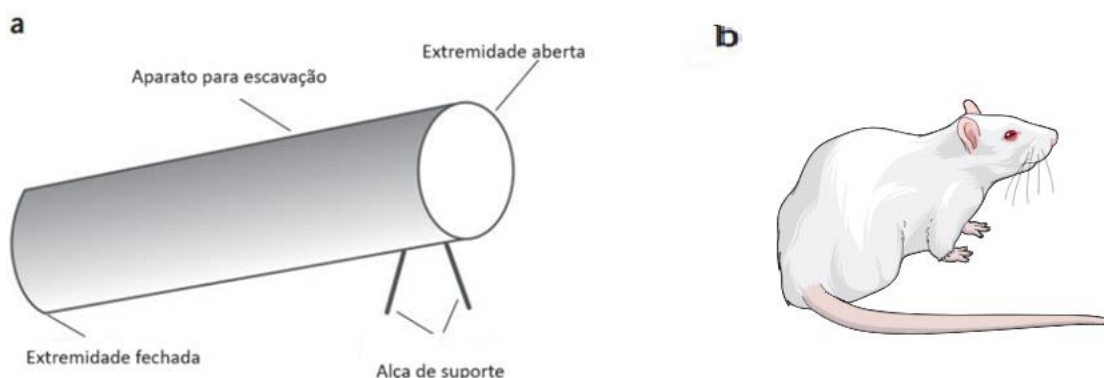
O teste de escavação ocorreu na 12^a semana. A escavação de túneis pode ser utilizada como marcador do funcionamento geral e da capacidade de trabalho dos animais (Andrews et al, 2012). Para tanto, foram utilizadas tocas feitas com tubos ocos de plástico (320 mm de comprimento x 100 mm de diâmetro) selados em uma extremidade e abertos na outra. A entrada aberta fica elevada aproximadamente 60 mm acima do solo para evitar a perda de cascalho ou maravalha quando a toca for colocada no chão da gaiola de teste.

O protocolo seguiu os procedimentos de Deacon (2006) com algumas modificações. Para o teste, os animais foram ambientados com a toca por 48h, que ficou dentro de sua gaiola moradia. No dia do teste, os animais foram separados em caixas moradias individuais, com uma fina camada de maravalha no solo (300 g). Dentro da caixa foi colocada a toca com a extremidade fechada contra a parede da gaiola e preenchida com 250 gramas de maravalha ou cascalho. A água e comida foram fornecidas normalmente.

O teste deve iniciar as 16 horas da tarde e dura por 2 horas (horário e tempo de maior sensibilidade do teste). Ao final, deve-se medir a quantidade de material deslocado da toca, definido como estando no chão da gaiola e não na toca, mensurando-se o peso do material deixado na toca.

Quando finalizar o teste se o animal estiver dentro da toca, ele não deve ser puxado manualmente para fora e sim suavemente inclinado para o prato da balança junto com o material, ser removido e levando para a gaiola. Isso tudo pode ser elucidado pela figura 10 abaixo.

Figura 10 - escavação



Legenda: Esquema para a realização do teste de escavação. A- Diagrama do túnel. B- imagem do animal.

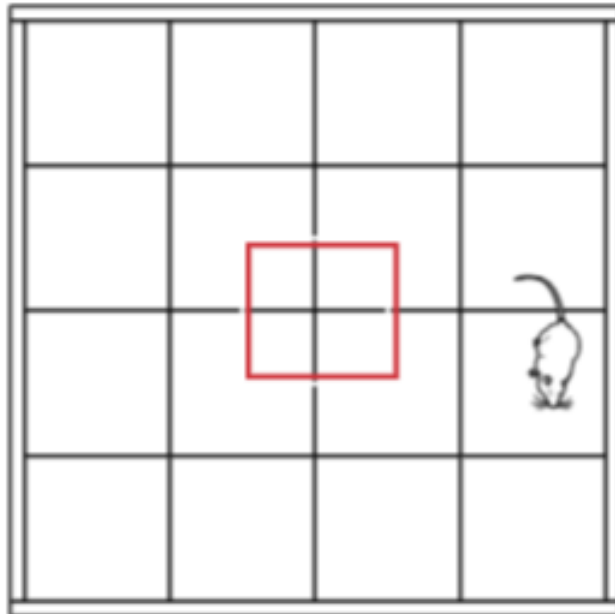
Figura adaptada e retirada de Deacon, 2006.

4.7.4 Avaliação da locomoção (campo aberto)

Os animais foram avaliados na 11^a semana por meio do teste de campo aberto, que consiste em um aparato com base retangular medindo 60x40x50 cm com 12 divisões marcadas no chão do aparato medindo 15x13,3 cm cada uma. O experimento foi realizado por um período de 5 minutos onde animal é observado pelo pesquisador por meio da parede frontal translúcida do aparato. Após cada análise experimental, o aparato foi totalmente limpo usando-se álcool 70°.

As atividades locomotora e exploratória foram avaliadas por meio do número de cruzamentos (crossing – número de vezes que o animal cruzou as linhas demarcadas no chão com as quatro patas).

Figura 11 – campo aberto



Fonte: Mind the graph

4.8 Análise estatística

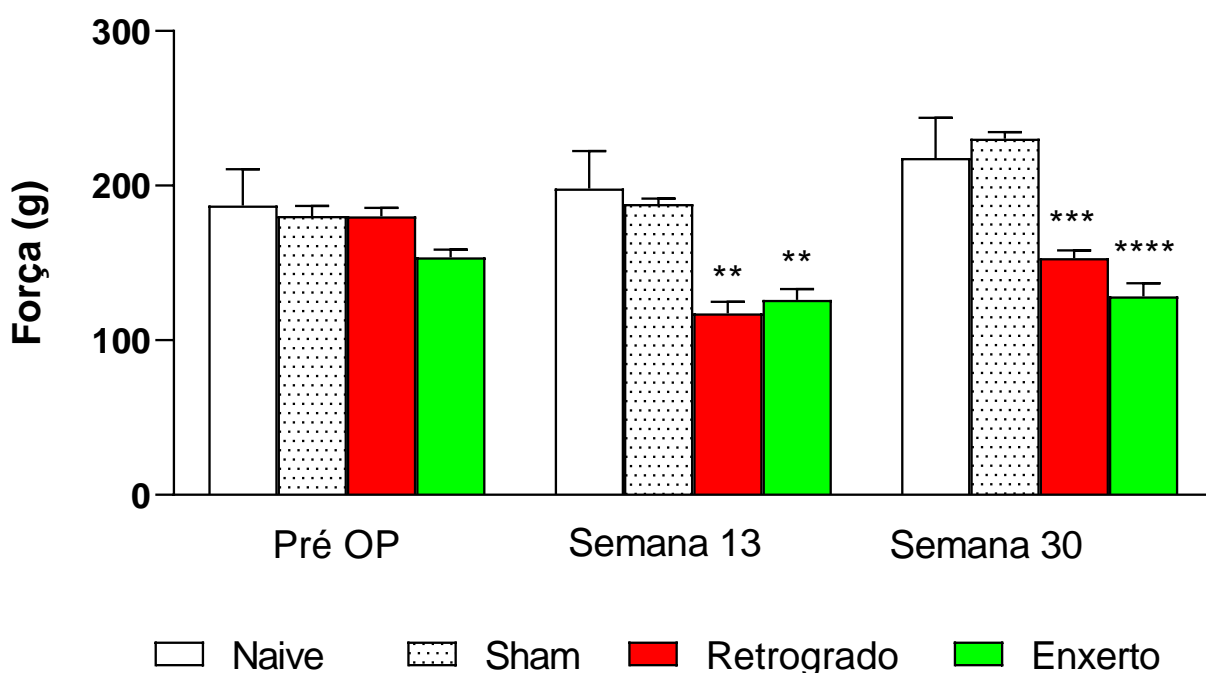
A análise estatística dos resultados foi realizada utilizando o software Graph Pad Prism version 6 (GraphPad Software®, San Diego, CA). Nos testes estatísticos que foram repetidos mais de uma vez, como o teste de preensão e o grip force, utilizamos a análise de variância (ANOVA) one-way, bem como para os testes que foram feitos uma única vez. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando o valor de p foi menor ou igual a 0.05. Após a realização da ANOVA (Análise de Variância) para comparar as médias entre os grupos, empregou-se o teste post hoc para identificar diferenças significativas entre os grupos específicos. Este teste foi conduzido utilizando o método de Tukey, que é amplamente reconhecido por sua capacidade de controlar o erro do tipo I ao realizar múltiplas comparações. A significância estatística foi estabelecida com um nível de confiança de 95%. O teste post hoc foi essencial para elucidar as diferenças específicas entre os grupos e fornecer uma compreensão mais aprofundada dos resultados obtidos na ANOVA.

5 RESULTADOS

5.1 GRASP TESTE

No teste de grip force, a ANOVA de uma via indicou diferenças significativas entre os grupos com $F=(11, 112) 12,76$; $p<0,0001$. O teste post hoc de tukey mostrou que não houve diferença estatística entre os grupos nos dados pré-operatórios; contudo identificou uma redução da força no grupos retrogrado ($p=0,0011$) e enxerto ($p=0,0050$), em relação ao grupo Sham na décima terceira, assim como trigésima semana, sendo o grupo retrogrado com $p=0,0003$ e o grupo enxerto com $p<0,0001$ (Figura 11). Não houve diferença entre os grupos Naive e Sham, assim como entre os grupos Enxerto e Retrogrado em nenhuma das avaliações. Esses dados demonstram que os animais dos grupos intervenção enxerto e retrógrado não recuperaram a força de preensão até a trigésima semana.

Figura 12 - Teste de *grasp*

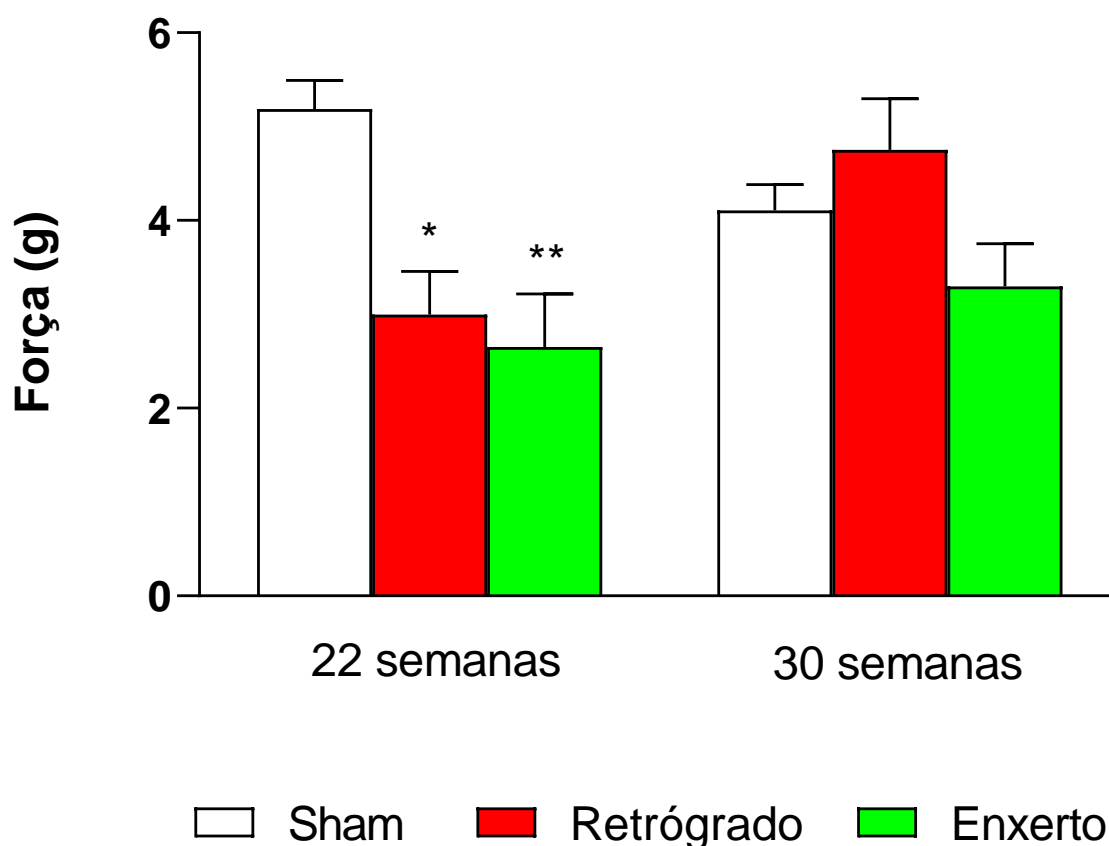


Legenda: Este painel indica a força de flexão dos dedos das ratas. Cada barra representa o número de 22 animais para o grupo retrógrado e enxerto, já o sham e o naive são 5 animais para cada e as linhas verticais indicam o erro padrão da média (E.P.M). O teste estatístico se deu por análise de variância de uma via (ANOVA) e teste post hoc de tukey. Os asteriscos (*) denotam a significância entre os grupos sham e retrógrado e sham e enxerto. ** $p<0,01$; *** $p<0,001$; **** $p<0,0001$. Pré operatório (Pré-OP). Vale ressaltar que os asteriscos se originam da comparação do grupo sham com os demais grupos (retrógrado e enxerto).

5.2 ELETROFISIOLOGIA

Na eletrofisiologia, a ANOVA de uma via indicou diferenças significativas entre os grupos com $F=(5, 54) 4,882$; $p= 0,0009$ (figura 12). O teste post hoc de tukey mostrou que houve diferença entre os grupos intervenção retrogrado ($p=0,0276$) e enxerto ($p=0,0034$), na comparação com o grupo sham na vigésima segunda semana, demonstrando prejuízo na reinervação muscular desses animais. Contudo, não houve diferença estatística entre os grupos na trigésima semana. Sendo assim, esses dados demonstram que os animais recuperaram a inervação muscular após a trigésima semana.

Figura 13 - Eletrofisiologia

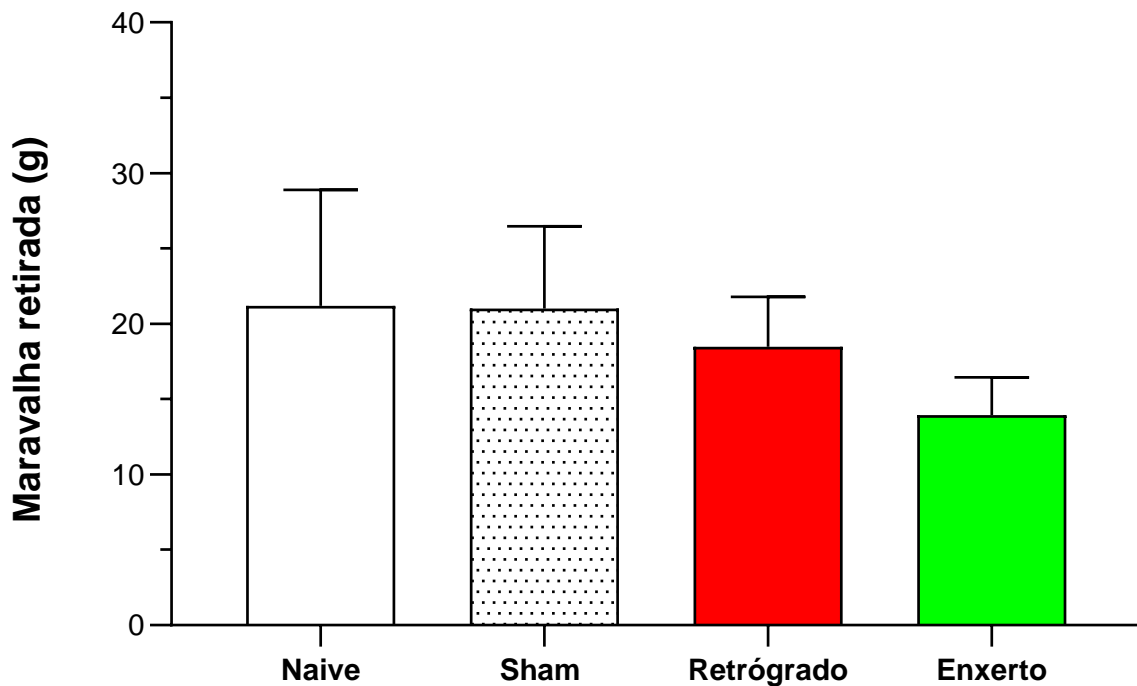


Legenda: Este painel demonstra o teste de eletrofisiologia. Cada barra representa o teste feito em 5 animais de cada grupo e as linhas verticais indicam o erro padrão da média (E.P.M). O teste estatístico se deu por análise de variância de uma via (ANOVA) e teste post hoc de tukey. Os asteriscos (*) denotam a significância entre os grupos sham e retrogrado e sham e enxerto. * $p<0,05$; ** $p<0,01$.

5.3 ESCAVAÇÃO

No teste de escavação, a ANOVA de uma via não indicou diferenças significativas entre os grupos com $F = (3, 44) 0,7927$; $p = 0,5045$ (figura 13).

Figura 14 – Escavação

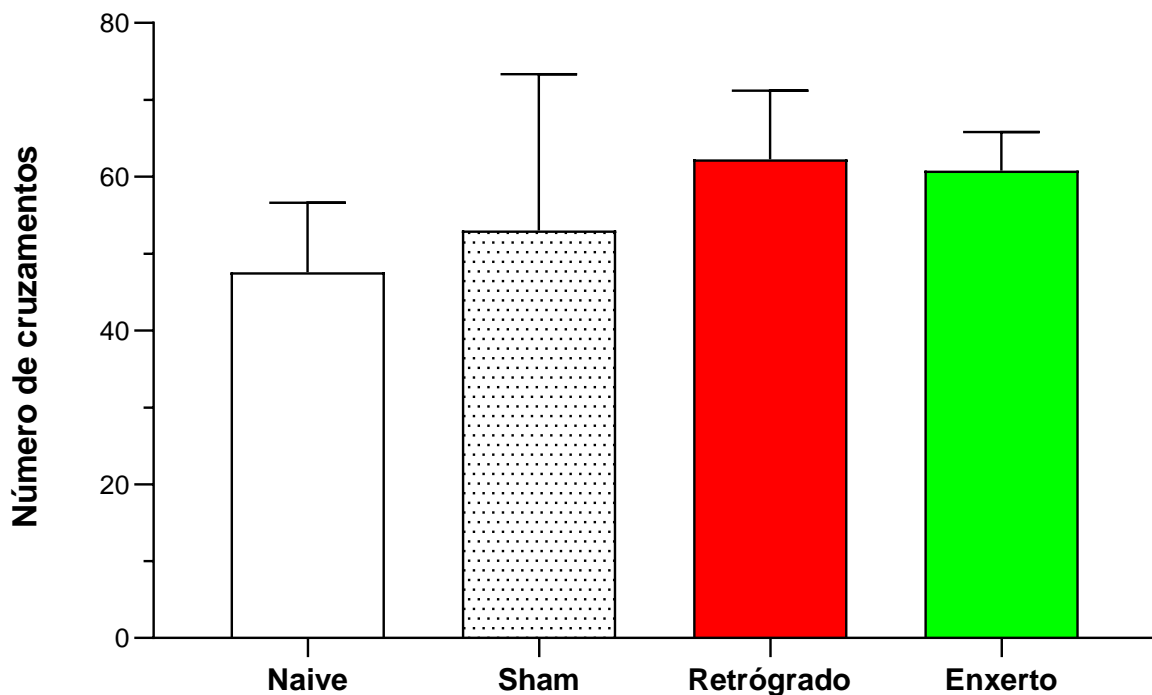


Legenda: Este painel indica a capacidade de escavação. Cada barra representa um total de 22 animais no grupo retrógado, 22 no grupo enxerto, 5 no grupo sham e 5 no grupo naive e as linhas verticais indicam o erro padrão da média (E.P.M.). O teste estatístico se deu por análise de variância de uma via (ANOVA).

5.4 AVALIAÇÃO DA LOCOMOÇÃO (CAMPO ABERTO)

No teste de campo aberto, a ANOVA de uma via não indicou diferenças significativas entre os grupos com $F(3, 46) = 0,3621$; $p = 0,7807$ (figura 14).

Figura 15 - Teste de campo aberto



Legenda: Este painel demonstra o teste open field. Cada barra representa um total de 22 animais no grupo retrógado, 22 no grupo enxerto, 5 no grupo naive e 5 no grupo sham e as linhas verticais indicam o erro padrão da média (E.P.M). O teste estatístico se deu por análise de variância de uma via (ANOVA).

6 DISCUSSÃO

A regeneração nervosa é um campo complexo e multifacetado, cujo estudo tem sido enriquecido por uma ampla gama de pesquisas. Este trabalho compilou uma lista de referências que abrangem desde os fundamentos da anatomia e fisiologia nervosa até os mais recentes avanços em neurobiologia e terapias regenerativas. A partir dessa compilação, é possível traçar uma visão abrangente das múltiplas facetas envolvidas na regeneração de nervos periféricos.

Este trabalho mostrou que a cirurgia retrógrada possui resultados semelhantes a cirurgia de enxerto, que é o padrão ouro. Visto que não houveram diferenças estatísticas entre os grupos intervenção.

O presente achado de *grasp* é semelhante ao estudo feito por Bertelli e Mira (1995). Visto que, neste estudo, os ratos que foram operados através de uma cirurgia do tipo ressecção (corte) na região do nervo mediano não conseguiram recuperar a flexão dos dedos. Semelhantemente ao presente achado, em que, após 30 semanas todos os animais operados no nervo mediano, não conseguiram recuperar a força de flexão dos dedos através do teste de *grasp*. Vale ressaltar que no trabalho feito por Bertelli e Mira (1995), os ratos que retornaram o movimento de flexão dos dedos sofreram a lesão do tipo esmagamento e não a do tipo ressecção. Os ratos da lesão do tipo esmagamento, retornaram o movimento dos dedos um pouco mais cedo, no oitavo dia pós operatório.

A cirurgia retrograda realizada no presente estudo junto com a de enxerto, demonstrou que os animais não recuperaram a força de flexão dos dedos. Esse achado se deve, principalmente, ao fato de que a lesão do tipo corte é a mais difícil de se regenerar, o que já foi elucidado por Sunderland 1951, em que o autor descreve que ao existir o rompimento total do nervo, cria-se um espaço que é muito difícil de se restabelecer a regeneração nervosa de maneira eficaz. Corroborando com o achado de que a força não foi restabelecida após a 30ª semana.

O presente achado de eletrofisiologia avaliou a reinervação muscular. No trabalho de Manoli et al (2014) os autores realizaram o teste de histomorfometria e eletrofisiologia em ratos submetidos a uma intervenção cirurgica numa lesão do tipo neurotme

(rompimento) no nervo mediano, os autores identificaram que houve uma recuperação funcional significativa nos animais operados, com uma correlação positiva entre a velocidade de condução neuromuscular e o número total de fibras nervosas, bem como entre a amplitude do potencial de ação muscular composto e o número total de fibras nervosas. Corroborando com o presente trabalho em que os animais, ao sofrerem a cirurgia retrograda acabaram por recuperar a reinervação muscular no teste de eletrofisiologia. Os animais do presente trabalho recuperaram a reinervação muscular, e isso se deve ao tipo de procedimento cirurgico que foi feito em ambos os grupos intervenção, demonstrando que ambas as cirurgias, retrograda e de enxerto, foram bem feitas e que a restauração da inervação muscular foi completa.

No achado do teste de escavação, não houve diferença estatística entre os grupos retrógrado e enxerto, quando comparados com o sham, o que está semelhante com o achado no estudo de Jirkof et al (2012), em que os ratos que foram submetidos a cirurgia retiravam bem menos pellets de dentro da toca do que os ratos que não foram operados. Vale ressaltar que neste mesmo estudo, os ratos foram testados na primeira semana pós cirurgia. Isso indica que houve uma diminuição do comportamento de escavação no grupo que foi submetido a cirurgia, sugerindo um potencial indicador de dor ou de redução do bem-estar nesses animais. Pode-se dizer que o resultado do presente achado se deve ao dia em que foi feito o teste de escavação, já que foi feita na 12^a semana pós cirurgia, gerando um intervalo de tempo grande para que ocorresse a recuperação da pata operada e conseqüentemente uma diminuição da dor para escavar.

No presente trabalho, o teste de campo aberto (locomoção) pós cirurgica indica que não houve diferença estatística entre os grupos retrógrado e enxerto. No trabalho de Ruhl, Christer, Rhode e Beier (2023), os autores também não identificaram diferença estatística pós cirurgia no teste de locomoção nos grupos que sofreram cirurgia do nervo ciático. Vale ressaltar que o autor realizou o teste de campo aberto na 5^a semana pós cirurgia. Esses achados, corroboram para que, pós cirurgia, o comportamento locomotor e exploratório dos animais não tenha diferença estatística, ou seja, não há diferença entre o grupo controle e o grupo intervenção. Pode-se dizer que o presente achado, não indicou diferença estatística quanto ao número de cruzamentos pois o teste foi feito na 11^a semana pós cirurgia, cujo os animais recuperaram a mobilidade da pata operada e ao mesmo tempo ocorreu uma diminuição da dor pós cirurgica devido ao longo intervalo de tempo de recuperação que as

ratas tiveram até o momento em que foi realizado este teste.

Estudos futuros devem investigar os efeitos a longo prazo das intervenções terapêuticas na função sensorial e motora, bem como na qualidade de vida dos animais. Além disso, é importante explorar ainda mais os mecanismos moleculares subjacentes aos efeitos observados, a fim de desenvolver intervenções terapêuticas mais direcionadas e eficazes (SONG et al, 2015). Ademais, pode-se em estudos futuros, optar por escolher um fármaco que auxilie na regeneração nervosa e inserí-lo no grupo intervenção e avaliar como se deu a regeneração nervosa, se foi mais eficaz, se melhorou a força, se reinervou mais ou até mesmo se auxiliou na capacidade locomotora e exploratória dos animais.

7 CONCLUSÕES

Este estudo demonstrou que a cirurgia retrógrada possui resultados similares, quando comparado com a cirurgia de enxerto. Contudo, faz-se necessário mais estudos, a fim de avaliar a reprodutibilidade desses dados e mais análises.

REFERÊNCIAS

AITKEN, J. T. The effect of peripheral connexions on the maturation of regenerating nerve fibres. **Journal of Anatomy**, v. 83, n. Pt 1, p. 32, 1949.

ANDREWS, Nick et al. Spontaneous burrowing behaviour in the rat is reduced by peripheral nerve injury or inflammation associated pain. **European journal of pain**, v. 16, n. 4, p. 485-495, 2012.

ANTON, E. S., Weskamp, G., Reichard, L. F., et al. (1994). Nerve growth factor and its low-affinity receptor promote Schwann cell migration. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 91(7), 2795-2799.

AUBÁ, Cristina et al. Peripheral nerve regeneration through allografts compared with autografts in FK506-treated monkeys. **Journal of neurosurgery**, v. 105, n. 4, p. 602-609, 2006.

BAIN, Jerald. The many faces of testosterone. **Clinical interventions in aging**, v. 2, n. 4, p. 567-576, 2007.

BARNETT, Samuel Anthony. The Story of Rats. Their impact on us, and our impact on them. **(No Title)**, 2001.

BAKER, D. J. et al. Clearance of p16Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders. **Nature**, v. 479, p. 232–236, 2011.

BERTELLI, J. A.; MIRA, J. C. The grasping test: a simple behavioral method for objective quantitative assessment of peripheral nerve regeneration in the rat. **Journal of neuroscience methods**, v. 58, n. 1-2, p. 151-155, 1995.

BERTELLI, Jayme A.; GHIZONI, Marcos F. Results and current approach for brachialplexus reconstruction. **Journal of brachial plexus and peripheral nerve injury**, v. 6, n. 01, p. e54-e61, 2011.

BERDOY, Manuel. **The laboratory rat: a natural history**. RAT LIFE, 2002.

Bertelli, J.A., Ghizoni, M.F., & others. (2006). Concepts of nerve regeneration and repair applied to brachial plexus reconstruction. **Microsurgery**, 26(4), 230–244. DOI: 10.1002/micr.20234

BERTELLI, Jayme A.; ROSA, Isadora Carvalho Nunes; GHIZONI, Marcos F. Retrograde peripheral nerve regeneration from sensory to motor pathways in rats: a new experimental concept in nerve repair. **Neurological Research**, p. 1-7, 2023.

BERTELLI, Jayme Augusto; GHIZONI, Marcos Flávio. Concepts of nerve regeneration and repair applied to brachial plexus reconstruction. **Microsurgery: Official Journal of the International Microsurgical Society and the European Federation of Societies for Microsurgery**, v. 26, n. 4, p. 230-244, 2006.

BHATT, Neel K. et al. Compound motor action potential duration and latency are markers of recurrent laryngeal nerve injury. **The Laryngoscope**, v. 127, n. 8, p. 1855-1860, 2017.

Boyd, J. G., & Gordon, T. (2003). Glial cell line-derived neurotrophic factor and brain-derived neurotrophic factor sustain the axonal regeneration of chronically axotomized motor neurons in vivo. **Experimental Neurology**, 183(2), 610-619.

CAMPSI J, d’Adda di Fagagna F. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007;8:729–740.

CHEN Z-L, Strickland S. Laminin gamma1 is critical for Schwann cell differentiation, axon myelination, and regeneration in the peripheral nerve. **Journal of Cell Biology**. 2007;163(4):889-899

CHO, Álvaro Baik et al. Epidemiological study of traumatic brachial plexus injuries. **Acta Ortopédica Brasileira**, v. 28, p. 16-18, 2020.

CORDER, Gregory et al. Loss of μ opioid receptor signaling in nociceptors, but not microglia, abrogates morphine tolerance without disrupting analgesia. **Nature medicine**, v. 23, n. 2, p. 164-173, 2017.

CUNHA C, Panseri S, Antonini S. Emerging nanotechnology approaches in tissue engineering for peripheral nerve regeneration. **Nanomedicine**. 2020;24:102145.

DANIEL, Fajardo-Barajas; BIANCA, Gutiérrez-Amavizca. Peripheral retrograde nerve regeneration after sciatic nerve injury in a rat model: a new concept in peripheral nerve surgery. **Journal of Universal Surgery**, v. 4, n. 4, p. 62, 2016.

DIXON, WI J. Efficient analysis of experimental observations. **Annual review of pharmacology and toxicology**, v. 20, n. 1, p. 441-462, 1980.

DUBOVÝ, P., Jančálek, R., & Kubek, T. (2013). Role of inflammation and cytokines in peripheral nerve regeneration. **International Review of Neurobiology**, 108, 173–206.

Parte superior do formulário

DEACON, Robert MJ. Burrowing in rodents: a sensitive method for detecting behavioral dysfunction. **Nature protocols**, v. 1, n. 1, p. 118-121, 2006.

DUBOVÝ, P., Jančálek, R., & Kubek, T. (2013). Role of inflammation and cytokines in peripheral nerve regeneration. **Int Rev Neurobiol**, 108, 173–206.

Fok-Seang J, Smith A, Tidball P, et al. Regeneration of axons in the nervous system of adult mammals. **Revista de Neurologia**. 1998;25(2):76-81.

FRANCESCHI, Claudio; CAMPISI, Judith. Chronic inflammation (inflammaging) and its potential contribution to age-associated diseases. **Journals of Gerontology Series A: Biomedical Sciences and Medical Sciences**, v. 69, n. Suppl_1, p. S4-S9, 2014.

GALTREY, Clare M.; FAWCETT, James W. Characterization of tests of functional recovery after median and ulnar nerve injury and repair in the rat forelimb. **Journal of the Peripheral Nervous System**, v. 12, n. 1, p. 11-27, 2007.

GOMEZ-SANCHEZ JA, Gomis-Coloma C, Morenilla-Palao C, et al. Epigenetic induction of the Ink4a/Arf locus prevents Schwann cell overproliferation during nerve regeneration and after tumorigenic challenge. **Stem Cell Reports**. 2015;5(1):33-42.

GORDON T. The role of neurotrophic factors in nerve regeneration. **Neurosurgery**. 2009;65(4 Suppl):N10-19.

GRABOWSKI, Tortora. Tortora Grabowski. Principles of anatomy and physiology. Ninth edition, publishing company Artmed, 2000.

GRÖNHOLDT-KLEIN, Max et al. Muscle atrophy and regeneration associated with behavioural loss and recovery of function after sciatic nerve crush. **Acta Physiologica**, v. 227, n. 3, p. e13335, 2019.

GHIZONI, Marcos Flávio et al. The anabolic steroid nandrolone enhances motor and sensory functional recovery in rat median nerve repair with long interpositional nerve grafts. **Neurorehabilitation and Neural Repair**, v. 27, n. 3, p. 269-276, 2013.

IYER SS, He Q, Janczy JR, et al. Mitochondrial cardiolipin is required for Nlrp3 inflammasome activation. **Immunity**. 2013;39:311–323.

JESSEN, K.R., Mirsky, R., & Lloyd, A.C. (2015). Schwann cells: development and role in nerve repair. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, 7(7), a020487. DOI: 10.1101/cshperspect.a020487

JIRKOF, Paulin et al. Burrowing behavior as an indicator of post-laparotomy pain in mice. **Frontiers in behavioral neuroscience**, v. 4, p. 165, 2010.

JOHNSON, Elizabeth O. et al. Neuroanatomy of the brachial plexus: normal and variant anatomy of its formation. **Surgical and radiologic anatomy**, v. 32, p. 291-297, 2010.

KEMP, S. W., Alant, J., Walsh, S. K., et al. (2010). Behavioural and anatomical analysis of selective tibial nerve branch transfer to the deep peroneal nerve in the rat. **European Journal of Neuroscience**, 31(6), 1074–1090.

KONOFAOS, P.; VER HALEN, J. P. Nerve repair by means of tubulization: past, present, future. **Journal of reconstructive microsurgery**, v. 29, n. 03, p. 149-164, 2013.

KONOFAOS, P.; VER HALEN, J. P. Nerve repair by means of tubulization: past, present, future. **Journal of reconstructive microsurgery**, v. 29, n. 03, p. 149-164, 2013.

LEE, A. C., Yu, V. M., Lowe, J. B. III, et al. (2003). Controlled release of nerve growth factor enhances sciatic nerve regeneration. **Experimental Neurology**, 184(1), 295-303.

LEIS, A. A., Lancon, J. A., & Stokic, D. S. (2003). Retrograde regeneration following neurotmesis of the ulnar nerve. **Muscle & Nerve**, 28(4), 512–514.

LIANG, Yu-Xiang et al. CNS regeneration after chronic injury using a self-assembled nanomaterial and MEMRI for real-time in vivo monitoring. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 7, n. 3, p. 351-359, 2011.

LIU, Xiaoyu; DUAN, Xuchu. Mechanisms and Treatments of Peripheral Nerve Injury. **Annals of Plastic Surgery**, v. 91, n. 2, p. 313-318, 2023.

MAGGI, Sergio P.; LOWE, James B.; MACKINNON, Susan E. Pathophysiology of nerve injury. **Clinics in plastic surgery**, v. 30, n. 2, p. 109-126, 2003.

MANOLI, Theodora et al. Correlation analysis of histomorphometry and motor neurography in the median nerve rat model. **Eplasty**, v. 14, 2014.

MEEKER, M.L., & Farel, P.B. (1993). Coincidence of Schwann cell-derived basal lamina development and loss of regenerative specificity of spinal motoneurons. **J Comp Neurol**, 329(2), 257–268. DOI: 10.1002/cne.903290207

METZ, Gerlinde A.; WHISHAW, Ian Q. The ladder rung walking task: a scoring system and its practical application. **JoVE (Journal of Visualized Experiments)**, n. 28, p. e1204, 2009.

MIZUSHIMA, N., Levine, B., Cuervo, A. M., & Klionsky, D. J. (2008). Autophagy fights disease through cellular self-digestion. **Nature**, 451(7182), 1069–1075.

OLIVIERI, Fabiola et al. Cellular senescence and inflammaging in age-related diseases. **Mediators of Inflammation**, v. 2018, 2018.

OSTERLOH, J. M., Yang, J., Rooney, T. M., Fox, A. N., Adalbert, R., Powell, E. H., ... & Coleman, M. P. (2012). dSarm/Sarm1 is required for activation of an injury-induced axon death pathway. **Science**, 337(6093), 481–484.

OVALLE JR, Fernando et al. A simple technique for augmentation of axonal ingrowth into chondroitinase-treated acellular nerve grafts using nerve growth factor. **Annals of plastic surgery**, v. 68, n. 5, p. 518-524, 2012.

PERRY, V. H. et al. Evidence that the rate of Wallerian degeneration is controlled by a single autosomal dominant gene. **European Journal of Neuroscience**, v. 2, n. 5, p. 408-413, 1990.

RAY, W. Z., Chang, J., Hawasli, A., et al. (2016). Motor nerve transfers: a comprehensive review. **Neurosurgery**, 78(1), 1–26.

RISLING, M., Sörbye, K., & Cullheim, S. (1992). Aberrant regeneration of motor axons into the pia mater after ventral root neuroma formation. **Brain Res**, 570(1–2), 27–34. DOI: 10.1016/0006-8993(92)90559-R

RIBEIRO, Tatianne et al. Blockade of ATP P2X7 receptor enhances ischiatic nerve regeneration in mice following a crush injury. **Brain Research**, v. 1669, p. 69-78, 2017.

ROBINSON, Lawrence R. Traumatic injury to peripheral nerves. **Supplements to clinical neurophysiology**, v. 57, p. 173-186, 2004.

RONCHI, Giulia et al. The median nerve injury model in pre-clinical research—a critical review on benefits and limitations. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 13, p. 288, 2019.

RUHL, Tim et al. Time course of functional recovery after 1 cm sciatic nerve resection in rats with or without surgical intervention—measured by grip strength and locomotor activity. **Neuroscience Research**, v. 190, p. 78-84, 2023.

SASAGURI, Hiroki et al. APP mouse models for Alzheimer's disease preclinical studies. **The EMBO journal**, v. 36, n. 17, p. 2473-2487, 2017.

SCADDING, J. W.; THOMAS, P. K. Retrograde growth of myelinated fibres in experimental neuromas. **Journal of Anatomy**, v. 136, n. Pt 4, p. 793, 1983.

Skaper, S. D. (2001). Nerve growth factor: a neurokine orchestrating neuroimmune-endocrine functions. **Molecular Neurobiology**, 24(2-3), 183-199.

SCHEIB, Jami; HÖKE, Ahmet. Advances in peripheral nerve regeneration. **Nature Reviews Neurology**, v. 9, n. 12, p. 668-676, 2013.

SEBBEN, Alessandra Deise; LICHTENFELS, Martina; SILVA, Jefferson Luis Braga da. Regeneração de nervos periféricos: terapia celular e fatores neurotróficos. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v. 46, p. 643-649, 2011.

SILVEIRA, Patricia P. et al. The effect of neonatal handling on adult feeding behavior is not an anxiety-like behavior. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 23, n. 1, p. 93-99, 2005.

SOFRONIEW, M. V., Howe, C. L., & Mobley, W. C. (2001). Nerve growth factor signaling, neuroprotection, and neural repair. **Annual Review of Neuroscience**, 24, 1217-1281.

SONG, Yuanquan et al. Regulation of axon regeneration by the RNA repair and splicing pathway. **Nature neuroscience**, v. 18, n. 6, p. 817-825, 2015.

STANISZ, Greg J. et al. MR properties of rat sciatic nerve following trauma. **Magnetic Resonance in Medicine: An Official Journal of the International Society for Magnetic Resonance in Medicine**, v. 45, n. 3, p. 415-420, 2001.

SUNDERLAND, Sydney. A classification of peripheral nerve injuries producing loss of function. **Brain**, v. 74, n. 4, p. 491-516, 1951

THOMSON, Suzanne E. et al. Bioengineered nerve conduits and wraps for peripheral nerve

repair of the upper limb. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, n. 12, 2022.

THORSÉN, Frida et al. Digital nerve injuries: epidemiology, results, costs, and impact on daily life. **Journal of plastic surgery and hand surgery**, v. 46, n. 3-4, p. 184-190, 2012.

Vargas, M. E., & Barres, B. A. (2007). Why is Wallerian degeneration in the CNS so slow? **Annual Review of Neuroscience**, 30, 153–179.

WAHL, F. et al. Neurological and behavioral outcomes of focal cerebral ischemia in rats. **Stroke**, v. 23, n. 2, p. 267-272, 1992.

Wang, Q. J., Ding, Y., Kohtz, S., Mizushima, N., Cristea, I. M., Rout, M. P., & Chait, B. T. (2006). Induction of autophagy in axonal dystrophy and degeneration. **Journal of Neuroscience**, 26(31), 8057–8068.

WEINZWEIG, Norman; SHARZER, Leonard A.; STARKER, Isaac. Replantation and revascularization at the transmetacarpal level: long-term functional results. **The Journal of hand surgery**, v. 21, n. 5, p. 877-883, 1996.

XU, Jun; BRENNAN, Timothy J. Guarding pain and spontaneous activity of nociceptors after skin versus skin plus deep tissue incision. **The Journal of the American Society of Anesthesiologists**, v. 112, n. 1, p. 153-164, 2010.

YANG, Y., Coleman, M., Zhang, L., Zheng, X., & Yue, Z. (2013). Autophagy in axonal and dendritic degeneration. **Trends in Neurosciences**, 36(7), 418–428.

ZIMMERMANN, Manfred. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. **Pain**, v. 16, n. 2, p. 109-110, 1983.

ZHANG, Kai; JIANG, Mingsheng; FANG, Yanshan. The drama of Wallerian degeneration: the cast, crew, and script. **Annual review of genetics**, v. 55, p. 93-113, 2021.

ZHANG Q, Raoof M, Chen Y, et al. Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury. **Nature**. 2010;464:104–107.

ZUO, J., Neubauer, D., Graham, J., et al. (2001). Axonal regeneration into acellular nerve grafts is enhanced by degradation of chondroitin sulfate proteoglycan. **Journal of Neuroscience**, 21(15), 6206-6213.

ANEXO

Anexo A: Certificado de aprovação pelo Comitê de Ética no Uso de Animais



Universidade Federal de Santa Catarina
*Comissão de Ética no
Uso de Animais*

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Modelo de regeneração nervosa retrograda em ratos.", protocolada sob o CEUA nº 6926240423 (ID 002456), sob a responsabilidade de **Morgana Duarte da Silva e equipe; Marcos Lisboa Neves; Jayme Bertelli; Pedro André Hermes Amaral; Anaré Luís Espindola Junior** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA/UFSC) na reunião de 11/07/2023.

We certify that the proposal "Model of retrograde nerve regeneration in rats.", utilizing 54 Heterogenics rats (54 females), protocol number CEUA 6926240423 (ID 002456), under the responsibility of **Morgana Duarte da Silva and team; Marcos Lisboa Neves; Jayme Bertelli; Pedro André Hermes Amaral; André Luís Espindola Junior** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **APPROVED** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Santa Catarina (CEUA/UFSC) in the meeting of 07/11/2023.

Finalidade da Proposta: Pesquisa

Vigência da Proposta: de 05/2023 a 12/2024 Área: Ciências Fisiológicas

Origem: Biotério Central

Espécie: Ratos heterogênicos

Linhagem: Wistar

sexo: Fêmeas

Idade: 11 a 12 semanas Quantidade: 54

Peso: 200 a 250 g

Florianópolis, 11 de julho de 2023

Luciana Aparecida Honorato
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Catarina

Vanessa Rafaella Foletto da Silva
Vice-Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Catarina

