

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

**DESENVOLVIMENTO E APLICAÇÃO DE  
COPOLÍMERO ABSORVÍVEL  
COMO CÂMARA DE REGENERAÇÃO DE  
NERVO PERIFÉRICO EM RATOS**

**ALESSANDRA DEISE SEBEN**

**PORTO ALEGRE**

**2014**

**ALESSANDRA DEISE SEBEN**

**DESENVOLVIMENTO E APLICAÇÃO DE COPOLÍMERO ABSORVÍVEL  
COMO CÂMARA DE REGENERAÇÃO DE NERVO PERIFÉRICO EM  
RATOS**

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

**Orientador**

**Prof. Dr. Jefferson Luís Braga da Silva**

**PORTO ALEGRE**

**2014**

## Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

S443d Sebben, Alessandra Deise

Desenvolvimento e aplicação de copolímero absorvível como câmara de regeneração de nervo periférico em ratos / Alessandra Deise Sebben. – Porto Alegre, 2014.

110 f. : il. Graf. Tab.

Tese (Doutorado em Medicina e Ciências da Saúde) – Faculdade de Medicina, PUCRS.

Orientador: Prof. Dr. Jefferson Luís Braga da Silva.

1. Fatores de Crescimento Neural. 2. Materiais Biocompatíveis.  
3. Proteínas de Ligação a Tacrolimo. 4. Regeneração Nervosa.  
5. Modelos Animais. I. Silva, Jefferson Luís Braga da. II. Título.

CDD 612.81  
NLM WL 102

**Ficha Catalográfica elaborada por  
Vanessa Pinent  
CRB 10/1297**

ALESSANDRA DEISE SEBBEN

**DESENVOLVIMENTO E APLICAÇÃO DE COPOLÍMERO ABSORVÍVEL  
COMO CÂMARA DE REGENERAÇÃO DE NERVO PERIFÉRICO EM  
RATOS**

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

Aprovada em 27 de fevereiro de 2014.

**BANCA EXAMINADORA:**

Prof. Dr. Alexandre Padoin

Prof. Dr. Eduardo Carvalhal

Prof. Dr. Gustavo Carvalhal

Prof. Dr. Lucas Colomé

PORTO ALEGRE

2014

*“Eu, porém, ouvi dizer que o sábio que sabe do mistério da vida, durante a sua peregrinação terrestre, não teme rinocerontes nem tigres, e passa no meio de exércitos em luta, sem armas nem armadura.”*

*Lao Tsé*

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador **Professor Dr. Jefferson Luís Braga da Silva**, pela orientação neste trabalho.

À **Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul**, especialmente ao **Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde**, pela oportunidade de realizar o curso de Doutorado e pela infraestrutura.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)**, pela bolsa concedida e pelo incentivo à pesquisa.

À equipe do **Laboratório de Habilidades Médicas e Pesquisa Cirúrgica da PUCRS**, especialmente ao **Gilmar Moreira e Lucas Mano**.

À equipe do **Laboratório de Materiais e Nanociências da PUCRS** sob coordenação do **Professor Dr. Roberto Hübler**, pela colaboração a esta pesquisa na confecção das membranas e tubos.

Ao **Prof. Dr. Vinícius Duval da Silva**, por conceder as dependências do **Laboratório de Anatomia Patológica do Hospital São Lucas da PUCRS** para a realização dos procedimentos histológicos e por compartilhar seu conhecimento científico.

Ao **Tiago Giuliani**, técnico em histologia, pelo apoio nos procedimentos histológicos.

Ao **Daniel Marinowic**, pela amizade e pelo auxílio no experimento celular, e cuja colaboração foi imprescindível na construção deste trabalho; e à **Professora Dra. Denise Cantarelli**, por disponibilizar o **Laboratório de Biologia Celular e Molecular da PUCRS** na execução desta etapa do trabalho.

Ao **Professor Dr. Paulo Márcio Condessa Pitrez**, por colocar à disposição as dependências do **Instituto de Pesquisas Biomédicas da PUCRS**.

Aos acadêmicos **Aline Mondardo, Ana Paula Schmitt, Bruna Martins, Fernanda Cocolichio, Gabriel Souza, Guilherme Braga da Silva, Guilherme Tres, Marco Azeredo, Mariana Curra e Paloma Viegas**, pelo interesse por esta pesquisa e pelo auxílio na execução deste trabalho.

À acadêmica de Medicina da PUCRS **Samanta Gehardt**, pela dedicação a esta pesquisa e pela amizade.

Aos amigos **Lucas Colomé, Martina Lichtenfels e Eduardo Goldani**, que me auxiliaram em muitos momentos nestes quatro anos de trabalho.

Ao meu esposo **Nicolas Eugênio Mascarello**, pela paciência, por aceitar minha ausência, por me incentivar e por sempre acreditar em mim. Te amo!

À minha mãe **Maria Gouveia Sebben**, que me ensinou a sempre buscar a excelência e a amar o que se faz. Ao meu pai **José Antonio Sebben** (*in memoriam*), que está sempre na minha memória e no meu coração me guiando.

Aos meus irmãos **Daniela, Luciana, Antonio e Bruna**, por confiarem na minha capacidade e pelas constantes palavras de apoio.

À **família Mascarello**, pelo apoio e carinho diários.

A **todos amigos e colegas** que, de alguma forma, colaboraram para a realização desta pesquisa.

## RESUMO

**Introdução:** Lesões em nervos periféricos resultam na perda de função do órgão inervado e raramente apresentam recuperação sem a intervenção cirúrgica. Uma das formas de reparo é a técnica de tubulização, através da qual é possível acrescentar fatores com capacidade regenerativa. Nesse contexto, biomateriais e fatores neurotróficos são indicados como uma alternativa terapêutica para reconstrução de nervos periféricos.

**Objetivo:** Desenvolver tubo nanotexturizado absorvível composto por poli (ácido láctico-co-ácido glicólico), e avaliar seu efeito sem e com incorporação de tacrolimus sobre a regeneração de nervo periférico em ratos.

**Materiais e Métodos:** Foram confeccionados tubos nanotexturizados absorvíveis de PLGA com e sem incorporação de tacrolimus, que foram caracterizados *in vitro* e *in vivo* quanto à biocompatibilidade, biodegradação e eficácia como técnica de tubulização. O experimento *in vivo*, no qual foram utilizados 88 ratos, ocorreu em 2 etapas: os copolímeros sem e com incorporação de tacrolimus foram implantados em 63 animais para avaliar a biocompatibilidade; um defeito de 10mm no nervo ciático foi criado nos 25 animais restantes, os quais foram divididos em três grupos conforme o tratamento: enxerto autólogo (5), tubulização com tubo PLGA (10) e tubulização com tubo PLGA e tacrolimus (10). Foram realizados Teste de Marcha e análise histomorfométrica. **Resultados:** As membranas de PLGA, contendo ou não tacrolimus, diferiram do controle negativo nos ensaios de viabilidade celular *in vitro* ( $p=0,000$ ); a membrana contendo tacrolimus foi significativamente melhor, independentemente do tempo, quando comparada à membrana sem o fármaco ( $p=0,026$ ). Na avaliação da biocompatibilidade *in vivo*, o tecido circunjacente aos implantes de PLGA apresentaram inflamação aguda, que foi decrescendo ao longo dos 90 dias de avaliação. Em 7 dias após os implantes serem inseridos, evidenciou-se menor deposição de colágeno nos dois biomateriais quando comparado aos demais períodos ( $p \leq 0,020$ ). O tubo de PLGA sem tacrolimus teve média menor em relação à espessura da bainha de mielina comparado ao enxerto autólogo e ao tubo contendo tacrolimus nos segmentos proximal, medial e distal ( $p < 0,05$ ). Na avaliação funcional da recuperação do nervo ciático de ratos, o grupo de PLGA sem tacrolimus diferiu significativamente do grupo enxerto autólogo (em 90 dias |  $p= 0,0021$ ), com menores

índices de função ciática. **Conclusão:** o presente estudo sugere que a combinação de PLGA e tacrolimus favoreceu a regeneração de nervo ciático de rato, e esta poderá ser uma potente alternativa para aplicação clínica em lesões de nervos periféricos.

**Palavras-chave:** Fatores neurotróficos. Biomateriais. FK506. Reparo nervoso. Modelo Animal.

## ABSTRACT

**Introduction:** Peripheral nerve injury results in functional loss in the innervated organ, and recovery without surgical intervention is rare. Many surgical techniques can be used for nerve repair. Among these, the tubulization technique can be highlighted: this allows regenerative factors to be introduced into the chamber. Biomaterials and neurotrophic factors are indicated as a therapeutic alternative for reconstruction of peripheral nerves.

**Objective:** To develop a nanotextured absorbable tube of poly(lactic-co-glycolic acid), and to evaluate its effect with and without tacrolimus on peripheral nerve regeneration in rats.

**Materials and Methods:** Nanotextured absorbable PLGA tubes and films with and without incorporation of tacrolimus are developed, which were characterized *in vitro* and *in vivo* biocompatibility, biodegradability and effectiveness as technical tubing were fabricated. The *in vivo* experiment in which 88 rats were used, occurred in two stages: the copolymers with and without tacrolimus were implanted in 63 animals to evaluate the biocompatibility; a defect of 10mm sciatic nerve was created in the remaining 25 animals were divided into three groups according to treatment: autograft (5), tubulization with PLGA (10), tubulization with PLGA and tacrolimus (10). Walking Track and histomorphometric analyses were performed.

**Results:** Nanotextured PLGA films, containing tacrolimus or not, differ from the negative control cell viability *in vitro* assays ( $p=0.000$ ). The film containing tacrolimus was significantly improved, regardless of the time, when compared to the film without the drug ( $p=0.026$ ). *In vivo* biocompatibility evaluation demonstrated a surrounding tissue to PLGA implants with acute inflammation, which was decreasing the long 90 days evaluation. It was evident less collagen deposition in both biomaterials,  $p \leq 0.020$  seven days after the implants were inserted. The PLGA tube without tacrolimus had smaller average response to the thickness of the myelin sheath compared to autograft and the tube containing tacrolimus in proximal, medial and distal segments ( $p<0.05$ ). In functional assessment of the recovery of the sciatic nerve in rats, the group of PLGA without tacrolimus significantly differed from the 90 days autograft group ( $p= 0.0020$ ).

**Conclusion:** The present study suggests that the combination of tacrolimus and PLGA promoted the regeneration of rat sciatic nerves, and this can be a powerful alternative to clinical use in peripheral nerve injuries.

**Keywords:** Neurotrophic factors. Biomaterials. FK506. Nerve repair. Animal Model.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> - Esquema representativo da estrutura da fibra nervosa.....	24
<b>Figura 2</b> - Membranas de PLGA (Esquerda: membrana superficialmente porosa; Direita: membrana nanotexturizada). Imagens obtidas através de microscopia eletrônica de varredura. ....	36
<b>Figura 3</b> - Microfotografia do tubo de PLGA.....	38
<b>Figura 4</b> - Distribuição dos animais utilizados no experimento <i>in vivo</i> .....	43
<b>Figura 5</b> - Técnica cirúrgica para implantação do PLGA no dorso dos ratos.....	45
<b>Figura 6</b> - Reparo de nervo ciático através da técnica de tubulização com tubo de PLGA poroso nanotexturizado.....	46
<b>Figura 7</b> - Esquema da pegada do rato (pata normal A e pata com lesão B), com as medidas nos coxins plantares adotadas para o cálculo do IFC: IT (2° ao 4° dedo), TS (1° ao 5° dedo) e PL (calcanhar até 3° dedo). Fonte: Reis et al., 2009.....	50
<b>Figura 8</b> - Secções transversais do segmento do nervo operado e das regiões proximal e distal ao defeito.....	51
<b>Figura 9</b> - Citotoxicidade dos biomateriais sobre as células NIH 3T3 obtidas com o ensaio MTT em 1, 2, 7, 14 e 30 dias. Dados representam as médias $\pm$ DP (n=4).....	54
<b>Figura 10</b> - Imagens com coloração fluorescente DAPI. Observa-se uma proliferação maior de células NIH 3T3 sobre as membranas M2 e M3. Aumento de 20X. ....	55
<b>Figura 11</b> - Perda de massa dos tubos de PLGA em até 90 dias. A= 150 $\mu$ m; B= 300 $\mu$ m; C= 450 $\mu$ m; D= 600 $\mu$ m. Letras iguais não diferem estatisticamente. ....	56
<b>Figura 12</b> - Perda de espessura (%) em 14, 30, 60 e 90 dias de degradação hidrolítica (incubação em PBS. *p = 0,000).....	57
<b>Figura 13</b> - Alterações no PBS removido da incubação dos tubos semanalmente.....	58

<b>Figura 14</b> - Percentual de perda de massa molar em diferentes períodos de degradação (14, 30, 60 e 90 dias).....	<b>59</b>
<b>Figura 15</b> - Liberação de tacrolimus <i>in vitro</i> após 1, 7, 14, 30, 60 e 90 dias de degradação em PBS .....	<b>60</b>
<b>Figura 16</b> - Tubo de PLGA poroso nanotexturizado com espessura de 150 $\mu$ após 90 dias de incubação em solução PBS.....	<b>61</b>
<b>Figura 17</b> - Tubos de PLGA poroso nanotexturizado com 4 espessuras diferentes após 90 dias de degradação em PBS. Imagens obtidas por MEV. Aumento 50X .....	<b>62</b>
<b>Figura 18</b> Imagens de MEV, demonstrado a erosão na superfície do copolímero causada pela degradação. Aumento 1000X. ....	<b>63</b>
<b>Figura 19</b> Microfotografia por MEV da superfície do copolímero PLGA nanotexturizado. Na imagem observa-se poros em escalas micrométricas. ....	<b>63</b>
<b>Figura 20</b> - Microfotografias do tecido subcutâneo de ratos que receberam implantes de PLGA poroso nanotexturizado (T1) em diferentes períodos (7, 14, 21, 30 e 90 dias pós-cirúrgicos). Aumento 100X. I – implante; M – Camada muscular.....	<b>65</b>
<b>Figura 21</b> - Microfotografias do tecido subcutâneo de ratos que receberam implantes de PLGA e tacrolimus poroso nanotexturizado (T2) em diferentes períodos (7, 14, 21, 30 e 90 dias pós-cirúrgicos). Aumento 100X. I – implante; M – Camada muscular. ....	<b>66</b>
<b>Figura 22</b> - Área de colágeno presente no tecido circunjacente ao copolímero PLGA. T1: PLGA poroso nanotexturizado; T2: PLGA poroso nanotexturizado com tacrolimus.....	<b>67</b>
<b>Figura 23</b> - Microfotografias polarizadas de tecido subcutâneo de ratos, circunjacente aos implantes de PLGA (T1 – imagem da esquerda e T2 – imagem da direita), representando a área de colágeno. Coloração Picro Sirius Red. Aumento 100X.....	<b>67</b>

<b>Figura 24</b> - Índice de Função Ciática (IFC) avaliado nos grupos AE – enxerto autólogo; T1 – tubo poroso nanotexturizado de PLGA; T2 – tubo poroso nanotexturizado de PLGA e Tacrolimus.....	<b>69</b>
<b>Figura 25</b> - Diâmetro da fibra nervosa após o período de 90 dias pós-cirúrgico.....	<b>72</b>
<b>Figura 26</b> - Espessura da bainha de mielina após o período de 90 dias pós-cirúrgico .....	<b>72</b>
<b>Figura 27</b> - Número de axônios mielinizados após o período de 90 dias pós-cirúrgico .....	<b>73</b>
<b>Figura 28</b> - Segmentos distais dos grupos EA (A), grupo T1 (B) e grupo T2 (C), com coloração azul de toluidina. Aumento de 1000X. Observa-se bainhas de mielina mais espessas no grupo A e B em relação grupo C.....	<b>73</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b>	Proliferação das células NIH 3T3 sobre as membranas de diferentes superfícies de PLGA .....	<b>54</b>
<b>Tabela 2.</b>	Índice de Função Ciática (IFC). Os grupos estão representados por médias e desvios-padrão. ....	<b>69</b>

## LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS

<b>C</b>	Carbono
<b>Ca</b>	Cálcio
<b>Cl</b>	Cloro
<b>DP</b>	Desvio-padrão
<b>g</b>	gramas
<b>h</b>	Hora
<b>H</b>	Hidrogênio
<b>IL-1</b>	Interleucina 1
<b>IL-2</b>	Interleucina 2
<b>IL-6</b>	Interleucina 6
<b>IL-8</b>	Interleucina 8
<b>Kg</b>	Quilograma
<b>kV</b>	Quilovolts
<b>mg</b>	Miligramas
<b>mL</b>	Mililitro
<b>mm</b>	Milímetro
<b>µg</b>	Micrograma
<b>µm</b>	Micrômetro
<b>Na</b>	Sódio
<b>ng</b>	Nanograma
<b>O</b>	Oxigênio
<b>PLGA</b>	Poli (ácido láctico-co-glicólico)
<b>pH</b>	Potencial hidrogeniônico
<b>rpm</b>	Rotação por minuto

%	Por cento
°C	Graus Celsius
®	Marca Registrada
>	Maior
≥	Maior ou igual
<	Menor
≤	Menor ou igual
±	Mais ou menos

# SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>20</b>
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO</b>	<b>22</b>
2.1. Anatomia e Histofisiologia do Sistema Nervoso Periférico	22
2.2. Lesões em nervos periféricos	25
2.3. Reparo de lesões em nervos periféricos	27
2.4. Tacrolimus	28
2.5. Biomateriais	30
2.5.1. Poli (ácido láctico-co-glicólico)	32
<b>3 OBJETIVOS</b>	<b>34</b>
3.1. Objetivo geral	34
3.2. Objetivos específicos	34
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>35</b>
4.1. Delineamento experimental	35
4.2. Desenvolvimento de tubos e membranas de PLGA	35
4.2.1. Membranas	35
4.2.2. Tubos	37
4.3. Caracterização das membranas e tubos de PLGA <i>in vitro</i>	38
4.3.1. Experimento celular – Biocompatibilidade	38
4.3.2. Avaliação da biodegradação <i>in vitro</i>	40
4.3.3. Liberação do tacrolimus	41
4.3.4. Caracterização morfológica	42
4.4. Experimentos <i>in vivo</i>	42
4.4.1. Animais e grupos de experimentação	42
4.4.2. Procedimentos anestésicos	44
4.4.3. Procedimentos cirúrgicos	44

4.4.4. Biocompatibilidade <i>in vivo</i> .....	44
4.4.5. Viabilidade do tubo de PLGA na regeneração de nervo periférico .....	45
4.4.6. Modelos experimentais .....	45
4.5. Pós-operatório .....	47
4.6. Eutanásia .....	47
4.7. Avaliação dos resultados – experimento <i>in vivo</i> .....	47
4.7.1. Avaliação da biocompatibilidade <i>in vivo</i> .....	47
4.7.2. Confeção das lâminas histológicas .....	48
4.7.3. Avaliação Qualitativa .....	48
4.7.4. Avaliação Quantitativa – Histomorfometria .....	48
4.8. Viabilidade do tubo de PLGA na regeneração de nervo .....	49
4.8.1. Testes funcionais .....	49
4.8.2. Histomorfometria do nervo .....	50
<b>5 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....</b>	<b>52</b>
<b>6 ASPECTOS BIOÉTICOS .....</b>	<b>52</b>
<b>7 RESULTADOS .....</b>	<b>53</b>
7.1. Caracterização das membranas e tubos de PLGA <i>in vitro</i> .....	53
7.1.1. Avaliação do experimento celular – Biocompatibilidade .....	53
7.1.2. Avaliação da biodegradação <i>in vitro</i> .....	55
7.1.3. Avaliação da biocompatibilidade <i>in vivo</i> .....	64
7.1.3.1. Resultados clínicos e cirúrgicos .....	64
7.1.3.2. Avaliação através da coloração H&E .....	64
7.1.3.3. Histomorfometria – Picro Sirius Red .....	66
7.2. Viabilidade dos tubos sobre a regeneração nervosa .....	68
7.2.1. Resultados clínicos e cirúrgicos .....	68
7.2.2. Resultados clínicos e cirúrgicos .....	68
7.2.3. Avaliação Histomorfométrica .....	69

<b>8 DISCUSSÃO</b> .....	<b>74</b>
<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>81</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>83</b>
<b>ANEXO A</b> .....	<b>93</b>
<b>ANEXO B</b> .....	<b>107</b>
<b>ANEXO C</b> .....	<b>108</b>
<b>ANEXO D</b> .....	<b>109</b>
<b>ANEXO E</b> .....	<b>110</b>

# 1 INTRODUÇÃO

Lesões em nervos periféricos são frequentes na prática clínica e causam consequências graves como dor e morbidade, além de outras sequelas muitas vezes permanentes. Dentre os danos que diminuem a qualidade de vida de pessoas que por eles são acometidas, estão incluídas a incapacitação física e a perda total ou parcial de suas atividades produtivas, o que origina importantes consequências socioeconômicas.<sup>(1)</sup> Além do altíssimo custo social gerado pelo aumento nas despesas da saúde pública e previdenciária, é importante ressaltar o impacto que lesões com essa dimensão são capazes de provocar sobre o indivíduo, seus familiares e na sociedade como um todo.

As lesões completas, com perda de substância, raramente apresentam recuperação sem intervenção cirúrgica e as técnicas atuais de reparação oferecem resultados frequentemente insatisfatórios. Frente a essas limitações, muitos pesquisadores buscam alternativas terapêuticas eficazes, como a combinação e aplicação de biomateriais e fatores neurotróficos, com a finalidade de otimizar o reparo de nervos periféricos danificados.<sup>(2)</sup>

Dentre os materiais bioabsorvíveis mais testados está o poli (ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA), um copolímero com características biocompatíveis e biodegradáveis<sup>(3)</sup>, aprovado pelo *Food and Drug Administration* (FDA).<sup>(4)</sup> É um material lentamente reabsorvido pelo organismo e, se possuir microporosidades, tem a sua permeabilidade a nutrientes aumentada.<sup>(5)</sup> Existem estudos que demonstraram que o tratamento de poliésteres, como o PLGA, com hidróxido de sódio (NaOH) permite que as ligações ésteres do biomaterial sejam hidrolisadas e sua superfície se torne mais hidrófila, o que favorece a adsorção de proteínas hidrofílicas.<sup>(6-8)</sup> PLGA tratados e nanotexturizados com NaOH também têm sua área de superfície e porosidades aumentadas, criando mais sítios de adesão usados pelas células para se ancorarem junto ao copolímero.<sup>(7, 8)</sup>

Estas características fornecem ao PLGA melhores condições para ser utilizado na criação de câmaras de regeneração de nervo periférico. Além disso, é importante potencializar seu efeito incorporando fatores neurotróficos e neuroprotetores. O tacrolimus é um imunossupressor aprovado pelo FDA que apresenta efeitos positivos

sobre o reparo de nervos periféricos. Sua administração sistêmica aliada a tubos ou enxertos tem se mostrado eficaz. Entretanto, existem reações adversas neste tipo de aplicação, tais como nefrotoxicidade e hipertensão. A liberação local de tacrolimus durante o processo de regeneração do nervo é indicada para uma aplicação segura e mais eficiente do fármaco, buscando minimizar seus efeitos colaterais.<sup>(9, 10)</sup>

Estudos que demonstrem os efeitos de tacrolimus incorporado a biomateriais absorvíveis são raros. Tubos artificiais bioabsorvíveis, que possuam características que permitam-lhe a combinação com fármacos ou fatores neurotróficos é a incessante busca de pesquisadores e cirurgiões para o tratamento de lesão nervosa periférica. PLGA e tacrolimus demonstram atender a estas expectativas, sendo uma combinação que poderá fornecer benefícios no reparo nervoso.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Anatomia e Histofisiologia do Sistema Nervoso Periférico

O sistema nervoso é anatomicamente dividido em sistema nervoso central (SNC), composto pelo encéfalo e a medula espinhal, e sistema nervoso periférico (SNP), o qual compreende os nervos cranianos, que nascem no encéfalo, os nervos espinhais, que nascem na medula espinhal, e os gânglios associados a eles.<sup>(11)</sup> O SNP estabelece uma via de comunicação entre o SNC e os órgãos; as informações sensitivas são transmitidas da periferia para o SNC (via aferente), e os sinais de motricidade percorrem o sentido contrário (via eferente); o componente motor subdivide-se, ainda, em sistema nervoso somático - os impulsos originados no SNC são diretamente transmitidos aos órgãos efetores - e sistema nervoso autônomo, nos quais os impulsos são, inicialmente, transferidos para um gânglio autônomo através de um neurônio, e um segundo neurônio localizado no gânglio transmite as informações para os órgãos periféricos.<sup>(11)</sup>

Os nervos do sistema nervoso periférico são formados por axônios, células não neuronais e componentes da matriz extracelular (MEC). O axônio, também denominado fibra nervosa, é um prolongamento do corpo celular, capaz de transportar informações químicas e elétricas a longas distâncias. São classificados como mielínicos ou amielínicos; os axônios mielínicos são envoltos por uma estrutura tubular com múltiplas camadas (bainha de mielina) originadas pelas células de Schwann (SC). Os axônios amielínicos, embora a bainha de mielina esteja ausente, também estão associados às SC.<sup>(12)</sup>

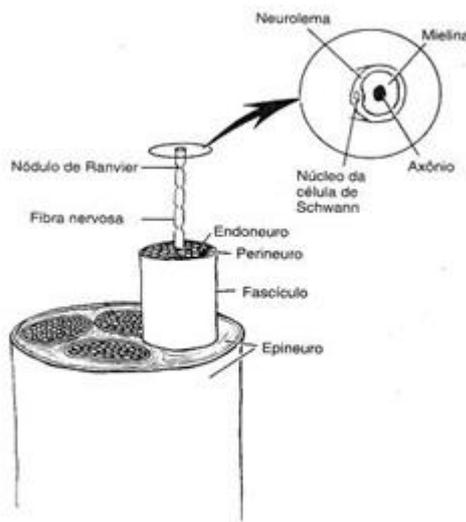
Células de Schwann, principais constituintes do SNP, são originadas na crista neural, possuem morfologia achatada e núcleo alongado. Sua principal função é a mielinização dos axônios,<sup>(13)</sup> e estão posicionadas ao longo dos axônios separadas entre si por intervalos destituídos de mielina, parcialmente cobertos por digitações laterais do seu citoplasma e denominados nodos de Ranvier. Essa estrutura é rica em canais de ions de sódio ( $\text{Na}^+$ ), que dão origem à condução saltatória característica dos axônios mielinizados. A bainha de mielina é formada pela diferenciação da membrana plasmática da própria SC; possui como característica estrutural a alta concentração lipídica e poucas proteínas, o que lhe permite proteger e isolar a fibra nervosa,

acelerando a propagação dos potenciais de ação dos neurônios ao órgão alvo.<sup>(14)</sup> Os axônios amielínicos estabelecem ligações com as SC por meio de projeções citoplasmáticas que os envolvem total ou parcialmente, sendo agrupados em números que variam de 5 a 25 axônios.<sup>(15)</sup> Após uma lesão nervosa, as SC adquirem características proliferativas e fagocíticas, tornando-se vitais no processo de degeneração dos axônios (degeneração Walleriana). Em nervos denervados, essas células alinham-se longitudinalmente formando colunas conhecidas como “bandas de Büngner”, constituindo uma lâmina basal que induz e auxilia o crescimento axonal com o auxílio de fatores neurotróficos. Além da importante função estrutural, atuando como condutores físicos no direcionamento do crescimento axonal, essas células também servem de interface entre os axônios e a MEC, sintetizando elementos como proteoglicanas, colágenos e fatores neurotróficos.<sup>(16-18)</sup>

As fibras nervosas classificam-se em quatro categorias – I, II, III e IV - conforme seu diâmetro, estrutura e velocidade de condução do impulso nervoso. Fibras do tipo I, ou A $\alpha$ , possuem maior diâmetro (12 - 22  $\mu$ m), velocidade de condução rápida (72 - 130 m/s) e são fortemente mielinizadas; elas incluem as fibras motoras somáticas e grandes fibras aferentes proprioceptivas. Fibras do tipo II (A $\beta$ ) também possuem grande diâmetro (6 - 18  $\mu$ m), velocidade de condução rápida (35 - 108 m/s) e fortemente mielinizadas. Em sua maioria detectam estímulos suaves e não dolorosos aplicados na pele (pressão), músculos e articulações, contribuindo para a propriocepção sem responder diretamente a estímulos nociceptivos. O grupo III, que corresponde às fibras A $\delta$ , com diâmetro menor (3 - 7  $\mu$ m), velocidade de condução moderada (3 - 30 m/s) e fracamente mielinizadas, estão associadas à nocicepção, termoccepção e quimiorrecepção. E as fibras que pertencem ao grupo IV – tipo C - são amielínicas, apresentam menor diâmetro (0,25 – 1,35  $\mu$ m), velocidade de condução lenta (0,2 - 2,0 m/s) e incluem fibras autônomas pós-ganglionares e fibras termosensitivas; também fornecem ao SNC informações nociceptivas, termocéptivas e de quimiorrecepção. Nas fibras amielinizadas o potencial de ação é mais lento, pois o estímulo é transmitido de forma contínua ao longo da fibra.<sup>(19-22)</sup>

Fibras nervosas são circundadas por três camadas de tecido conjuntivo. A camada mais externa, formada por tecido conjuntivo colagenoso denso não modelo, é denominada como **epineuro** e possui vasos, fibroblastos e fibras de colágeno tipo I. A camada média – **perineuro** - apresenta células pavimentosas dispostas em camadas

concêntricas em relação às fibras nervosas, podendo ser observada a presença de fibras de colágeno tipo I e III. O perineuro cobre individualmente cada feixe de fibra nervosa (fascículos) e é essencial na manutenção da homeostase do nervo, atuando como uma barreira seletiva ao trânsito de substâncias com alto peso molecular. A camada mais interna de tecido conjuntivo, que reveste individualmente cada fibra nervosa (axônios), é chamada de **endoneuro** e é composta por fibras de colágeno tipo III dispostas longitudinalmente em relação à fibra nervosa. No endoneuro, é possível encontrar células residentes como macrófagos, fibroblastos e eventualmente mastócitos.<sup>(11, 23, 24)</sup> A estrutura microscópica das fibras nervosas pode ser visualizada na Figura 1.



**FIGURA 1.** Esquema representativo da estrutura da fibra nervosa.

Fonte: Shores A., 1996.<sup>(16)</sup>

Como componentes da MEC estão o colágeno, fibronectina e laminina, fundamentais para a orientação e crescimento axonal durante o processo de regeneração nervosa, que ocorre do coto proximal em direção ao coto distal.<sup>(13)</sup>

Dentre os nervos periféricos, o nervo ciático que se destaca por seu grande diâmetro e patologias comuns associadas a ele. Constituído por fibras da L4, L5, S1, S2 e S3, atravessa o grande forâmen isquiático até a região posterior da coxa, percorrendo por trás do fêmur por toda sua extensão. É um nervo misto (sensitivo e motor) que se ramifica em dois segmentos na altura do terço femoral distal: nervo tibial e fibular.<sup>(25)</sup> Lesão nessa localização acomete os músculos bíceps femoral,

semitendinoso e semimembranoso, levando à perda da sensibilidade na região lateral abaixo do joelho.<sup>(26)</sup>

## 2.2 Lesões em nervos periféricos

Traumas em nervos periféricos são comuns na prática clínica e geram sequelas graves que podem levar à incapacitação parcial ou total dos indivíduos acometidos pela lesão. Os nervos periféricos são responsáveis pela motricidade e sensibilidade dos membros superiores e inferiores, portanto lesões nervosas geralmente resultam em dor, morbidade e podem gerar distúrbios sensoriais e perda funcional, com consequências sociais e econômicas importantes.<sup>(1)</sup>

Estima-se que lesões desta natureza acometam anualmente aproximadamente 3% dos pacientes que sofrem algum tipo de trauma no mundo todo. Existem duas classificações para as lesões em nervos periféricos: a classificação de Seddon, primeira a ser utilizada e a classificação de Sunderland. Seddon<sup>(27)</sup> classificou as lesões nervosas periféricas em:

**a) Neuropraxia** — lesão leve com recuperação em semanas a meses, com perda motora e sensitiva devido à desmielinização da bainha de mielina, mas sem alteração estrutural, sem rompimento axonal ou degeneração Walleriana. A perda de função irá persistir até ocorrer a remielinização.

**b) Axonotmese** — lesões causadas comumente por esmagamento ou estiramento. Ocorre perda de continuidade axonal, subsequente degeneração Walleriana do segmento distal porém não ocorre perda de célula de Schwann. A recuperação depende do grau de desorganização do nervo e também da distância ao órgão terminal.

**c) Neurotmese** — lesão completa do nervo, o tronco nervoso é rompido sem ter continuidade anatômica. Ocorre a desorganização do axônio causada por uma fibrose tecidual com conseqüente interrupção do crescimento axonal. A recuperação espontânea é pobre, não regenera sem intervenção cirúrgica.

Sunderland<sup>(28)</sup> modificou a classificação de Seddon segmentando-a em cinco graus de injúria:

1 – neuropraxia; 2 - perda de continuidade dos axônios sem violar a bainha do endoneuro das fibras nervosas; 3 - axonotmese com descontinuidade axonal e endoneural, porém o perineuro é preservado; 4 - estrutura interna completamente rompida, apenas o epineuro continua intacto e a continuidade do nervo é mantida por tecido cicatricial. Esse rompimento irá gerar neuroma; 5 - perda de continuidade do tronco nervoso. Nos graus 4 e 5 a reinervação só é possível através de reparo cirúrgico.

Sunderland classificou a neuropraxia de Seddon em lesão de grau I; a axonotmese foi dividida em três tipos, que variam de acordo com o grau da lesão (II, III, IV), e a neurotmeose foi classificada como grau V. Dificilmente é possível classificar com exatidão uma lesão axonotmética com base em dados clínicos e eletromiográficos. O subtipo é geralmente determinado pelo exame histológico da lesão do nervo.<sup>(28)</sup>

Quando um nervo periférico é seccionado ou comprimido, os axônios do local da lesão são desconectados dos respectivos corpos celulares e começam a degenerar, ocasionando a retração do nervo que passa a apresentar um coto proximal e um coto distal.<sup>(14)</sup>

No coto proximal, o corpo celular entra em cromatólise, ou seja, há dissolução dos corpúsculos de Nissl, deslocamento do núcleo para a periferia e aumento do volume do corpo celular. Além disso, há um aumento do retículo endoplasmático rugoso, responsável pela produção de moléculas de reparo.<sup>(11)</sup>

As alterações que ocorrem no coto distal do axônio iniciam com a degeneração axonal, denominada de degeneração Walleriana.<sup>(11, 25)</sup> Devido à interrupção do contato com o corpo celular, a ausência de suporte trófico e o aumento da entrada de íons cálcio ( $Ca^{+2}$ ) nas fibras axotomizadas, o processo de degeneração da extremidade distal inicia com a fragmentação da bainha de mielina e dos axônios.<sup>(21)</sup>

O citoesqueleto e o axoplasma se degeneram deixando o correspondente tubo endoneural vazio. A destruição da bainha de mielina estimula a atividade dos macrófagos e células de Schwann resultando na remoção da maioria dos seus fragmentos. As células de Schwann desempenham importância fundamental na regeneração, atuando como condutores físicos que possibilitam o direcionamento dos axônios durante o crescimento em direção ao órgão-alvo. Essas células ainda

apresentam a propriedade de produzir elementos da matriz extracelular como proteoglicanas, colágeno e fatores neurotróficos.<sup>(21, 29)</sup>

As SC e os macrófagos que são recrutados para o local da lesão atuam na fagocitose dos fragmentos de mielina e de neurofilamentos dos axônios em degeneração, o que proporciona um microambiente favorável ao crescimento e orientação axonal, fundamental ao processo regenerativo. Durante a degeneração Walleriana, as SC liberam citocinas como interleucina (IL) IL-1, IL-6 e IL-8, intimamente envolvidas no recrutamento de leucócitos. Os macrófagos também secretam fatores de crescimento e citocinas como IL-1, IL-6 e IL-12, que agem como fatores quimiotáticos para as SC.<sup>(18-20)</sup> As SC, macrófagos e fibroblastos passam a apresentar características relacionadas à proliferação e migração celular, tanto no coto proximal quanto no distal.<sup>(19, 30)</sup>

### **2.3. Reparo de lesões em nervos periféricos**

Há casos em que, apesar da grande capacidade regenerativa do SNP, a extensão da lesão impossibilita a simples reunião dos cotos.

Na literatura especializada encontra-se diversas alternativas cirúrgicas passíveis de serem empregadas na reparação de nervo periférico. Dentre elas, ressaltase a neurorrafia epineural, a neurorrafia fascicular, a neurorrafia epineural-fascicular combinada, os enxertos nervosos,<sup>(16)</sup> a aplicação de adesivos de fibrina, a utilização de células-tronco autólogas,<sup>(31)</sup> a utilização do plasma rico em plaquetas<sup>(32-34)</sup> e as técnicas de tubulização com câmaras constituídas a partir de diferentes materiais.<sup>(2, 9, 10, 35-38)</sup>

Nos casos em que há perda de substância nervosa, a técnica mais indicada é o transplante de enxerto autólogo, sendo considerado o padrão-ouro. Entretanto, este apresenta limitações como a necessidade de uma segunda intervenção cirúrgica no paciente, morbidade e escassez de tecidos doadores de nervo, além do déficit sensitivo resultante no local de retirada.<sup>(39)</sup> Uma técnica de reparo disponível e frequentemente empregada com alternativa ao enxerto autólogo de nervo é a tubulização,<sup>(2, 40)</sup> que pode ser otimizada com a adição de fatores neurotróficos e componentes da MEC.

Embora as técnicas cirúrgicas tenham evoluído nas últimas décadas, os desfechos clínicos de recuperação de nervos periféricos continuam insatisfatórios,

estimulando muitos pesquisadores a buscar alternativas terapêuticas com melhores resultados.<sup>(2)</sup> Diversos biomateriais são constantemente pesquisados e utilizados para auxiliar a regeneração nervosa, com o objetivo de encontrar alternativas que ofereçam os mesmos benefícios do enxerto autólogo, porém livres de suas desvantagens. Com base nos princípios da bioengenharia, que conceituam o processo de reparo nervoso como um conjunto de interações que envolvem uma série de elementos celulares e mediadores químicos, a utilização de câmaras de orientação, conectadas às extremidades proximal e distal do nervo lesado para direcionar a regeneração axonal, apresenta-se como uma alternativa terapêutica promissora para o reparo de nervos periféricos. Essas câmaras de orientação podem ser feitas de materiais biológicos ou sintéticos. Quando é de natureza sintética, o biomaterial pode ser não absorvível (tubo de silicone) ou biodegradável, sendo este último vantajoso, pois nenhum resíduo do material permanece no organismo do hospedeiro após ter desempenhado sua função.<sup>(29, 41)</sup> Quando os biomateriais são polímeros combinados com fatores neurotróficos podem fornecer um microambiente que estimula o processo de regeneração nervosa.<sup>(42)</sup>

#### **2.4. Tacrolimus (FK506)**

O imunossupressor macrolídeo tacrolimus (FK506) é um poderoso e seletivo agente anti-linfócito T descoberto em 1984. Esse agente foi isolado a partir do fungo *Streptomyces tsukubaensis* e apresenta um mecanismo de ação semelhante à imunofilina ciclosporina A (CSA).<sup>(43)</sup> Aprovado pelo FDA, é utilizado principalmente na prevenção da rejeição de transplantes alogênicos.<sup>(10)</sup> O tacrolimus possui um potente efeito hepatotrófico, que justifica sua eficácia no transplante de fígado.<sup>(43)</sup>

Tacrolimus é um composto neutro e hidrofóbico, que cristaliza na forma de prismas incolores. Sua fórmula molecular é  $C_{44}H_{69}NO_{12}$  e sua massa molecular relativa é 803 ( $m/z=804$ ,  $M+1$ , por espectrometria de massa iônica secundária). Seu ponto de fusão é 127-129°C e é solúvel em metanol, etanol, éter, propano-2-ol, acetato de etila, acetona, acetonitrila, cloreto de metileno, clorofórmio e éter dietílico, moderadamente solúvel em hexano e éter de petróleo, e insolúvel em água. A droga se mantém estável por muitos meses em temperatura ambiente, porém em solução sua estabilidade diminui.<sup>(44, 45)</sup>

Com concentrações 100 vezes mais baixas que CSA, o tacrolimus é capaz de suprimir a reatividade linfocitária e a geração de células T citotóxicas, promovendo 50% de inibição com apenas 0,32 nmol/L. O fármaco inibe a expressão de receptores de IL-2 tanto em células T CD4, como em CD8. <sup>(43)</sup>

Recentemente, estudos demonstraram sua atividade neuroprotetora e neurotrófica, com importante papel promotor na reinervação e recuperação funcional após lesão de nervos periféricos. <sup>(10)</sup> Sua administração sistêmica, em conjunto com tubulização ou utilização de enxerto autólogo, promove um aumento da taxa de regeneração do nervo e grau de recuperação funcional. <sup>(46-48)</sup> O Tratamento durante dois meses com 1mg.Kg<sup>-1</sup> associado a conduto de nervo feito de colágeno com cultura de células de Schwann isogênicas promoveu em ratos a recuperação funcional. O efeito imunossupressor e neurotrófico favoreceu o tratamento com células de doadores. <sup>(48)</sup> Chunasuwankul et al. investigou a aplicação sistêmica da droga com dose baixa (0,5mg.kg<sup>-1</sup>/dia) e demonstrou que o tacrolimus aumenta a recuperação de nervo periférico de roedor após transecção. <sup>(49)</sup> Os dados apontam o tacrolimus como um eficaz agente neuroprotetor no reparo nervoso em pequenas concentrações.

Contudo, essa via de administração apresenta efeitos colaterais, tais como nefrotoxicidade, hipertensão, hiperestesia, fraqueza muscular e sintomas gastrintestinais, ocasionados por seu mecanismo não seletivo. Estes efeitos tornam-se fatores limitantes para sua aplicação clínica no reparo de lesão em nervo periférico. Sua aplicação localizada é capaz de minimizar os efeitos adversos e potencializar sua ação neuroprotetora e neurotrófica, sendo uma alternativa terapêutica mais eficiente. <sup>(49)</sup>

O exato mecanismo de ação neurotrófica do tacrolimus necessita, ainda, ser investigado. As prováveis vias de ação incluem a diminuição da inflamação específica e inespecífica (via redução da IL-2), restauração da barreira hematoneural, modulação de cálcio, estimulação do cone neural - via proteína GAP-43 (do inglês *Growth Associated Protein 43*) - e modulação de vários mensageiros secundários e vias de transdução de sinal associados à regeneração axonal. <sup>(50-53)</sup>

Estudos já demonstraram a eficácia da aplicação tópica de tacrolimus utilizando a técnica de tubulização com diferentes biomateriais, tais como quitosana, <sup>(9)</sup> enxerto de veia <sup>(10)</sup> e poli(ácido-glicólico – Neurogen®), <sup>(46)</sup> sugerindo sua ação imunossupressora e neuroregenerativa em reparo de nervo periférico.

Tacrolimus incorporado na parede de tubos de quitosana e aplicado no reparo de nervo ciático de ratos, foi liberado durante a degradação do biomaterial e apresentou efeitos neuroregenerativos; os autores observaram melhora motora funcional dos animais e presença de fibras mielinizadas mais maduras 8 semanas após as cirurgias, além de seus efeitos imunossupressores, favorecendo a regeneração nervosa.<sup>(9)</sup> Diaz et al. demonstraram que a concentração de 10ng/mL aplicada topicamente em nervo facial de coelhos lesionado, associada à técnica de tubulização, promove a regeneração do nervo, com recuperação motora precoce e índice de função ciática (IFC) maior que enxerto autólogo.<sup>(46)</sup>

Considerando a aplicação local de tacrolimus como um tratamento mais eficaz e livre de efeitos colaterais, sugere-se que sua combinação com biomateriais absorvíveis seja uma alternativa de tratamento para lesões de nervos periféricos extremamente atraente. Há poucos estudos sobre a incorporação do fármaco a polímeros biodegradáveis, e sua associação com PLGA nanotexturizado permanece sem investigação.

## **2.5 Biomateriais**

A definição de biomateriais mais utilizada e aceita é da Conferência de Consenso de Biomateriais para aplicações clínica, a qual define um biomaterial como toda substância (exceto drogas) ou combinações de substâncias, de origens sintéticas ou naturais, que durante um período de tempo indeterminado é empregada como um todo ou em parte integrante de um sistema para tratamento, ampliação ou substituição para qualquer tecido, órgãos ou funções corporais.<sup>(54)</sup>

Para que um material seja utilizado com segurança, precisa atender a requisitos fundamentais: possuir características biocompatíveis, não provocando ou estimulando o mínimo de reações pró-inflamatórias ou alérgicas e deve ser biofuncional, com características mecânicas apropriadas ao tecido ou órgão que será implantado, para cumprir a função desejada e deve ser esterilizável.<sup>(55)</sup>

Conforme Hench e Wilson,<sup>(56)</sup> os biomateriais podem ser classificados de acordo com seu comportamento fisiológico em:

**Biotoleráveis** – São apenas tolerados pelo organismo, sendo isolados dos tecidos adjacentes por uma camada envoltória de tecido fibroso. O material induz a formação dessa camada através da liberação de compostos químicos, íons e produtos de corrosão. Os polímeros sintéticos e os metais constituem a maior parte dos materiais biotoleráveis.

**Bioinertes** – Materiais também tolerados pelo organismo, sendo mínima a formação da camada de fibrose. Os mais utilizados são alumina, zircônia, ligas de titânio e carbono.

**Bioativos** – Quando os materiais estabelecem ligações de natureza química com o tecido (osteointegração) sem formação intermediária de tecido conjuntivo. Em função da similaridade química entre esses materiais e a parte mineral do osso, os tecidos ósseos se ligam a ele por meio do revestimento por células ósseas. Os principais materiais dessa classe são os vidros e vitrocerâmicas à base de fosfatos de cálcio, a hidroxiapatita (HA) e os compostos de fosfato de cálcio.

**Bioabsorvíveis** – São os materiais que ao entrarem em contato com os tecidos, após determinado período de tempo, acabam sendo degradados, solubilizados ou fagocitados pelo organismo, como o fosfato tricálcico (TCP) e o poli (ácido lático).

No contexto da regeneração de nervo periférico, muitos materiais são pesquisados e testados para confecção de um conduto que seja capaz de guiar e promover a regeneração axonal. Os polímeros biodegradáveis são preferidos sobre os polímeros não biodegradáveis, pois descartam a necessidade de uma segunda cirurgia para remover o material após cumprir sua função. Alguns inconvenientes ocorrem na presença de um biomaterial, como a compressão do nervo quando o conduto não é removido depois da regeneração do nervo.<sup>(57)</sup>

Há inúmeros materiais biodegradáveis utilizados na engenharia de tecidos. Os alginatos, por exemplo, são polímeros naturais de polissacarídeos extraídos de algas marinhas. São imunologicamente inertes e têm sido extensivamente explorados em várias aplicações biomédicas, incluindo enxertos para a regeneração do tecido após a lesão no sistemas nervosos central e periférico.<sup>(58)</sup> Condutos feitos de colágeno, um

polímero natural, demonstram ser eficazes no reparo de defeitos nervosos em ensaios experimentais e clínicos principalmente quando associados a fatores de crescimento.<sup>(29, 59)</sup>

A quitosana é um polissacarídeo natural biocompatível e que promove a adesão e proliferação de células, e tem seu efeito potencializado quando associada a fatores neuroprotetores.<sup>(10)</sup>

PGA e PLA têm sido amplamente utilizados como *scaffolds* no reparo nervoso. Tubos de PGA são comercializados, porém seu uso clínico está restrito a lesões de nervo inferiores a 30 mm, por isso a busca por um biomaterial que atenda às necessidades do reparo nervoso permanece contínua.<sup>(58)</sup>

### 2.5.1 Poli (ácido láctico-co-ácido glicólico)

Dentre os materiais sintéticos mais utilizados e testados, está o poli (ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA), por apresentar biocompatibilidade e biodegradabilidade,<sup>(3, 60)</sup> sendo um dos poucos polímeros aprovados pelo *Food Drug Administration* (FDA).<sup>(4)</sup>

O PLGA é um poliéster alifático formado a partir de dois polímeros (PLA e PGA), lentamente reabsorvido pelo organismo e pode possuir microporosidades em sua superfície que aumentam a permeabilidade a nutrientes, favorecendo a adesão e proliferação celular, produção de matriz extracelular, aumentando a vascularização e crescimento tecidual.<sup>(5, 61)</sup>

A degradabilidade de poliésteres bioabsorvíveis é afetado por propriedades intrínsecas e pelo ambiente externo. Dentre as propriedades do próprio polímero estão a estrutura do monômero,<sup>(62)</sup> massa molar,<sup>(63)</sup> proporção do copolímero,<sup>(64)</sup> cristalinidade<sup>(65)</sup> e forma,<sup>(66)</sup> o pH, temperatura e enzimas são os fatores externos que influenciam na degradação.<sup>(37, 61, 63, 64, 67-70)</sup> A degradação de poliésteres absorvíveis *in vivo* comumente ocorre através de reação de hidrólise química das ligações ésteres, resultando na produção de ácido carboxílico e grupos que agem como catalisadores na reação. Os ácidos láctico e glicólico, *in vivo*, entram no ciclo do ácido tricarboxílico, são metabolizados e, subsequentemente, eliminados do corpo como o dióxido de carbono e água.<sup>(37, 65)</sup>

Em estudo experimental, o tubo de PLGA e o tubo Neurolac® demonstraram capacidades equivalentes na regeneração de nervos periféricos, sendo ambos bons substratos.<sup>(71, 72)</sup> Panseri et al.<sup>(72)</sup> sintetizaram um tubo misto de PLGA/PLC para reparar defeito de 10mm de nervo ciático de ratos. O tubo sintetizado induziu regeneração nervosa e reconexão funcional dos cotos do nervo. O procedimento não resultou em resposta inflamatória exacerbada, sugerindo ser um *scaffold* apropriado para regeneração nervosa. Em outro estudo, os autores sintetizaram um tubo de PLGA/Pluronic F127 hidrofílico e o compararam com o tubo de PLGA hidrofóbico e tubo de silicone no reparo de nervo ciático de ratos. O tubo PLGA/Pluronic F127 hidrofílico obteve os melhores resultados, evidenciando ser uma alternativa terapêutica para área cirúrgica.<sup>(5)</sup> Em experimento *in vitro*, os autores sintetizaram um *scaffold* para nervo periférico composto por PLGA e micropartículas acelularizadas de colágeno de pele de porcos e investigaram suas propriedades. Os resultados demonstraram características como biocompatibilidade, biodegradabilidade e boa adesão celular, além de ausência de imunogenotoxicidade.<sup>(3)</sup>

Estas propriedades demonstram que este material pode ser considerado um *scaffold* para o reparo nervoso<sup>(3)</sup> e apontam o PLGA como um potencial sistema de liberação controlada de fármacos para ser utilizado no processo de regeneração de nervos periféricos.<sup>(65)</sup>

## 3 OBJETIVOS

### 3.1 Objetivo geral:

Desenvolver tubo nanotexturizado absorvível composto por poli (ácido láctico-co-ácido glicólico) tratado com hidróxido de sódio (NaOH), e avaliar seu efeito sem e com incorporação de tacrolimus (FK506) sobre a regeneração de nervo periférico em ratos.

### 3.2 Objetivos específicos:

- 1 – Desenvolver tubo absorvível para regeneração nervosa produzido a partir do copolímero PLGA tratado com NaOH (T1).
- 2 – Desenvolver tubo absorvível para regeneração nervosa produzido a partir do copolímero PLGA tratado com NaOH com incorporação e liberação de tacrolimus (T2).
- 3 – Caracterizar os tubos de PLGA (morfologia e biodegradação do copolímero e liberação de tacrolimus *in vitro*).
- 4 - Avaliar a biocompatibilidade *in vitro* (cultivo celular) e *in vivo* (modelo experimental em ratos) dos dois tipos de PLGA com e sem incorporação de tacrolimus.
- 5 - Testar a viabilidade e eficácia *in vivo* dos dois tubos de PLGA sobre o reparo de lesão de nervo ciático de ratos (Tubulização).

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Delineamento Experimental

Estudo experimental, controlado, comparado e cego, *in vitro* e *in vivo*.

### 4.2 Desenvolvimento de tubos e membranas de PLGA

Os tubos e membranas (Figura 2) de PLGA foram produzidos no Laboratório de Materiais e Nanociências da PUCRS na proporção de 82:18 (PLA:PGA) de poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) (PURAC - Purasorb® PLG 8218). O copolímero foi dissolvido em clorofórmio (Merck®) na proporção de massa do copolímero por volume de solvente de 5 % (m/v).

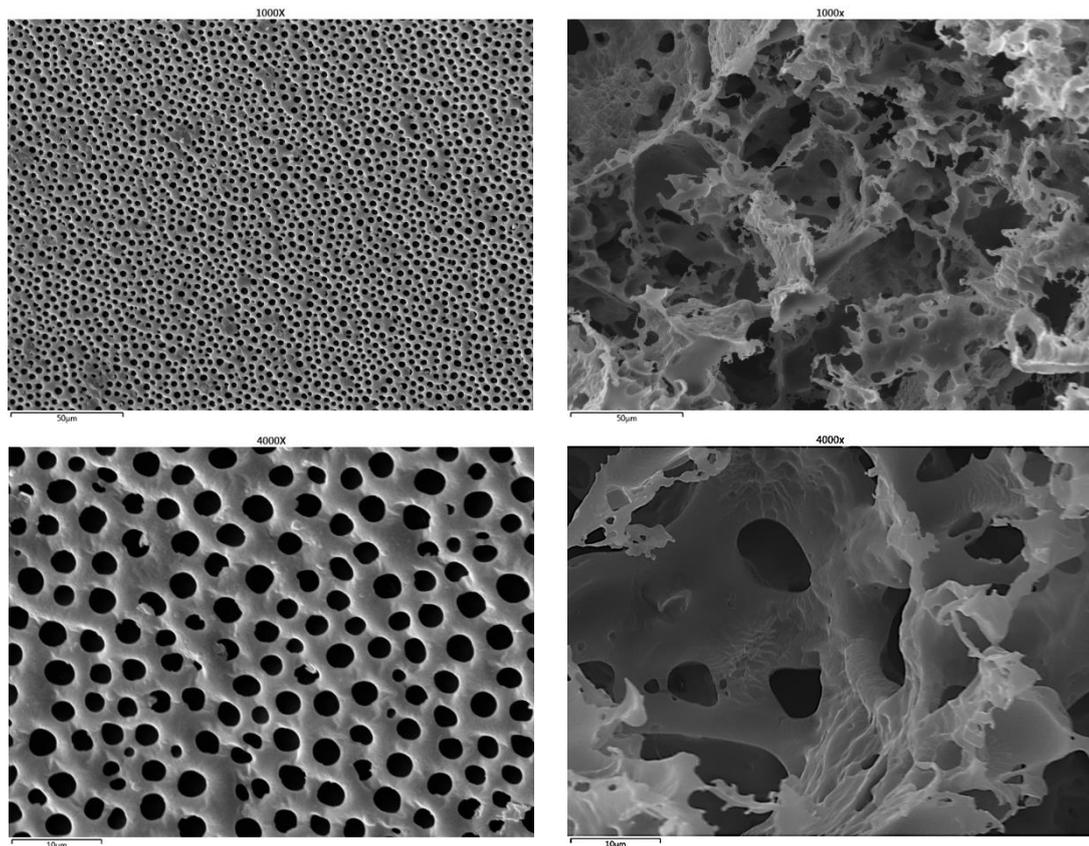
#### 4.2.1 Membranas

Foram confeccionados três tipos de membranas de PLGA para serem utilizados nas avaliações de bicompatibilidade *in vitro* e *in vivo*:

- a) M1 – Membranas superficialmente porosas: o copolímero foi dissolvido em ultrassom de 40 kHz (Unique, modelo USC-1600) em temperatura ambiente utilizando clorofórmio como solvente. A solução foi vertida em placas de Petri e o solvente evaporado em capela com fluxo de ar por aproximadamente duas horas, viabilizando assim a formação de poros na superfície da membrana. <sup>(69)</sup>
- b) M2 – Membranas nanotexturizadas: produzidas utilizando o mesmo solvente citado anteriormente. Após a completa dissolução do copolímero, foram adicionadas partículas de cloreto de sódio (NaCl) (Merck®) como agente porogênico na proporção de 1:16 (copolímero/sal) e a suspensão foi mantida em placa de Petri em uma capela com fluxo de ar para evaporação do solvente. Após lavagem em água deionizada, as membranas foram

imersas em NaOH (Merck®) (1M) durante cinco minutos, para nanofuncionalização das membranas porosas. As membranas foram lavadas com água deionizada até atingir pH próximo à neutralidade, e mantidas durante uma hora em ultrassom para remoção de qualquer resíduo da solução de NaOH. Durante 48h, as membranas permaneceram em vácuo com pressão de 10 Pa para remoção do solvente residual. (6, 7, 61)

- c) M3 – Membranas nanotexturizada com incorporação de tacrolimus: utilizado o mesmo protocolo das membranas M2, entretanto, durante a dissolução do copolímero, adicionou-se tacrolimus em uma concentração de 3% em relação à massa do biomaterial (m/m)<sup>(6, 7, 10)</sup>



**FIGURA 2.** Membranas de PLGA (Esquerda: membrana superficialmente porosa; Direita: membrana nanotexturizada). Imagens obtidas através de microscopia eletrônica de varredura.

#### 4.2.2 Tubos

Foram confeccionados dois tipos de tubos: tubo poroso nanotexturizado de PLGA, denominado T1 e tubo poroso nanotexturizado de PLGA e tacrolimus, chamado T2 (Figura 3)<sup>(73)</sup>.

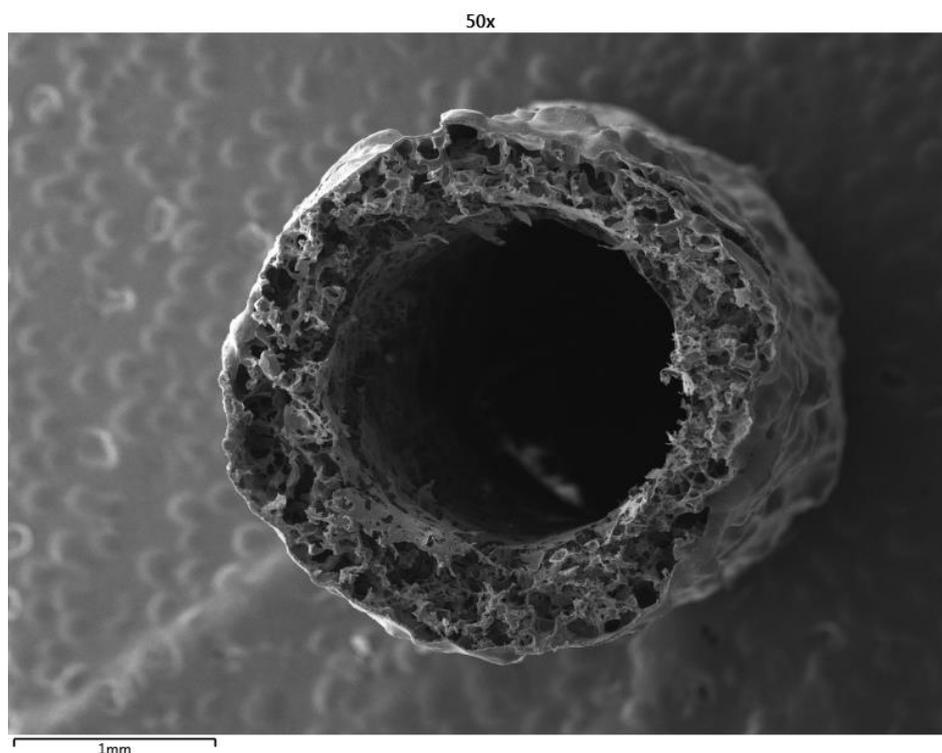
##### a) Tubo poroso nanotexturizado de PLGA – T1

Os tubos tratados com NaCl e NaOH foram preparados pela dissolução do copolímero em clorofórmio e adição de microcristais de NaCl (análogo à metodologia utilizada na confecção das membranas M2). Para a obtenção de uma estrutura tridimensional, foi utilizada como base uma haste de titânio com diâmetro de 2mm, a qual foi mergulhada na suspensão. Parte das hastes com copolímero e NaCl depositados foram, ainda, mergulhadas em uma solução de PLGA/Clorofórmio sem adição de NaCl para obter uma cobertura protetora na superfície, evitando, assim, a difusão rápida de possíveis medicamentos a serem inseridos na parte porosa para o exterior do tubo. Após a evaporação do solvente em temperatura ambiente, as hastes foram submersas em água deionizada para remoção dos cristais de NaCl durante 72 horas. A água foi trocada a cada oito horas e o sistema mantido em ultrassom. Posteriormente, os tubos foram removidos das hastes e parte deles foram separados e tratados com uma solução de NaOH, seguindo os mesmos padrões utilizados para as membranas do tipo M2. Foram confeccionados tubos com 12mm de comprimento e com 4 espessuras (150  $\mu\text{m}$ , 300  $\mu\text{m}$ , 450  $\mu\text{m}$  e 600  $\mu\text{m}$ ), que foram comparadas quanto seu perfil de degradação.

Após os procedimentos citados serem realizados, todos os tubos foram colocados em uma câmara de vácuo durante 48 h, a uma pressão de 10 Pa para a remoção de solvente residual.

#### b) Tubo poroso nanotexturizado de PLGA e tacrolimus – T2

A confecção dos tubos T2, no qual foi realizada a incorporação do tacrolimus (Sigma-Aldrich®), é semelhante à do tubo T1 . Porém, foram misturados 5,5 mg de PLGA e 0,165 mg do fármaco durante a composição do tubo, o que corresponde a uma concentração de 3% de tacrolimus. A mistura foi dissolvida em clorofórmio e os tubos foram desenvolvidos conforme metodologia descrita na seção anterior.



**FIGURA 3.** Microfotografia do tubo de PLGA.

### 4.3 Caracterização das membranas e tubos de PLGA *in vitro*

#### 4.3.1 Experimento celular - Biocompatibilidade

A avaliação da biocompatibilidade *in vitro* foi obtida através de ensaios com MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina) por extração e coloração DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) em culturas de células da linhagem NIH 3T3 de camundongos sobre três tipos de membranas descritos anteriormente (M1, M2 e M3).

### *Ensaio MTT*

O ensaio de viabilidade pelo reagente MTT <sup>69</sup> é um método colorimétrico sensível e quantitativo que mensura a viabilidade, proliferação e estado de ativação das células. Este ensaio baseia-se na capacidade de enzimas desidrogenase, presentes nas mitocôndrias de células viáveis, em converter o substrato metiltetrazólio (MTT) solúvel em água, no cristal de formazan, produto insolúvel em água.

O ensaio MTT por extração seguiu a ISO 10993-5, a qual padroniza os testes de citotoxicidade de biomateriais em cultura de células por contato direto ou indireto. Neste experimento, foi utilizado o método por contato indireto do material testado sobre as células. As dimensões das membranas foi de 6cm<sup>2</sup> (1,5 cm X 1,5 cm), as quais foram esterilizadas e incubadas em meio de cultura por tempos pré-determinados em placas com 96 poços (n=4). Após 1, 2, 7, 14 e 30 dias de incubação, o material foi retirado e foram adicionadas células de NIH 3T3, em uma concentração celular de 10<sup>4</sup> células por poço em 100 µL de DMEM (Dubelcco's Modified Medium®), contendo 10% de soro fetal bovino, suplementado com penicilina 50 unidades mL<sup>-1</sup> e estreptomicina 50 unidades mL<sup>-1</sup>, e incubadas em 37°C e atmosfera de CO<sub>2</sub> por 24h. As células cultivadas sem o material foram utilizadas como controle positivo (n= 4), e hipoclorito de sódio foi aplicado como controle negativo (n=2). Após 24h de incubação, o DMEM foi substituído por um novo, e o teste MTT realizado. As células receberam 100 µL de MTT (5 µL/mL), seguido por uma incubação em 37 °C por quatro horas. O meio contendo MTT foi substituído por 200 µL de dimetilsulfoxide (DMSO). A absorbância das amostras foi medida a 492 nm. A citotoxicidade foi definida como viabilidade relativa (%).<sup>(63, 74)</sup>

### *Coloração DAPI*

Para avaliar a adesão celular, as membranas foram cultivadas com células NIH 3T3 na concentração de 10<sup>5</sup> células por poço por 24h (n=2) nas mesmas condições de cultivo descritas acima. Células foram cultivadas em um poço sem o copolímero para serem usadas como controle positivo (100 % de adesão). Após, o meio de cultura foi retirado e as membranas e controle positivo lavados com PBS (do inglês *Phosphate Buffer Solution*) pH 7,4 (Gibco ®). As células foram tratadas com azul fluorescente

DAPI por 5 minutos (5 mg/mL em água deionizada). As amostras foram lavadas em PBS e fixadas em paraformaldeído 4% durante 15 minutos. Imagens de fluorescência das células coradas foram observadas por um microscópio de fluorescência, com filtros adequados (488 nm de comprimento de onda). Foram registradas 15 imagens de cada tipo de membrana, e o número de núcleos quantificado pelo software Image Pro Plus® versão 6.0 (Media Cybernetics, Rockville, MD, USA).

#### 4.3.2 Avaliação da biodegradação *in vitro*

Foi realizada uma pré-avaliação antes da incorporação do tacrolimus, a fim de obter o perfil de biodegradação do T1 com diferentes espessuras (150 µm, 300 µm, 450 µm e 600 µm e 12 mm de comprimento). A degradação foi realizada em solução tampão PBS.

A massa ( $P_0$ ) inicial e espessura ( $E_0$ ) dos tubos foram mensuradas. Para obtenção das massas, foi utilizada uma balança analítica certificada (NBR ISSO/MEC 17025) com cinco casas (Mettler Toledo Modelo® AG245). As amostras foram submersas em tubos cônicos de 15 mL contendo 5 mL de etanol 100% e agitados a 100 rpm por uma hora. O tratamento com etanol permite a esterilização e pré-umidificação das amostras, facilitando a penetração do PBS nos poros dos tubos. A seguir, as amostras foram lavadas em PBS e colocadas em frascos com 5 mL de solução tampão PBS pH 7,4 0,2M com agitação de 60 rpm em 37°C. A cada semana, a solução de PBS foi retirada, seu pH medido e esta solução substituída por PBS novo. Foram realizadas triplicatas (n=3) de cada espessura para cada período de avaliação.<sup>(10, 75)</sup>

##### *Perda de massa*

Nos períodos determinados (14, 30, 60 e 90), os tubos foram removidos do PBS e as amostras secas ao “ar” de um dia para o outro, e secas em vácuo por 24h. A massa seca em cada período ( $P_t$ ) foi medida e a perda de massa foi calculada de acordo com a fórmula:

$$\text{Perda de massa (\%)} = \frac{(P_0 - P_t)}{P_0} \times 100$$

### *Perda de espessura*

Após a secagem das amostras, suas espessuras foram medidas nos períodos pré-determinados ( $E_t$ ), através de imagens por obtidas Microscopia Eletrônica de Varredura e foi utilizado o software de análise de imagem Image Pro Plus® 6.0 (Media Cybernetics, Rockville, MD, USA). As espessuras dos tubos foram calculados conforme a fórmula:<sup>(65)</sup>

$$\text{Perda de Espessura (\%)} = \frac{|E_t - E_0|}{E_0} \times 100$$

### *Perda de massa molar*

A massa molar ponderal do PLGA foi medida por cromatografia de permeação em gel (GPC, do inglês *Gel Permeation Chromatography*) (Waters 1515 Isocratic HPLC Pump) no Laboratório de Cromatografia da Faculdade de Química da PUCRS. O eluente utilizado será tetrahydrofurano (THF), com quatro colunas (HR1, HR2, HR3, HR4) e taxa de fluxo constante de 1mL/min em temperatura de 40°C. Poliestireno (Polysciences) será utilizado como curva de calibração. O eluente foi filtrado em 0,45µm, para desgaseificação em ultrassom (retirar microbolhas de ar). Após, iniciou-se o processo de refração (Waters 2414 – Refractive Index Detector) com pressão de 1.200 psi. A amostra foi dissolvida em THF 2,5mg/mL por 50 minutos. O Software utilizado foi o Breeze.<sup>(10, 75)</sup>

#### 4.3.3. Liberação do tacrolimus

Os tubos contendo tacrolimus, com espessura 600µm e comprimento 12mm, foram expostos à liberação em 1mL de PBS à 37°C com agitação. Nos períodos 1, 7, 14, 30 e 90 dias (n=5), o PBS foi removido e substituído com a mesma quantidade de PBS novo e a concentração do fármaco mensurada através de cromatografia líquida de alta performance (HPLC, do inglês *Hight-Performance Liquid Chromatography* - UHPLC 1290/ MS 6460 TQQQ – Agilent Technologies) no Instituto de Toxicologia e Farmacologia da PUCRS. A liberação acumulada do fármaco foi calculada ao longo dos períodos avaliados.<sup>(63)</sup>

#### 4.3.4. Caracterização morfológica

O tamanho dos poros e a morfologia do copolímero foram avaliados através de Microscopia eletrônica de varredura (MEV) a uma tensão de 20 Kv no Centro de Microscopia Eletrônica e Análise da PUCRS, utilizando um microscópio eletrônico de varredura Philips Modelo XL30, com resolução de 3,5nm (mod. Eletrônico secundário) e faixa de aumento de 50X a 2000X. As amostras foram revestidas em ouro e o diâmetro dos poros medidos através das microfotografias obtidas analisadas pelo software de análise de imagem Image Pro Plus® versão 6.0 (Media Cybernetics, Rockville, MD, USA).<sup>(10, 75)</sup>

### 4.4 Experimentos *in vivo*

#### 4.4.1. Animais e grupos de experimentação

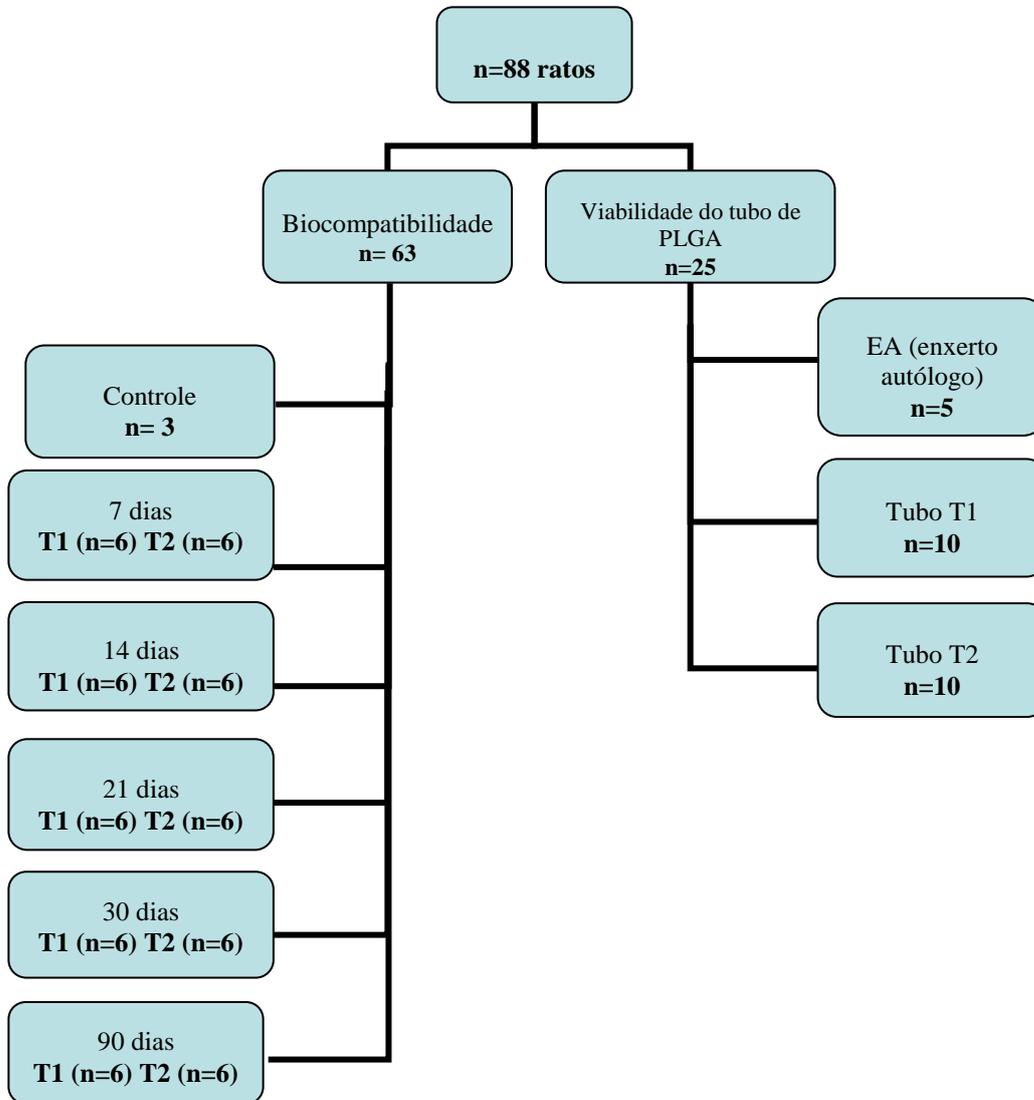
O presente projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética para o uso de Animais (CEUA) da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Foram utilizados 88 ratos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), machos adultos, com três meses de idade e pesando 250-350 gramas. Os ratos eram provenientes da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS), e foram mantidos no vivário do LHMPC da PUCRS em caixas plásticas com 4 animais em cada, com controle de luz (ciclo claro-escuro de 12h), em temperatura controlada de  $22 \pm 1^\circ\text{C}$ , com água e alimentação *ad libitum*. No pós-operatório, os animais foram mantidos nas mesmas condições descritas acima, porém em caixas individualizadas.

Dos 88 ratos, 63 foram utilizados nos testes de biocompatibilidade *in vivo*, divididos em 2 grupos: T1 e T2. Os animais de cada grupo foram distribuídos randomicamente em cinco subgrupos de acordo com os períodos de avaliação (n=6 por subgrupo) e um subgrupo controle, no qual os animais não receberam nenhum implante (n=3).

Os 25 animais restantes foram randomicamente divididos em três grupos para avaliação da viabilidade e eficácia dos tubos de PLGA (T1, n=10 e T2, n=10) sobre o

reparo de lesão de nervo ciático de ratos (Figura 4) e um grupo controle (EA – enxerto autólogo, n=5).



**FIGURA 4.** Distribuição dos animais utilizados no experimento *in vivo*.

#### 4.4.2. Procedimentos anestésicos

A anestesia antecedente aos procedimentos cirúrgicos foi administrada nos animais com injeção intraperitoneal de Cloridrato de Cetamina ( $60 \text{ mg.kg}^{-1}$ ) e Meperidina ( $20 \text{ mg.kg}^{-1}$ ).

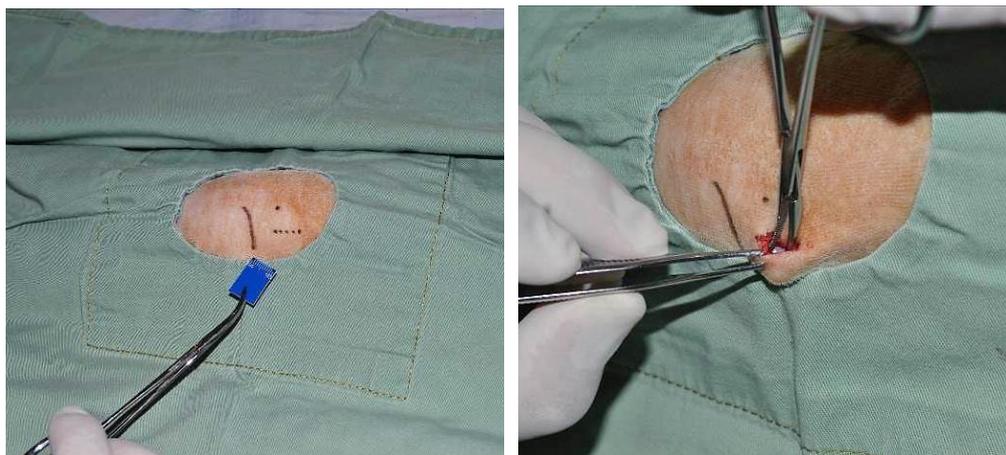
#### 4.4.3. Procedimentos cirúrgicos

Os procedimentos cirúrgicos foram realizados no LHMPC da PUCRS por médico veterinário, com auxílio de um microscópio de dissecação microcirúrgica (D.F.Vasconcellos, São Paulo, Brasil), para avaliar a biocompatibilidade *in vivo*, bem como a viabilidade do tubo de PLGA na regeneração de nervos periféricos em ratos (tubulização). Estes procedimentos estão detalhadamente descritos nas seções a seguir.

Durante todo o experimento, foi realizado um controle semanal do peso dos ratos, para se certificar que os mesmos não estivessem com dificuldades para se alimentar e hidratar.

#### 4.4.4. Biocompatibilidade *in vivo*

Foram utilizados 63 animais no experimento, divididos em dois grupos: T1 – PLGA poroso nanotexturizado e T2 - PLGA poroso nanotexturizado contendo tacrolimus; três animais não receberam implantes (controle). Os animais foram tricotomizados na área de acesso cirúrgico e posteriormente posicionados em decúbito ventral, sob anestesia geral já descrita. A incisão paravertebral de 1 cm foi realizada no dorso do lado direito de cada rato, com 1 cm de distância lateral à coluna vertebral (Figura 5) As superfícies de PLGA foram esterilizadas (por óxido de etileno) e implantadas subcutaneamente nos animais. As incisões foram suturadas com fio mononylon 5-0 (Ethicon®, Johnson & Johnson).<sup>(65, 66)</sup>



**FIGURA 5.** Técnica cirúrgica para implantação do PLGA no dorso dos ratos.

#### 4.4.5. Viabilidade do tubo de PLGA na regeneração de nervo periférico

##### 4.4.5.1. Modelos experimentais

Vinte e cinco ratos machos Wistar foram randomicamente divididos em três grupos experimentais, de acordo com a Figura 4. Foram realizadas duas técnicas cirúrgicas:

##### *Tubulização*

Os animais foram anestesiados conforme protocolo anteriormente citado e tricotomizados no local a ser operado. Foram posicionados em decúbito lateral direito para obter o acesso à região lateral da coxa, na qual foi realizada uma incisão longitudinal 3mm paralela e posterior ao eixo do fêmur esquerdo, desde o tubérculo maior do fêmur até a região póstero-lateral do joelho. A pele foi divulsionada, os músculos vasto lateral e bíceps femoral afastados e o nervo ciático (isquiático) liberado de suas inserções fasciais. Através do auxílio de microscópio cirúrgico (D.F.Vasconcellos, São Paulo, Brasil), um segmento do nervo foi ressecado com tesoura microcirúrgica criando no terço proximal, antes da bifurcação do ciático em nervos tibial e fibular comum, um defeito de 10 mm, formando um *gap* (Figura 6). Conforme o tipo de tratamento, um dos dois tubos de PLGA (T1 e T2) com 12 mm foi suturado com fio de polipropileno 7-0 (Prolene®, BV 1, Ethicon®) em pontos epineurais nas extremidades criadas (um ponto proximal e outro distal). Para

fechamento da incisão de acesso, a fásia lata e a pele foram suturadas separadamente em padrão contínuo simples e fio monofilamentar de náilon 5-0 (Ethilon®, Johnson & Johnson).



**FIGURA 6.** Reparo de nervo ciático através da técnica de tubulização com tubo de PLGA poroso nanotexturizado.

### *Enxerto autólogo*

Sob visualização por meio de microscópio cirúrgico (D.F.Vasconcellos, São Paulo, Brasil), um segmento de 10 mm do nervo ciático, na mesma localização anatômica empregada no modelo experimental anterior, foi ressecado, invertido 180 graus (para alterar a disposição fascicular) e depois enxertado no sítio operado usando em cada extremidade dois pontos isolados epineurais com fio de polipropileno 7-0 (Prolene®, BV 1, Ethicon®). O fechamento da incisão de acesso seguiu a mesma metodologia descrita no procedimento de tubulização.

Todos os animais foram anestesiados antes dos procedimentos, estando o

presente estudo conforme Lei Arouca 2008, nº 11.794/08 que regulamenta o inciso VII do § 1º do art. 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais, revogando a Lei nº 6.638, de 8 de maio de 1979; e dá outras providências.

#### **4.5 Pós-operatório**

No pós-operatório, os animais receberam Tramadol e Cetoprofeno, a cada 24h por três dias consecutivos ( $5\text{mg.kg}^{-1}$ , SC para ambos) como medicação analgésica e anti-inflamatória.

#### **4.6 Eutanásia**

Os animais foram eutanasiados com sobredose anestésica (mesmo protocolo utilizado para os procedimentos cirúrgicos) em período pré-determinado: 7, 14, 21, 30 e 90 dias pós-operatórios para avaliar a biocompatibilidade dos biomateriais no tecido subcutâneo; 90 dias após a cirurgia para avaliar a viabilidade dos tubos na regeneração de nervo ciático.

#### **4.7 Avaliação dos resultados – experimento *in vivo***

##### **4.7.1 Avaliação da biocompatibilidade *in vivo***

A leitura das lâminas obtidas dos tecidos circunjacentes aos implantes retirados, foi realizada em microscópio óptico Zeiss Axioskop 40 com uma objetiva de 10X. Para captura das imagens foi utilizada a câmera QImaging Retiga 2000R (QImaging, Surrey, BC, Canada) acoplada ao microscópio óptico e a um computador, produzindo um aumento similar a uma objetiva de 10X; portanto, as imagens resultantes apresentaram um aumento de 100X. Após o registro das imagens, foram avaliadas qualitativamente a presença de neutrófilos, células gigantes multinucleadas, macrófagos e mastócitos, e quantitativamente área de colágeno.

#### 4.7.2 Confecção das lâminas histológicas

Os tecidos circundantes ao copolímero foram retirados e fixados em formalina tamponada 10% por 24h. As amostras foram desidratadas em concentrações crescentes de álcool (70-100%), clarificados em xilol, embebidas em parafina e seccionados (5µm) em micrótomo.

#### 4.7.3 Avaliação Qualitativa

##### *Coloração Hematoxilina e Eosina (H&E)*

As amostras de tecido subcutâneo foram coradas com H&E e avaliadas qualitativamente quanto à presença de neutrófilos e células gigantes multinucleadas em torno dos implantes em 7, 14, 21, 30 e 90 dias após a sua inserção subcutânea, a fim de analisar a inflamação aguda e crônica. Foram capturados três pontos de cada corte histológico e realizada análise descritiva.

#### 4.7.4 Avaliação Quantitativa – Histomorfometria

##### *Coloração Picrosirius Red*

Para a avaliação histomorfométrica, utilizou-se a coloração Picrosirius Red, que age através da precipitação de moléculas do corante Sirius Red, que se depositam paralelamente às moléculas do colágeno provocando um aumento da birrefringência das fibras que conservam colágeno quando observadas à luz polarizada. A técnica de coloração Pricrosirius em conjunto com a microscopia de polarização constitui um método histoquímico específico para percepção de estruturas compostas por moléculas de colágeno orientadas, evidenciando assim, áreas compostas por colágeno circunjacentes aos implantes.

Após permanecer em estufa a 60°C por 24h, as lâminas foram desparafinizadas (xilol – 2 vezes por 5 minutos; álcool absoluto – 4 vezes por 2 minutos) e hidratadas em água corrente. Subsequentemente foi realizada a incubação em solução de Picrosirius na concentração de 1% por uma hora, seguida por uma

lavagem em água corrente por 20 minutos.

Quando secas, as lâminas foram desidratadas em álcool absoluto (4 X por 2 minutos), clarificadas em xilol (2 X por 5 minutos) e montadas com bálsamo de Canadá e lamínula. As lâminas foram codificadas de maneira que o examinador não obtivesse conhecimento sobre a quais grupos pertenciam. Posteriormente, foram fotografadas com o mesmo microscópio e câmera descritos acima e analisadas.

Foram selecionados dois campos por corte histológico, e dois a três cortes por lâmina, representando toda área que envolvia os implantes. Após o registro das imagens, as mesmas foram analisadas através do software Image Pro Plus® versão 6.0 (Media Cybernetics, Rockville, MD, USA), o qual permitiu através de uma contagem do número de pixels mensurar a área em micrômetros. Para diferenciar o colágeno, foi obtida a medida da razão do tecido birrefringente por unidade de tecido (pixel/ $\mu\text{m}$ ), utilizando as imagens capturadas com luz normal e luz polarizada. O controle (tecido normal, sem implantes) foi utilizado com padrão 100% de colágeno.

#### **4.8 Viabilidade do tubo de PLGA na regeneração de nervo periférico**

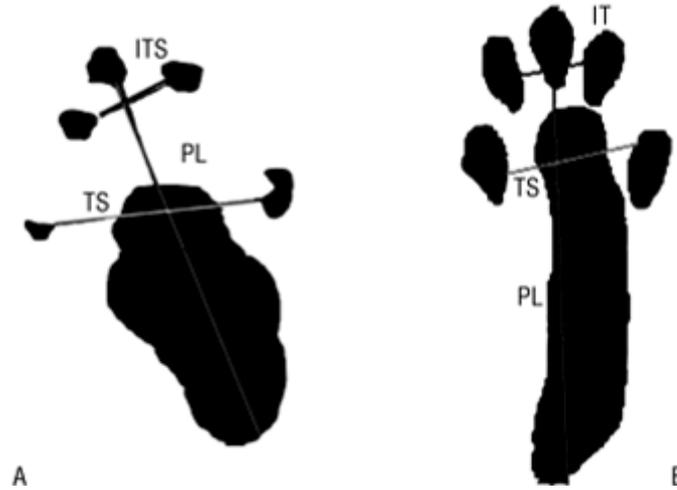
##### 4.8.1 Testes funcionais

###### *Teste de Marcha*

Os animais foram submetidos ao teste de marcha, de acordo com o método de De Medinaceli et al. (1982)<sup>(76)</sup> modificado por Lowdon et al.(1988).<sup>(77)</sup> Os dados para o cálculo do índice de função ciática (IFC) foram obtidos através das impressões digitais dos membros pélvicos dos ratos (De Medinaceli et al.,1982).<sup>(76)</sup> O IFC para cada rato foi calculado de acordo com o método de Bain et al.(1989).<sup>(78)</sup>

Foram obtidas impressões pré e pós-operatórias (30°, 60° e 90° dia) em papel branco dos coxins plantares. As impressões foram digitalizadas em scanner e avaliadas com o software de análise de imagens Image J. Foram medidos o comprimento da pegada (medida do calcanhar até o 3° dedo, a medida do 2° ao 4° dedo e a medida do 1° ao 5° dedo). Estes valores foram inseridos na fórmula do IFC. Quando o valor de IFC é igual a menos cem, significa disfunção total do nervo; e quando o valor é igual

a zero significa função normal, ou seja, quanto mais próximo de zero melhor será a capacidade funcional (Figura 7).



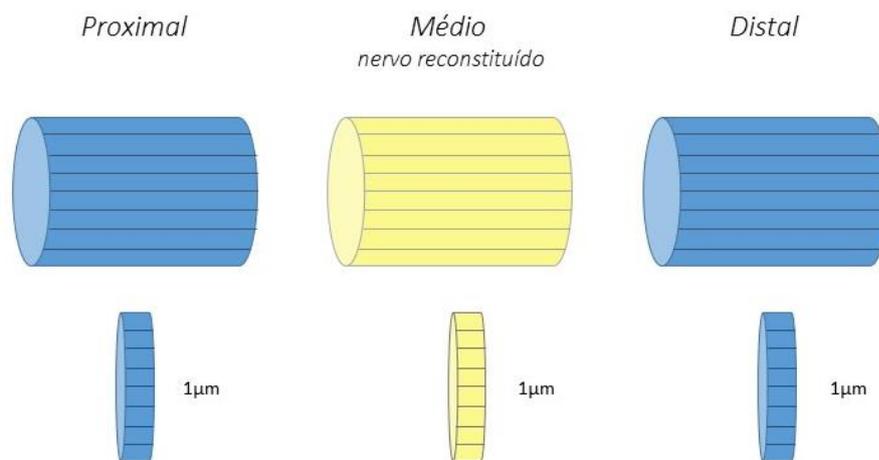
**FIGURA 7.** Esquema da pegada do rato (pata normal A e pata com lesão B), com as medidas nos coxins plantares adotadas para o cálculo do IFC: IT (2° ao 4° dedo), TS (1° ao 5° dedo) e PL (calcanhar até 3° dedo). Fonte: Reis et al., 2009.<sup>76</sup>

#### 4.8.2 Histomorfometria do nervo

##### *Microscopia Óptica - Azul de Toluidina*

Noventa dias após as cirurgias, os ratos foram novamente anestesiados e, a seguir, eutanasiados com sobredose anestésica. O segmento de nervo ciático operado foi ressecado nas regiões de perda de substância nervosa, e em conjunto com uma porção do tecido neural normal tanto proximal como distal, sendo imediatamente fixado por 12 horas em uma solução de 2,5% de glutaraldeído e pós-fixados em tetróxido de ósmio a 1% (OsO<sub>4</sub>) por 2 horas a 4° C. Posteriormente, as amostras foram desidratadas em graduações crescentes de etanol, lavadas com uma solução de óxido de propileno e embebidas em resina Epoxy (Sigma). Secções transversais semi finas de 1µm de cada região (Figura 8) foram obtidas com um ultra micrótomo, transferidas para lâminas de vidro em água, secas em platina a 50°- 60° C e coradas com azul de toluidina a 1% em ácido bórico saturado. Todas as amostras foram analisadas por observador cegado em relação aos grupos de tratamento, em microscópio óptico Zeiss

Axioskop 40 com uma objetiva de 40X e 100X, equipado com uma câmera fotográfica digital QImaging Retiga 2000R (QImaging, Surrey, BC, Canada) acoplada ao microscópio e a um computador. Para a mensuração dos parâmetros histomorfométricos como tamanho da fibra nervosa, espessura da bainha de mielina e número de axônios foi utilizado o software analisador de imagens Image Pro Plus®, versão 6.0 (Media Cybernetics, Rockville, MD, USA).<sup>77</sup> Foi aplicado a ferramenta *Grid Mask* do software utilizando *spacing* horizontal 500 e vertical 400, criando 9 quadrados sobre a imagem. O número de axônios foi contado randomicamente pela seleção de 3 campos em aumento de 400X.



**FIGURA 8.** Secções transversais do segmento do nervo operado e das regiões proximal e distal ao defeito.

## **5 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e expressos pelas médias e desvios-padrão, com auxílio do software SPSS. Quando houve interação do tempo com os grupos, os dados foram analisados pelo software SAS.

A hipótese de que não existe diferença entre os grupos foi rejeitada quando o valor  $p$  foi inferior ao nível de 0,05 de significância. Quando a hipótese nula foi rejeitada, a análise foi complementada pelo teste de comparação Tukey para identificar quais os grupos foram diferentes estatisticamente.

## **6 ASPECTOS BIOÉTICOS**

O trabalho foi realizado com cuidados necessários para minimizar o sofrimento e a dor dos animais do experimento, conforme as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Em todos os procedimentos cirúrgicos, foi utilizada a anestesia anteriormente referida, sendo que a eutanásia foi efetuada por sobredose anestésica (mesmo protocolo utilizado para os procedimentos cirúrgicos) conforme normatiza a lei Arouca (Lei nº 11.794, de 08.10.2008).

## 7 RESULTADOS

### 7.1 Caracterização das membranas e tubos de PLGA *in vitro*

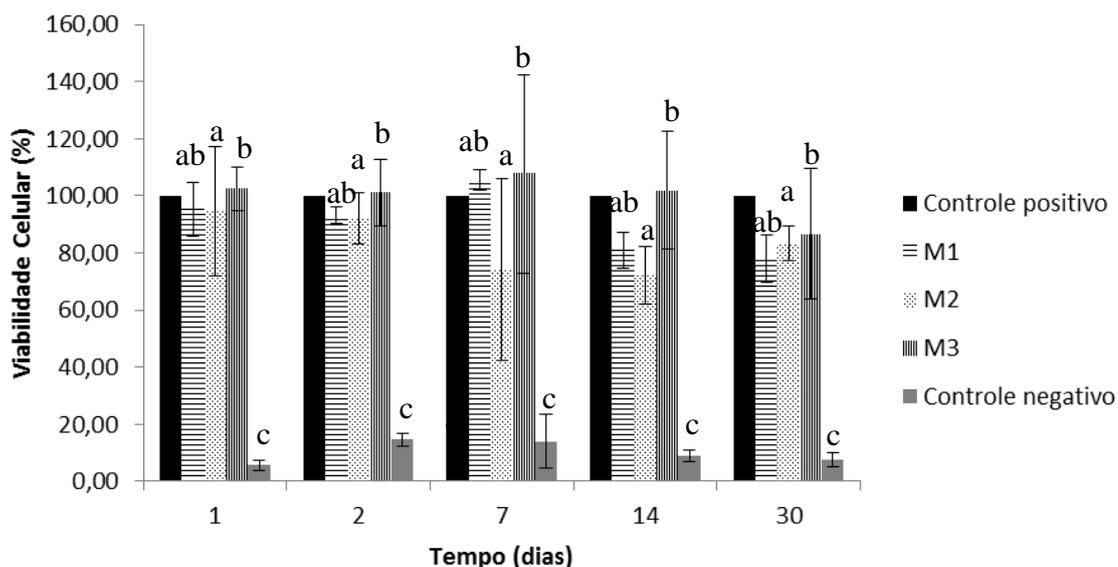
#### 7.1.1 Avaliação do experimento celular - Biocompatibilidade

##### *Ensaio MTT*

A citotoxicidade *in vitro* do PLGA foi avaliada através da viabilidade celular obtida por ensaios com MTT em culturas de células da linhagem NIH 3T3 sobre as três membranas descritas (M1, M2 e M3), em diferentes períodos de tempo de incubação em PBS (1, 2, 7, 14 e 30 dias).

Independentemente do tempo, M2 foi estatisticamente diferente de M3, com  $p=0,026$ . Nos períodos 7 e 14 dias, observa-se uma maior diferença entre as médias dos dois grupos:  $74,12\% \pm 31,88$  (M2) e  $107,79\% \pm 34,75$  (M3) em 7 dias;  $72,17\% \pm 10,28$  (M2) e  $101,89\% \pm 20,70$  em 14 dias.

Todas as amostras apresentaram médias significativamente maiores comparadas ao controle negativo (hipoclorito de sódio) ( $p = 0,000$ ). Na comparação dos grupos, M2 e M3 não foram estatisticamente diferentes de M1 ( $p \geq 0,05$ ); o controle positivo, no qual as células não foram expostas a nenhum material ou aditivo, representou o valor padrão 100% (Figura 9).



**Figura 9.** Citotoxicidade dos biomateriais sobre as células NIH 3T3 obtidas com o ensaio MTT em 1, 2, 7, 14 e 30 dias. Dados representam as médias  $\pm$  DP (n=4). Letras iguais não diferem entre si.

#### *Avaliação coloração DAPI*

A adesão e proliferação celular de células NIH 3T3 sobre as membranas M1, M2 e M3 foi avaliada pelo ensaio DAPI em 24h. O controle positivo (células cultivadas sem exposição aos materiais) foi utilizado como padrão 100% de adesão. Foram calculados os percentuais relativos das três amostras, cujos valores e respectivos desvios-padrão estão na Tabela 1.

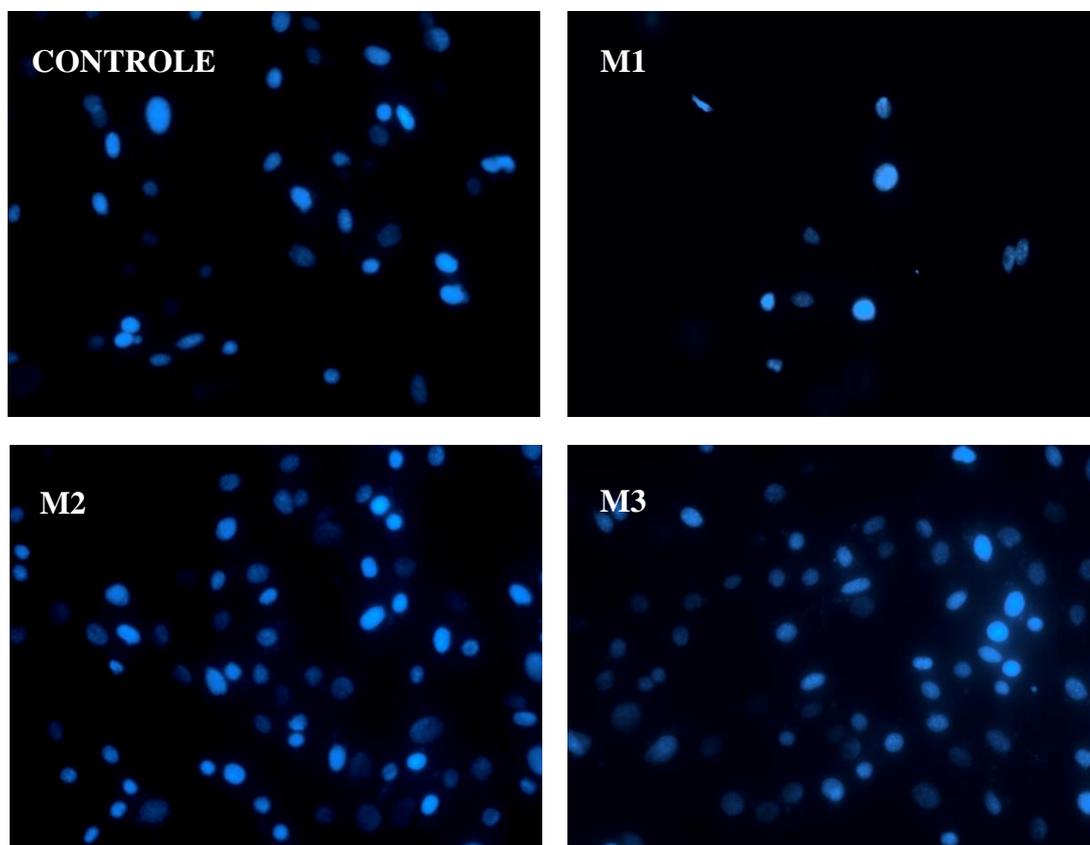
**TABELA 1.** Proliferação das células NIH 3T3 sobre as membranas de diferentes superfícies de PLGA.

<i>Proliferação (%)</i>	<i>n</i>	<i>Média</i>		<i>Desvio-padrão</i>	<i>Valor de p</i>
M1	15	38,60	<b>a</b>	24,07	0,000
M2	15	179,23	<b>b</b>	41,81	
M3	15	174,32	<b>b</b>	19,21	
<b>Total</b>	<b>60</b>	<b>131,31</b>		<b>102,20</b>	

Letras iguais não diferem estatisticamente.

A membrana M1 apresentou o pior desempenho, com média de adesão celular de 38,60%  $\pm$  24,07, diferindo estatisticamente das amostras M2 e M3 ( $p = 0,000$ ), as quais apresentaram resultados acima de 100% de adesão celular em 24h e não foram estatisticamente diferentes entre si (Tabela 1).

Nas imagens com fluorescência, é possível observar a adesão das células NIH 3T3 sobre as membranas e o controle (Figura 10).



**FIGURA 10.** Imagens com coloração fluorescente DAPI. Observa-se uma proliferação maior de células NIH 3T3 sobre as membranas M2 e M3. Aumento de 20X.

#### 7.1.2. Avaliação da biodegradação *in vitro*

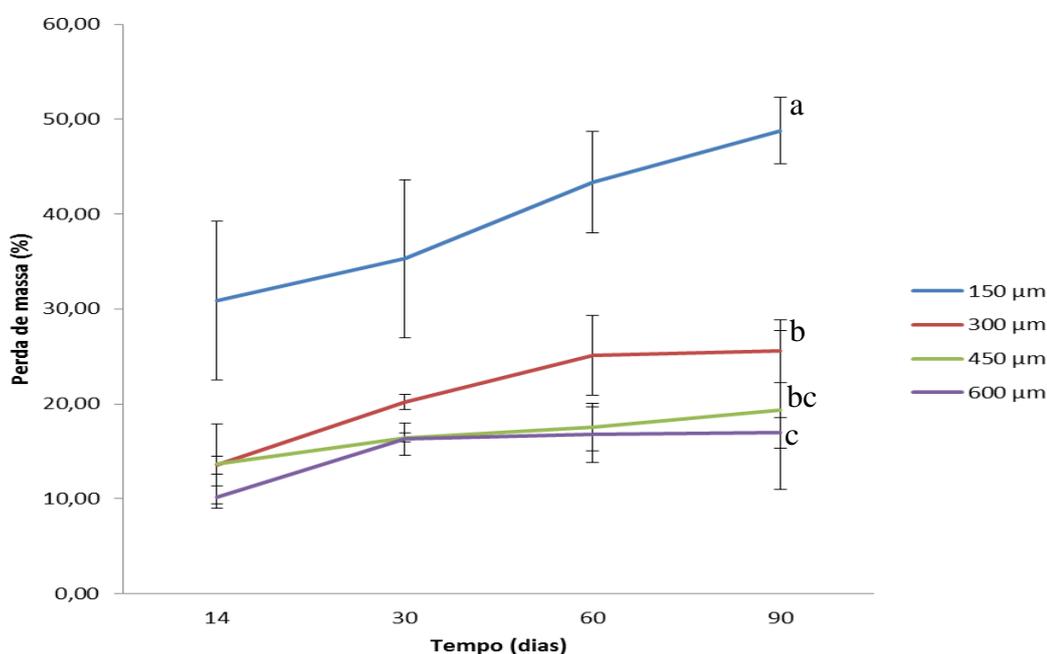
##### *Perda de massa*

Os resultados perda de massa foram obtidos dos tubos de PLGA conforme o tempo em que as amostras estiveram sob ação da degradação hidrolítica, e estão apresentados na Figura 11. Foram comparadas quatro espessuras (150  $\mu\text{m}$ , 300  $\mu\text{m}$ , 450  $\mu\text{m}$  e 600  $\mu\text{m}$ ) para avaliar seus perfis de degradação, com o objetivo de definir quais eram as dimensões mais adequadas para o uso no reparo de nervo periférico em ratos.

A perda de massa da espessura 150  $\mu\text{m}$  foi maior do que os demais grupos, independentemente do tempo, com diferença estatisticamente significativa: 30,90%  $\pm$

8,37( $p = 0,000$ ) em 14 dias,  $35,3\% \pm 8,3$  em 30 dias ( $p = 0,002$ ),  $43,4\% \pm 5,4$  em 60 dias ( $p = 0,000$ ) e  $48,8\% \pm 3,5$  em 90 dias ( $p = 0,000$ ) (Figura 11).

A espessura 300  $\mu\text{m}$  diferiu estatisticamente de 600  $\mu\text{m}$ , independentemente do tempo de degradação, com média de perda de massa de  $25\% \pm 3,3$ . No tempo 14 dias, todas as médias foram significativamente menores do que nos demais períodos ( $p = 0,049$  em 30 dias,  $p = 0,000$  em 60 e 90 dias); As médias de perda de massa de todos os grupos em 90 dias foram significativamente maiores comparadas a 14 e 30 dias, com  $p = 0,000$  e  $0,022$  respectivamente. As espessuras 450  $\mu\text{m}$  e 600  $\mu\text{m}$  apresentaram, em 90 dias, perdas de massa menores que 20%.



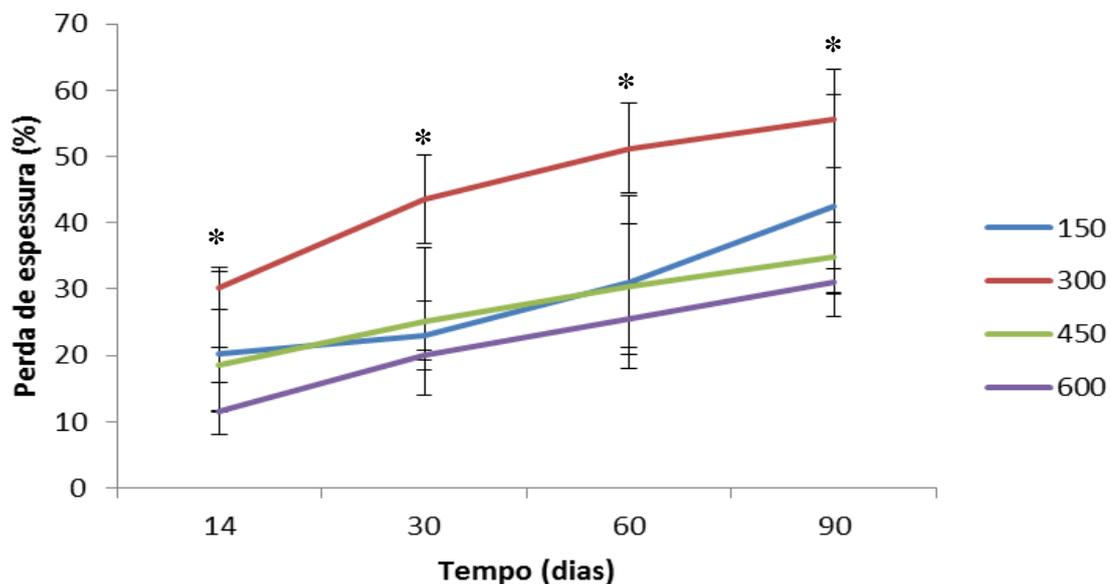
**FIGURA 11.** Perda de massa dos tubos de PLGA em até 90 dias. A= 150  $\mu\text{m}$ ; B= 300  $\mu\text{m}$ ; C= 450  $\mu\text{m}$ ; D= 600  $\mu\text{m}$ . Letras iguais não diferem estatisticamente.

### *Perda de espessura*

A perda de espessura foi mensurada através de microfotografias obtidas por MEV com o auxílio do software analisador de imagens Image Pro Plus® versão 6.0.

Foi observada diferença estatística na espessura 300  $\mu\text{m}$  comparada às demais, com médias menores, independentemente do tempo:  $30,17\% \pm 3,14$ ;  $43,57\% \pm 6,60$ ;

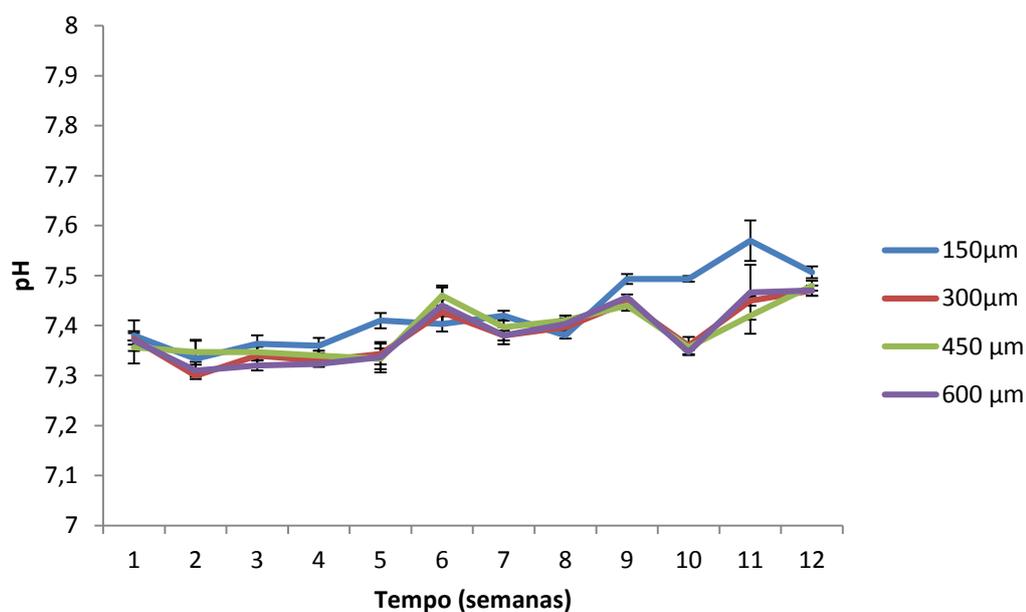
51,27 %  $\pm$  6,71; 55,7 %  $\pm$  7,41. Demais espessuras não apresentaram diferenças significativas e suas médias com respectivos DP estão representadas na Figura 12.



**FIGURA 12.** Perda de espessura (%) em 14, 30, 60 e 90 dias de degradação hidrolítica (incubação em PBS. \* $p = 0,000$ ).

### *Medidas do pH*

O pH da solução PBS na qual os tubos foram incubados, medido semanalmente até 90 dias, apresentou pequenas variações (Figura 13). As variações do pH não foram estatisticamente significativas ( $p = 0,80$ ) ao longo do tempo e permaneceram próximas ao pH neutro (7,4).



**FIGURA 13.** Alterações no PBS removido da incubação dos tubos semanalmente.

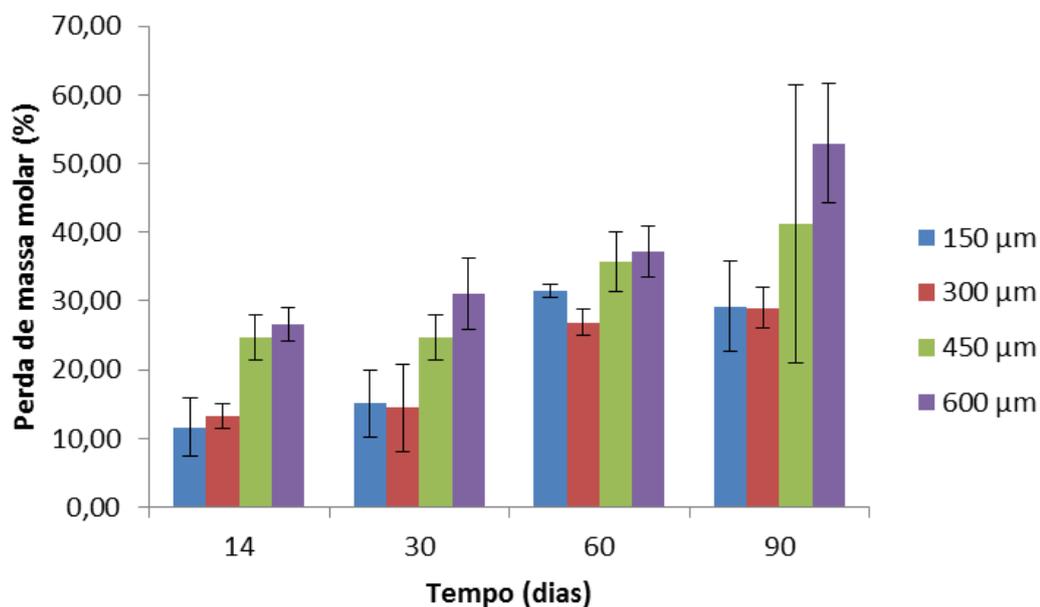
#### *Perda de massa molar*

A perda de massa molar foi avaliada através de cromatografia de permeação em gel (GPC). Houve interação entre grupos e tempo, portanto aplicou-se o software SAS na realização da análise estatística.

As médias e DP de perda de massa molar nas diferentes espessuras estão representadas na Figura 14 e correspondem a: **150 μm** - 11,65 % ± 4,2 (14 dias); 15,14 % ± 4,88 (30 dias); 31,50 % ± 0,99 (60 dias) e 29, 23 % ± 6,47 (90 dias). **300 μm** – 13,19 % ± 1,77 (14 dias); 14,45 % ± 6,29 (30 dias); 26,85 % ± 1,90 (60 dias); 29,00 % ± 3,00 (90 dias). **450 μm** - 24,61 % ± 3,28 (14 dias); 24,61 % ± 3,28 (30 dias); 35,68 % ± 4,35 (60 dias); 41,19 % ± 20,28 (90 dias). **600 - μm** 26,59 % ± 2,35 (14 dias); 31,06 % ± 5,17 (30 dias); 37,12 % ± 3,73 (60 dias); 52,96 % ± 8,62 (90 dias)

A espessura 150 μm apresentou percentual de perda de massa molar estatisticamente menor do que a espessura 600 μm em todos os períodos avaliados ( $p \leq 0,001$ ), exceto em 60 dias no qual esta diferença não foi significativa; também apresentou diferença estatística em relação ao grupo 450 μm em 14 dias ( $p = 0,0017$ ). A espessura 300 μm diferiu dos grupos 450 μm e 600 μm, com menor percentual de perda de massa molar em todos os períodos avaliados ( $p = 0,001$  em 14 dias,  $p =$

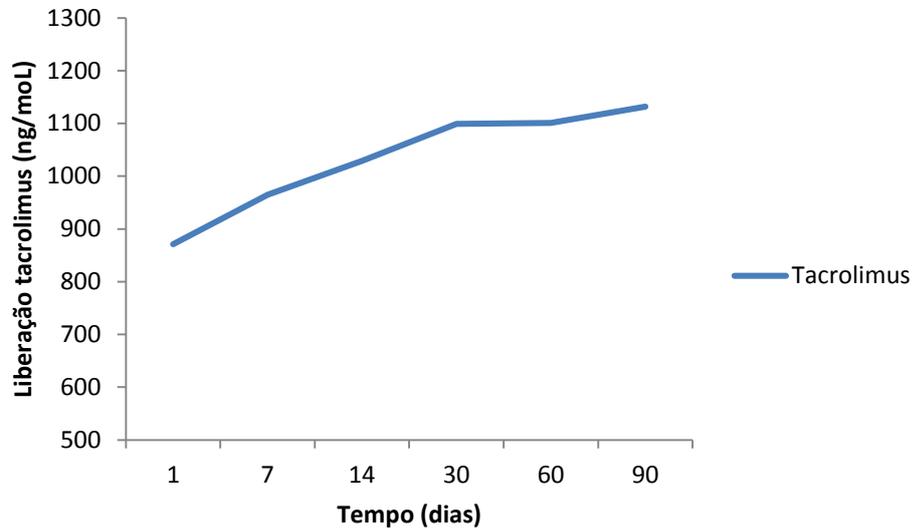
0,0001 em 30 dias,  $p = 0,0254$  em 60 dias e  $p = 0,0001$  em 90 dias). As espessuras 450  $\mu\text{m}$  e 600  $\mu\text{m}$  não foram estatisticamente diferentes (Figura 14).



**FIGURA 14.** Percentual de perda de massa molar em diferentes períodos de degradação (14, 30, 60 e 90 dias).

### *Liberação Tacrolimus*

Foi calculada a liberação acumulada do fármaco tacrolimus obtida por HPLC em ng/moL em 1, 7, 14, 30, 60 e 90 dias após incubação em solução PBS. Observou-se uma liberação inicial alta no primeiro dia (871,05 ng/moL), com diferença estatística em relação aos demais períodos (em 7 dias,  $p = 0,04$ ; 14 dias  $p = 0,03$ ; 30 dias  $p = 0,03$ ; 60 dias  $p = 0,01$  e 90 dias  $p = 0,02$ ) (Figura 15).



**FIGURA 15.** Liberação de tacrolimus *in vitro* após 1, 7, 14, 30, 60 e 90 dias de degradação em PBS.

### *Caracterização Morfológica*

A caracterização da morfologia dos tubos foi obtida por meio de observação macroscópica e através de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

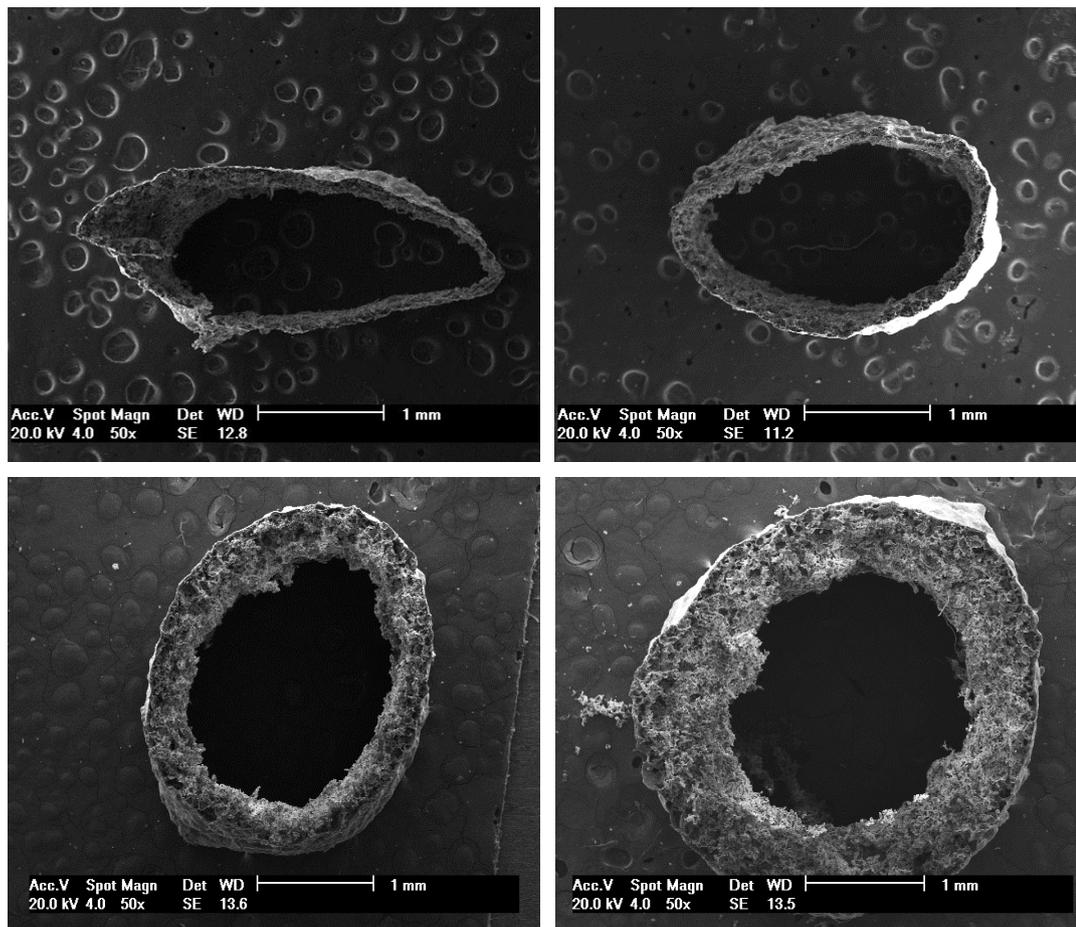
Macroscopicamente, os tubos mantiveram-se íntegros por 90 dias de incubação em PBS; com exceção de duas amostras de 150  $\mu\text{m}$  que se romperam durante o experimento (1 em 60 dias e 1 em 90 dias) (Figura 16).



**FIGURA 16.** Tubo de PLGA poroso nanotexturizado com espessura de 150 $\mu$ m após 90 dias de incubação em solução PBS.

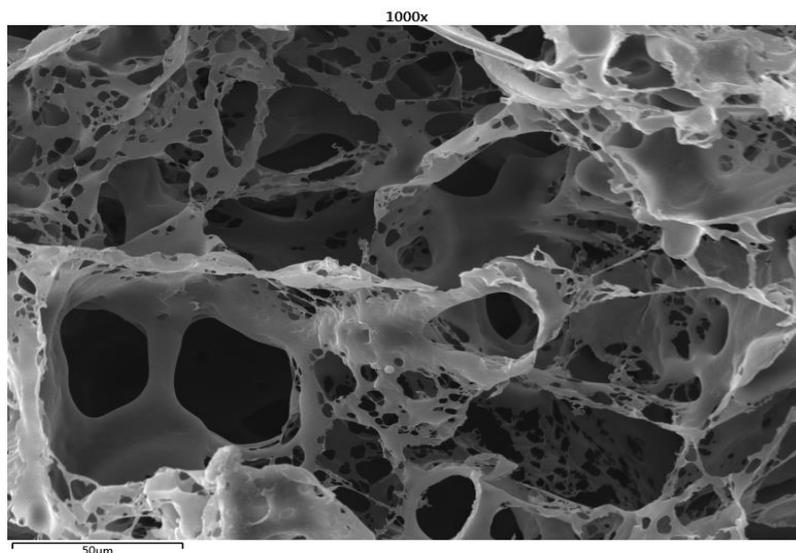
A metodologia utilizada para obtenção de estrutura tridimensional dos tubos foi efetuada com êxito, porém havia irregularidades nas suas dimensões. O comprimento desejado era 12 mm, e esta precisão não foi obtida para todas as amostras, com pequenas variações.

Nas imagens de MEV, observou-se que a estrutura tubular foi mantida nos tubos 300  $\mu$ m, 450  $\mu$ m e 600  $\mu$ m. Tubos com espessura de 150  $\mu$ m, tiveram suas paredes alteradas, apresentando aspecto achatado (Figura 17).



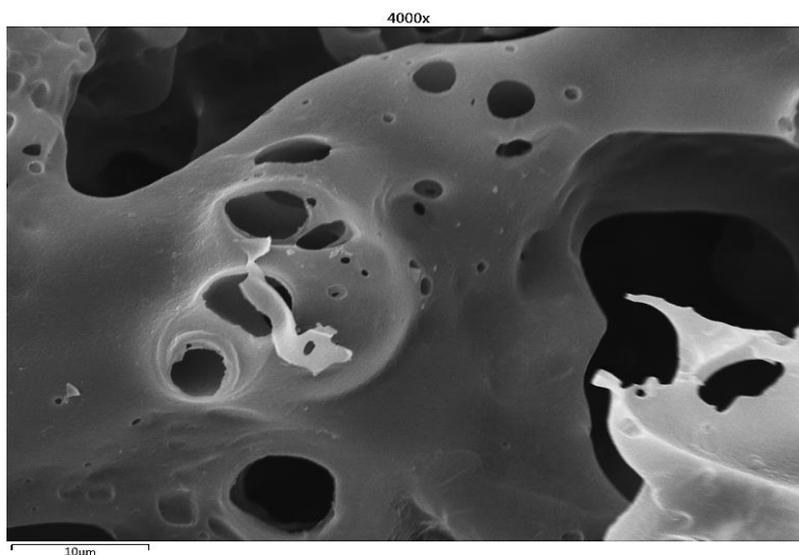
**FIGURA 17.** Tubos de PLGA poroso nanotexturizado com 4 espessuras diferentes após 90 dias de degradação em PBS. Imagens obtidas por MEV. Aumento 50X.

Os tubos apresentaram sinais de degradação, com aumento de área superficial e nanoporosidades (maior porosidade da superfície do material) e erosão em escala micrométrica. Na Figura 18, é possível visualizar as mudanças na morfologia do biomaterial ocasionadas pelo processo de degradação hidrolítica.



**FIGURA 18.** Imagens de MEV, demonstrado a erosão na superfície do copolímero causada pela degradação. Aumento 1000X.

O tamanho dos poros foi mensurado aleatoriamente, com a finalidade de confirmar a presença de poros em escalas nano e micrométricas. Foram obtidas medidas que variaram de 400nm a 180  $\mu\text{m}$ ; os poros apresentavam interconectividade (Figura 19).



**FIGURA 19.** Microfotografia por MEV da superfície do copolímero PLGA nanotexturizado. Na imagem observa-se poros em escalas micrométricas.

### 7.1.3 Avaliação da biocompatibilidade *in vivo*

#### 7.1.3.1 Resultados clínicos e cirúrgicos

O protocolo anestésico aplicado foi efetivo durante a realização de todos os procedimentos cirúrgicos, mantendo os animais sem dor ou qualquer sofrimento. As medicações analgésicas e anti-inflamatórias aplicadas após as cirurgias foram eficazes e mantiveram o bem estar dos animais de modo que fossem capazes de se movimentar para se alimentar e ingerir água. O local onde os biomateriais foram implantados não apresentaram sinais de inflamação, a cicatrização ocorreu de forma adequada e não houve morte de nenhum animal.

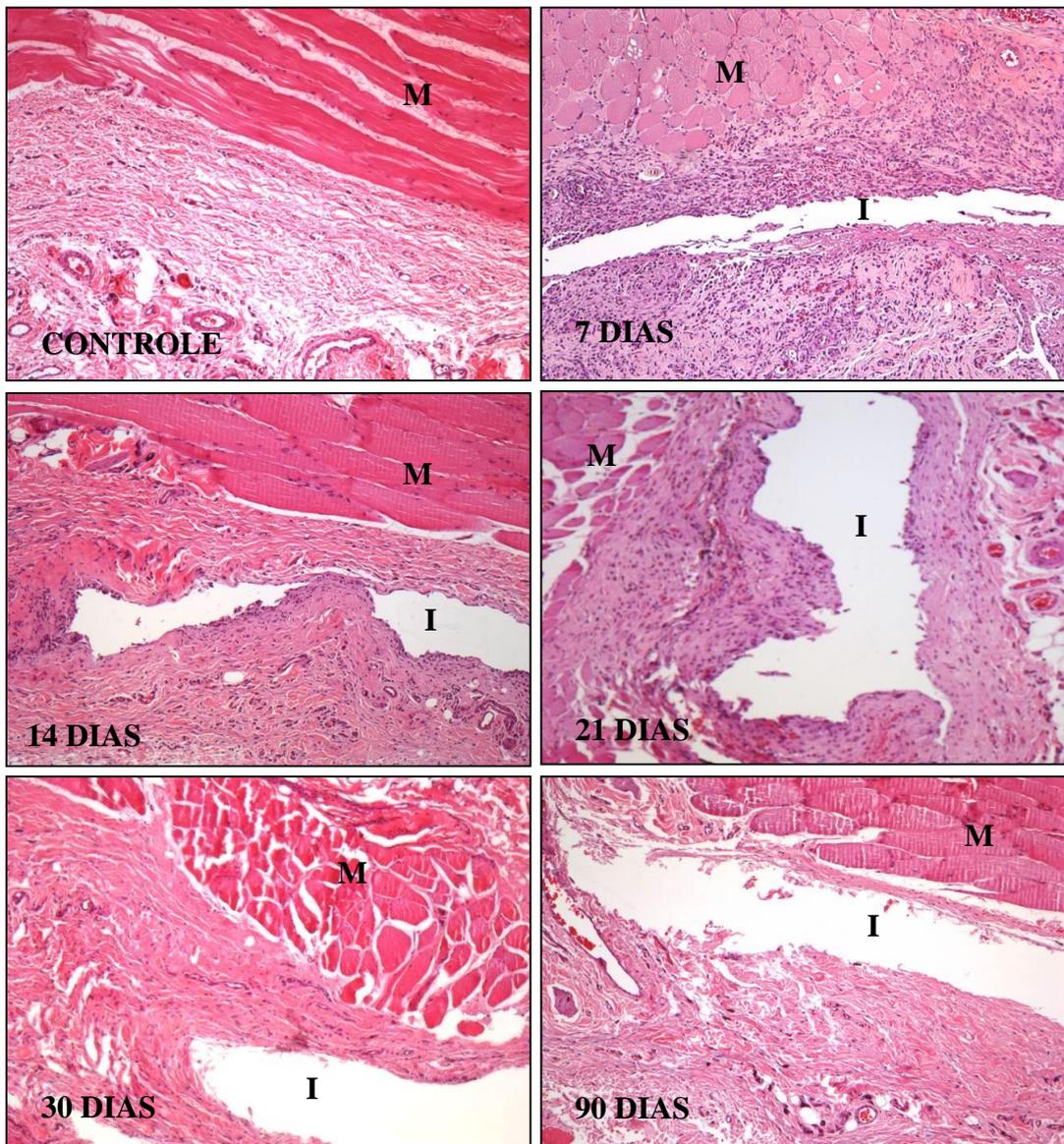
#### 7.1.3.2 Avaliação através da coloração H&E

Foi avaliado o tecido subcutâneo circundante ao copolímero PLGA com e sem tacrolimus nos períodos 7, 14, 21, 30 e 90 dias, para verificar a reação inflamatória aguda e crônica. Não foram observadas diferenças entre os dois biomateriais testados na avaliação por HE; ambos apresentaram respostas inflamatórias muito semelhantes. Portanto a descrição abaixo se refere aos dois grupos testados (Figuras 20 e 21).

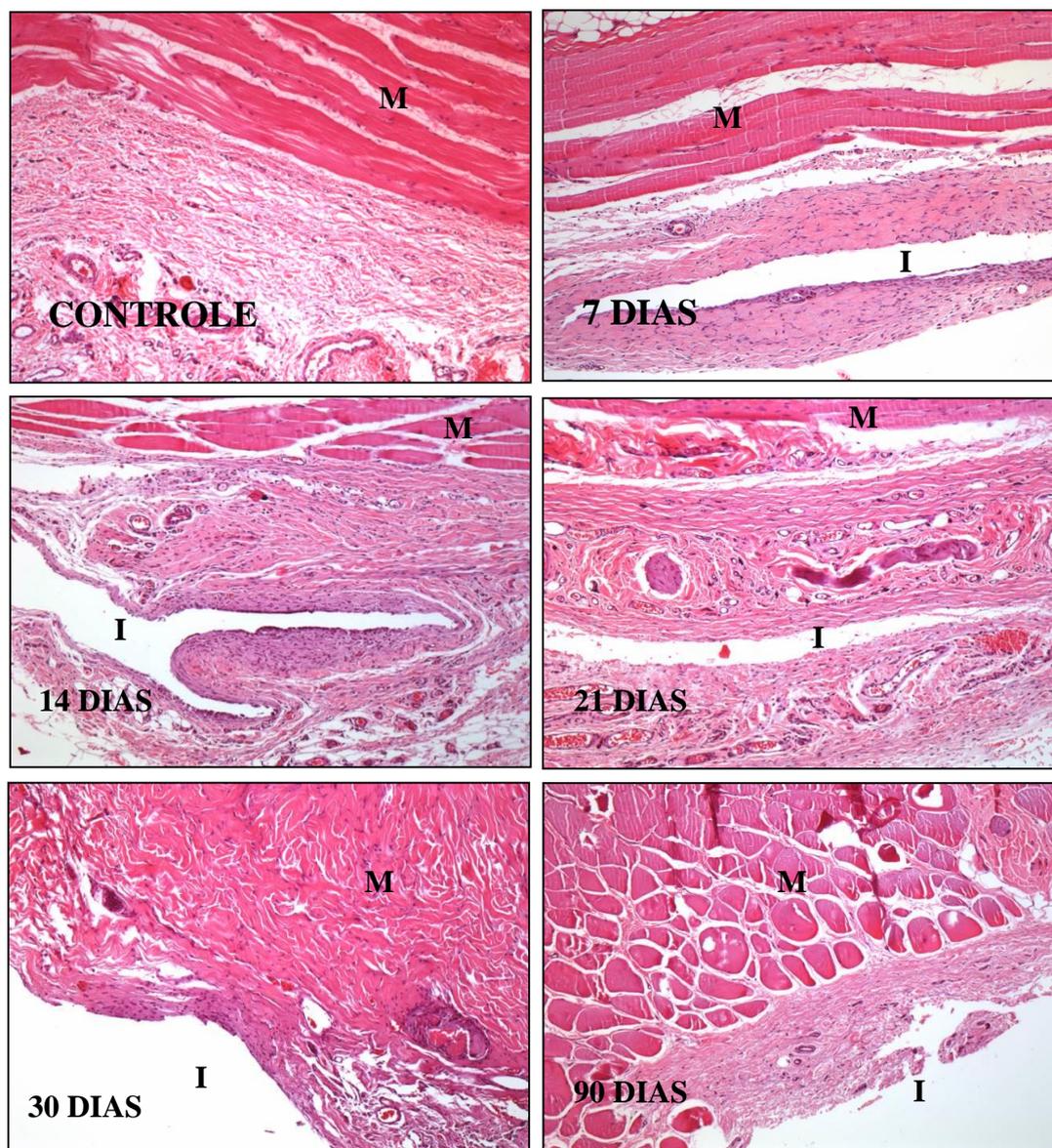
A cicatrização cutânea em todos os períodos no grupo T1 e T2 ocorreu de forma adequada, com aspecto macroscópico e microscópico excelente, o que indica que a técnica cirúrgica utilizada para implantar os biomateriais foi bem-sucedida. Macroscopicamente não foi observado sinais de inflamação na ferida ou presença de exsudato em nenhum dos animais.

Em 7 dias após o implante dos biomateriais, foi observado edema e reação inflamatória aguda, com infiltração de linfócitos e neutrófilos, presença intensa de macrófagos, mastócitos e células gigantes. Em 14 dias, processo inflamatório ainda presente, porém mais discreto e com maior predominância de macrófagos e fibroblastos. Presença de mastócitos na camada muscular. Cicatrização adequada com excelente retração. Em 21 dias, a cicatrização cutânea excelente, inflamação reativa, caracterizada pela presença de macrófagos e fibrose com deposição de colágeno mais madura, típica de reação a corpo estranho. Mastócitos ainda presentes no tecido, porém de forma mais discreta. Em 30 dias, ainda há células inflamatórias, entretanto em

menor número, com reação muito discreta. Presença de macrófagos e células gigantes, possivelmente em resposta à degradação do polímero. Abaixo da camada muscular, observa-se tecido fibroso e presença de mastócitos. Após 90 dias, observa-se colágeno remodelado, e poucos mastócitos. Observa-se ao longo dos períodos avaliados, uma sequência temporal constante, com resposta inflamatória decrescente e colágeno remodelado (material inerte). A presença de mastócitos em todas as fases foi evidenciada em todos os grupos, incluindo o tecido normal (sem implantes).



**FIGURA 20.** Microfotografias do tecido subcutâneo de ratos que receberam implantes de PLGA poroso nanotexturizado (T1) em diferentes períodos (7, 14, 21, 30 e 90 dias pós-cirúrgicos). Aumento 100X. I – implante; M – Camada muscular.

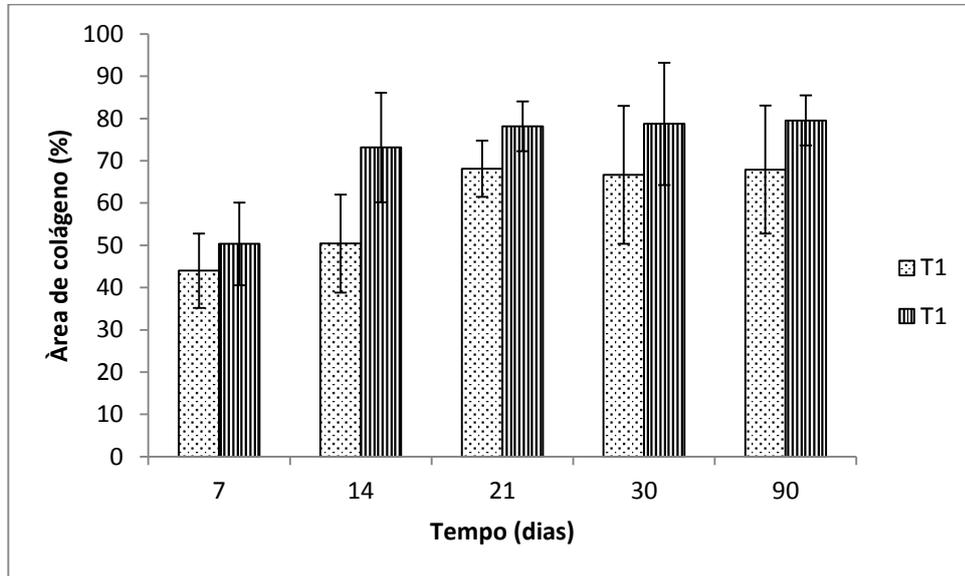


**FIGURA 21.** Microfotografias do tecido subcutâneo de ratos que receberam implantes de PLGA e tacrolimus poroso nanotexturizado (T2) em diferentes períodos (7, 14, 21, 30 e 90 dias pós-cirúrgicos). Aumento 100X. I – implante; M – Camada muscular.

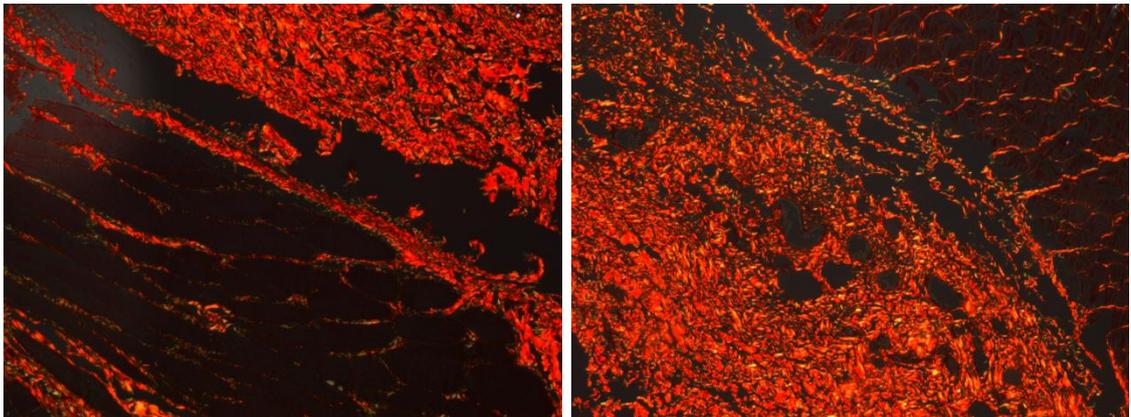
### 7.1.3.3 Histomorfometria – Picro Sirius Red

Quando comparadas as médias dos dois grupos (T1 e T2) nos diferentes períodos (7, 14, 21, 30 e 90 dias) observou-se diferença estatisticamente significativa em 7 dias em relação aos demais períodos, conforme a Figura 22. Independentemente do tempo, T2 foi significativamente superior a T1 ( $p < 0,05$ ). Em 90 dias, T1 e T2

apresentaram médias de  $67\% \pm 13,72$  e  $79\% \pm 5,9$  de área de colágeno, respectivamente (Figura 23).



**FIGURA 22.** Área de colágeno presente no tecido circunjacente ao copolímero PLGA. T1: PLGA poroso nanotexturizado; T2: PLGA poroso nanotexturizado com tacrolimus.



**FIGURA 23.** Microfotografias polarizadas de tecido subcutâneo de ratos, circunjacente aos implantes de PLGA (T1 – imagem da esquerda e T2 – imagem da direita), representando a área de colágeno. Coloração Picro Sirius Red. Aumento 100X.

## 7.2 Viabilidade dos tubos sobre a regeneração nervosa

### 7.2.1 Resultados clínicos e cirúrgicos

O protocolo anestésico aplicado foi efetivo durante os procedimentos cirúrgicos e as medicações analgésicas e anti-inflamatórias administradas após as cirurgias foram eficazes e mantiveram o bem estar dos animais. Não houve sinais de inflamação no sítio da lesão. Houve o óbito de um animal do grupo T2 48h pós-cirúrgico, sem causas definidas.

Após a eutanásia, foi possível avaliar que a técnica de enxerto autólogo foi bem-sucedida, assim como a técnica de tubulização; os tubos estavam interconectados aos cotos do nervo. Pode-se observar que o tecido onde os tubos foram implantados estava fortemente aderido ao biomaterial, o que dificultou a visualização macroscópica do nervo dentro do tubo.

### 7.2.2 Avaliação funcional do nervo periférico

A avaliação funcional do nervo ciático dos ratos foi obtida através do Teste e Marcha, utilizando o índice de função ciática (IFC), antes das cirurgias e em 30, 60 e 90 dias pós-operatórios.

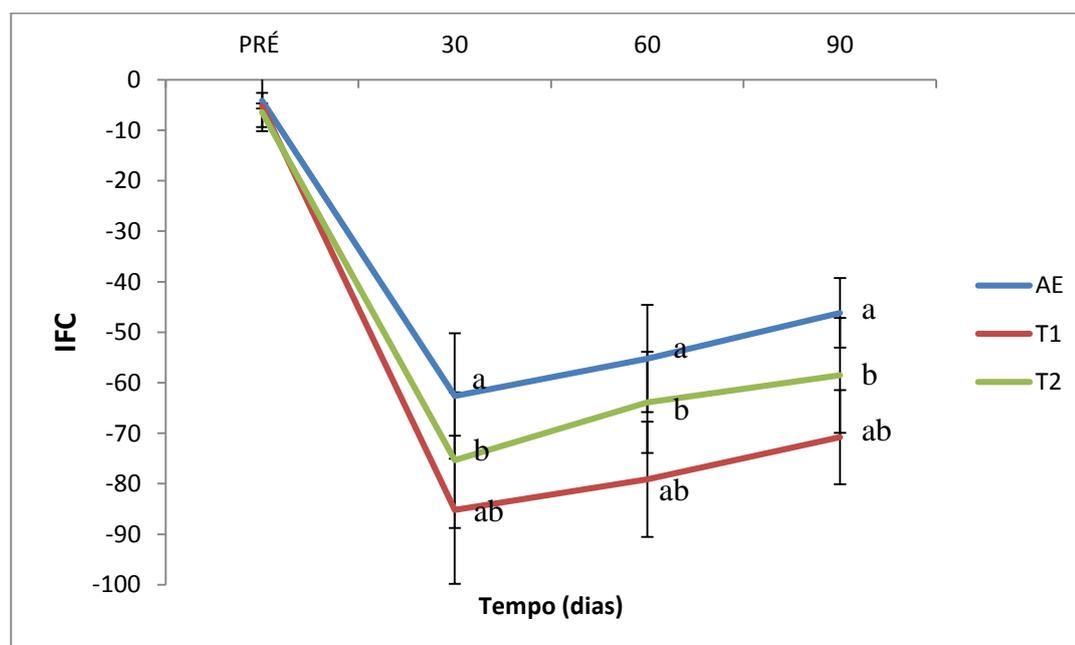
O grupo tratado com o tubo T1 apresentou valores de IFC inferiores ao grupo que recebeu enxerto autólogo (EA) nos três períodos avaliados ( $-85,17 \pm 13,43$ ;  $-79,12 \pm 10,00$ ; e  $-70,78 \pm 11,39$  em 30, 60 e 90 dias respectivamente), e não diferiu estatisticamente do grupo T2. Não foram evidenciadas diferenças estatísticas entre o grupo T2 e EA. Em 90 dias, apresentaram valores de  $-58,54 \pm 9,30$  (T2) e  $-46,16 \pm 6,88$  (Tabela 2 e Figura 24).

**TABELA 2.** Índice de Função Ciática (IFC). Os grupos estão representados por médias e desvios-padrão.

Grupos	Pré-operatório	30 dias	60 dias	90 dias	N
EA	-4,13 ± 5,26 a	-62,62 ± 12,40 a	-55,22 ± 10,61 a	-46,16 ± 6,88 a	5
T1	-5,2 ± 3,79 a	-85,17 ± 13,43 b*	-79,12 ± 10,00 b**	-70,78 ± 11,39 b***	10
T2	-6,41 ± 0,52 a	-75,33 ± 14,65 ab	-63,9 ± 11,41 ab	-58,54 ± 9,30 ab	9

Valores seguidos por letras iguais não diferem estatisticamente.

\* p = 0,0071; \*\* p = 0,0032; \*\*\* p = 0,0021



**FIGURA 24.** Índice de Função Ciática (IFC) avaliado nos grupos AE – enxerto autólogo; T1 – tubo poroso nanotexturizado de PLGA; T2 – tubo poroso nanotexturizado de PLGA e Tacrolimus.

### 7.2.3 Avaliação Histomorfométrica

Análise histomorfométrica foi realizada em cada um dos segmentos dos nervos ciáticos: proximal, médio e distal. Os parâmetros avaliados foram diâmetro da fibra nervosa, espessura da bainha de mielina e número de axônios mielinizados.

a) Segmento proximal

*Diâmetro da fibra nervosa*

No segmento proximal T1 foi significativamente menor do que T2, com valor de  $p = 0,018$ , com médias e DP de  $2,60 \mu\text{m} \pm 0,83$  e  $4,49 \mu\text{m} \pm 1,84$ , respectivamente. A média encontrada no grupo EA foi  $4,10 \mu\text{m} \pm 1,27$ ; e não foi estatisticamente diferente dos demais grupos (Figura 25).

*Espessura da bainha de mielina*

A espessura da bainha de mielina foi estatisticamente maior no grupo EA quando comparado ao grupo T1 ( $p = 0,001$ ); não houve diferenças estatísticas entre T1 e T2, bem como EA e T2. As médias e DP foram EA  $1,39 \mu\text{m} \pm 0,55$ ; T1  $0,44 \mu\text{m} \pm 0,15$  e T2  $0,88 \mu\text{m} \pm 0,53$ . EA apresentou numericamente a maior medida da espessura da bainha de mielina (Figura 26).

*Número de axônios mielinizados*

As médias e DP do número de axônios no grupo EA, T1 e T2 foram  $90,29 \pm 17,66$ ;  $72,15 \pm 28,70$  e  $107,80 \pm 54,0$ , respectivamente. Numericamente, T1 foi o menor resultado e T2 o mais alto número de axônios, porém não foram evidenciadas diferenças estatisticamente significativas entre os três grupos avaliados ( $p = 0,163$ ) – Figura 27.

b) Segmento Medial

*Diâmetro da fibra nervosa*

Neste segmento, T1 foi menor que T2 (0,019). T1 apresentou média  $2,09 \mu\text{m} \pm 0,72$ ; T2  $3,43 \mu\text{m} \pm 1,30$  e EA  $2,95 \mu\text{m} \pm 0,72$ . EA não diferiu estatisticamente de T1 e T2.

### *Espessura da bainha de mielina*

Na comparação dos grupos quanto à espessura da bainha de mielina no segmento medial, foi possível constatar que o grupo T1 apresentou menor média com significância estatística ( $0,29 \mu\text{m} \pm 0,08$ ) quando comparado ao grupo EA ( $0,86 \mu\text{m} \pm 0,20$ ) e ao grupo T2 ( $0,61 \mu\text{m} \pm 0,36$ ), com  $p = 0,001$  e  $p = 0,022$ , respectivamente. O grupo EA obteve maior média, porém não diferiu estatisticamente do grupo T2 (Figura 26).

### *Número de axônios mielinizados*

Na Figura 27 podemos observar que os três grupos não foram estatisticamente diferentes, cujas médias correspondem a: EA  $92,29 \mu\text{m} \pm 27,70$ ; T1  $51,29 \mu\text{m} \pm 46,10$  e T2  $72,55 \mu\text{m} \pm 34,71$  ( $p = 0,165$ )

### c) Segmento Distal

#### *Diâmetro da fibra nervosa*

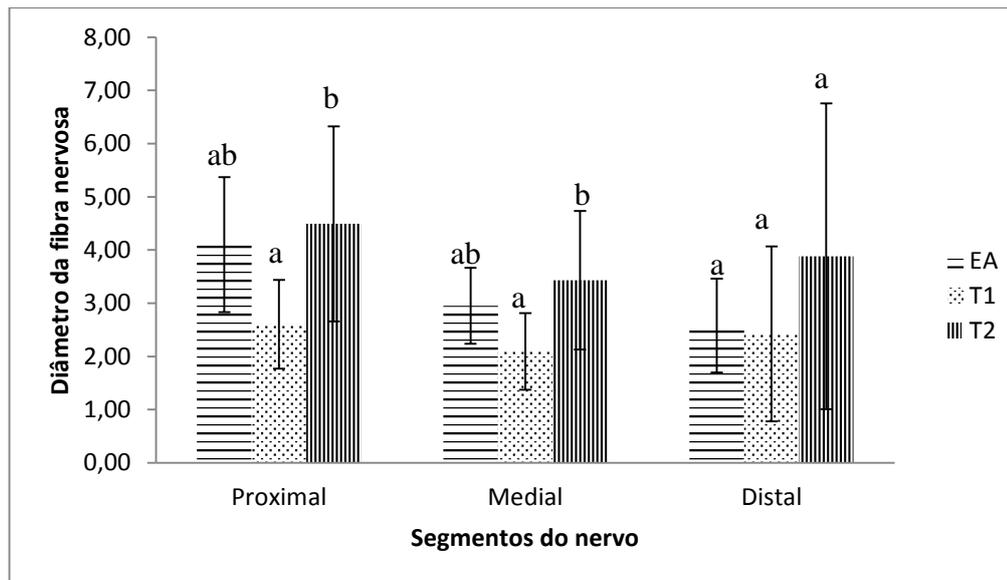
No segmento distal não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os três grupos experimentais ( $p = 0,304$ ) quanto ao diâmetro da fibra nervosa. As médias e DP estão representadas na Figura 25.

### *Espessura da bainha de mielina*

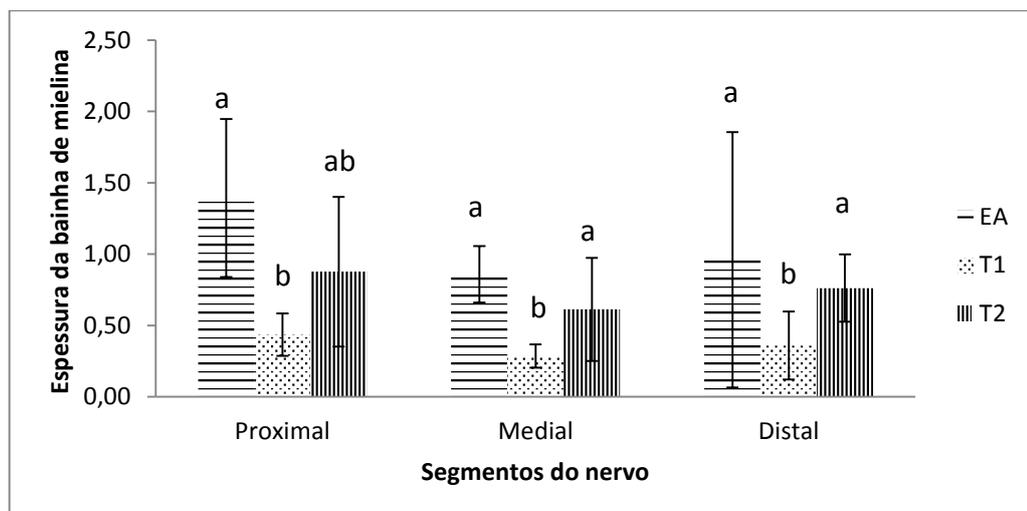
Na comparação da espessura da bainha de mielina, semelhante ao segmento medial, também foi encontrada diferenças estatísticas entre o grupo em que o reparo foi realizado com tubo T1 e os demais grupos (EA com  $p = 0,000$  e T2 com  $p = 0,002$ ); as médias e DP podem ser visualizadas na Figura 26.

### Número de axônios mielinizados

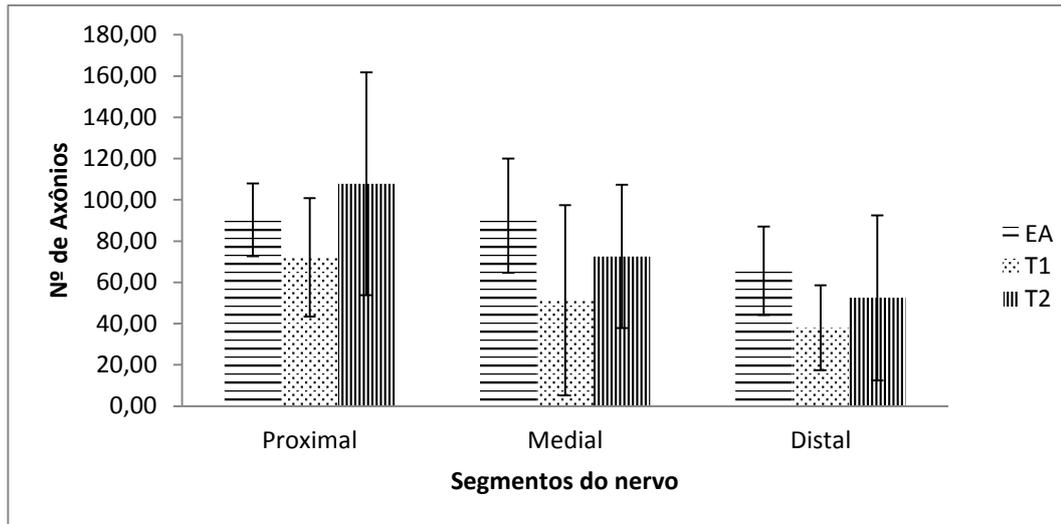
Não foram evidenciadas diferenças estatísticas entre os três grupos suas médias e DP foram  $65,67 \mu\text{m} \pm 21,41$  (EA);  $38,00 \mu\text{m} \pm 20,59$  (T1) e  $52,52 \mu\text{m} \pm 40,00$  (T2). Os dados estão expostos na Figura 27.



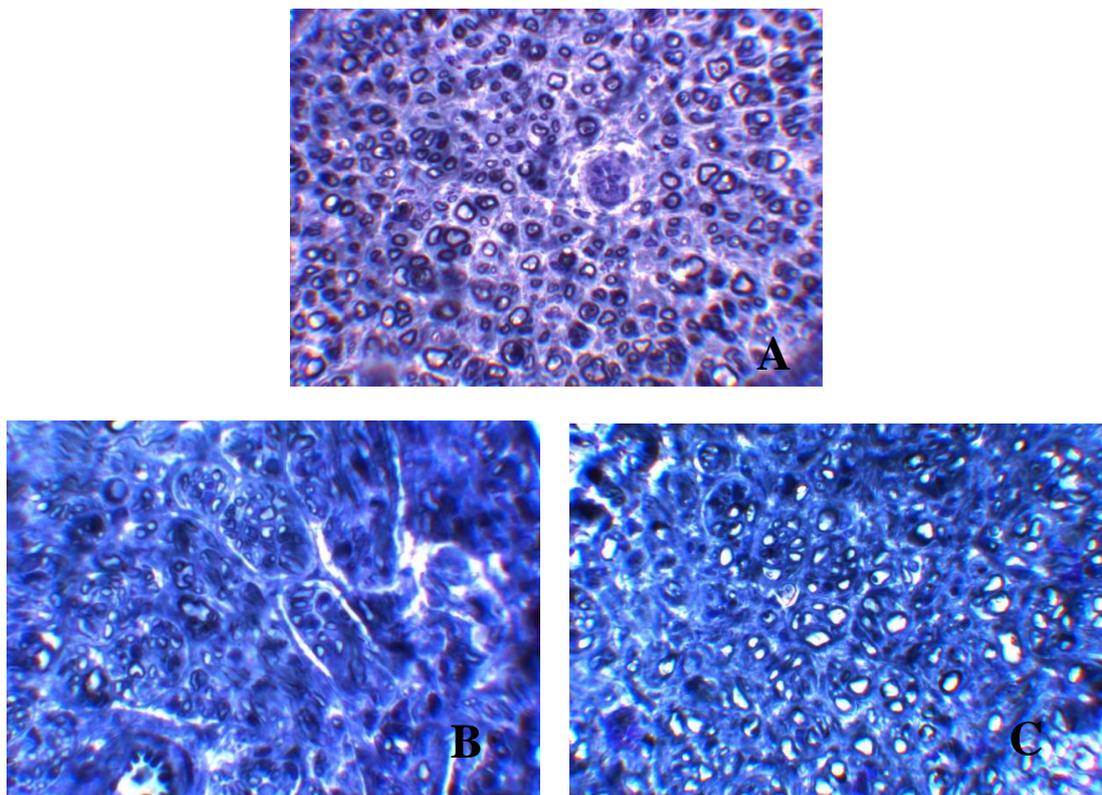
**FIGURA 25.** Diâmetro da fibra nervosa após o período de 90 dias pós-cirúrgico. Letras iguais não diferem estatisticamente.



**FIGURA 26.** Espessura da bainha de mielina após o período de 90 dias pós-cirúrgico. Letras iguais não diferem estatisticamente.



**FIGURA 27.** Número de axônios mielinizados após o período de 90 dias pós-cirúrgico.  $p \geq 0,05$ .



**FIGURA 28.** Segmentos distais dos grupos EA (A), grupo T1 (B) e grupo T2 (C), com coloração azul de toluidina. Aumento de 1000X. Observa-se bainhas de mielina mais espessas no grupo A e B em relação grupo C.

## 8 DISCUSSÃO

Traumatismo em nervos periféricos resultam em déficit sensitivo e disfunção funcional, e raramente o reparo nervoso ocorre sem a intervenção cirúrgica. Quando há perda de substância nervosa, as sequelas são mais graves e muitas vezes permanentes; observa-se o aumento da dor e morbidade dos pacientes, diminuindo substancialmente sua qualidade de vida, ocasionando incapacitação física, perda parcial ou total das atividades produtivas e gerando grande impacto socioeconômico.

O transplante autólogo de nervo periférico continua sendo considerado o padrão-ouro no reparo de transecções com perda de substância nervosa, para qual a neurografia não é indicada. Possui características de histocompatibilidade e capacidade de promover e guiar o crescimento axonal, porém não apresenta resultados satisfatórios e possui limitações como a necessidade de realização de dois procedimentos cirúrgicos em locais distintos, maior morbidade e a escassez de sítios doadores, e déficit sensitivo resultante na área doadora.<sup>(16, 39)</sup>

Nos casos em que a extensão da lesão impossibilita a simples reunião dos cotos (neurografia), uma técnica de reparo disponível e vastamente empregada é a tubulização. Essa técnica, também chamada entubulação, é um procedimento cirúrgico em que os cotos nervosos seccionados são introduzidos e fixados dentro de uma câmara tubular, com a finalidade de propiciar um ambiente favorável à regeneração. Proporciona, ainda, o direcionamento do crescimento nervoso das extremidades rompidas ou seccionadas<sup>(2, 4)</sup>, protegendo as fibras nervosas do tecido cicatricial e evitando a formação de neuroma<sup>(5)</sup>. A tubulização apresenta outra característica interessante: ela pode ser otimizada com acréscimo de fatores regenerativos.<sup>(36, 60, 79)</sup>

Sabe-se que o reparo tecidual requer uma complexa interação entre células, matriz extracelular e fatores tróficos, sendo todos importantes elementos envolvidos na regeneração nervosa<sup>(9)</sup>. Consequentemente, a terapia celular e a engenharia de tecidos vêm recebendo grande atenção nas últimas décadas, e são amplamente utilizadas em diferentes áreas.<sup>(34, 80)</sup>

Há uma grande variedade de materiais, biodegradáveis ou não, que podem ser utilizados como alternativas terapêuticas para promover a regeneração por meio da tubulização. Os tubos de silicone, por exemplo, foram aprovados em ensaios clínicos para reparar falhas do sistema nervoso de 3-5 mm, o que demonstra o relativo

sucesso.<sup>(81-83)</sup> No entanto, existem alguns problemas na utilização de tubos de silicone, tais como a compressão crônica do nervo, neuromas, resposta inflamatória e fibrótica elevada, contribuindo para a limitação funcional nervosa, além da impermeabilidade nutricional e necessidade de uma segunda intervenção cirúrgica para a retirada do tubo. Estes resultados direcionam a busca por uma câmara de regeneração nervosa que seja confeccionada a partir de biomateriais capazes de serem reabsorvidos pelo organismo concomitantemente ao processo de regeneração do tecido nervoso periférico.<sup>(14, 40, 82)</sup>

Adicionalmente, a utilização de um guia artificial permite a criação de um microambiente favorável a utilização de substâncias neurotróficas e neuroprotetoras, enriquecendo a câmara de regeneração. Atualmente os estudos têm se concentrado na escolha dessas substâncias e vias de aplicação que possam maximizar seu efeito localmente. A combinação do copolímero PLGA e do fármaco tacrolimus se encaixa nesse contexto, podem otimizar o crescimento axonal e recuperação funcional de lesões em nervos periféricos.

O presente estudo foi conduzido em duas etapas: a primeira caracterizou o copolímero PLGA poroso nanotexturizado (contendo ou não o fármaco tacrolimus) quanto a biocompatibilidade *in vitro* e *in vivo*, e a biodegradação *in vitro*; na segunda etapa, o copolímero foi avaliado como uma câmara de regeneração de nervo periférico em modelo animal de lesão do nervo ciático em ratos.

A viabilidade das membranas de PLGA avaliadas apresentaram médias estatisticamente diferentes do controle negativo. A membrana M2 (PLGA poroso nanotexturizado) foi significativamente menor, independente do tempo, em relação à membrana M3 (PLGA poroso nanotexturizado com tacrolimus). Suas médias em 7 dias de incubação foram 74,12% e 107,79% respectivamente. Em 14 dias, também foi observada uma diferença entre as duas membranas, cujas médias foram 72,17% (M2) e 101,89% (M3).

Quanto à adesão celular, pode observar a membrana M1 como uma superfície não favorável para a proliferação de células NIH 3T3. Sua estrutura possui poros somente na superfície. *Scaffolds* tridimensionais, com poros interconectados, são desejáveis para facilitar a adesão e cultivo celular, para serem utilizados como matrizes temporárias na engenharia de tecidos e medicina reconstructiva.<sup>(70, 84)</sup> Na caracterização morfológica do PLGA poroso nanotexturizado, evidenciou-se a presença de poros em escalas micro e nanométricas e suas interconexões.

Considerando que os tecidos são feitos de componentes nanoestruturados, polímeros com estas características simulam melhor as condições naturais do organismo. Segundo Thapa<sup>(7)</sup> e colaboradores, que testaram diferentes biomateriais na reconstrução de bexiga, há evidências de que a adesão de células musculares lisas é aumentada em superfícies com escalas nanométricas. Também revelaram que a rugosidade superficial do polímero nanométrico foi fundamental para que isso ocorresse.

A membranas M2 e M3, confeccionadas com tratamento de NaCl e NaOH, sem e com incorporação de tacrolimus, demonstram ser uma ótima superfície para crescimento e adesão celular, o que pode ser explicado pela presença de nanoporos tridimensionais criados pelo tratamento com NaCl aliado à nanofuncionalização obtida através da adição de NaOH, que permite que a superfície do material se torne hidrofílica, o que favorece a adsorção de nutrientes e adesão celular.

Park et. al.<sup>(61)</sup> compararam estruturas de PLGA tratados e não tratados com NaOH, e seus resultados demonstraram que o número de condrócitos, proteínas e matriz extracelular foi significativamente maior no PLGA tratado com NaOH. Atribuíram os resultados às características observadas neste tipo de superfície, área de superfície aumentada e mais hidrófila, maior porosidade e em escalas nanométricas, o que aumenta a eficácia do biomaterial na aplicação em engenharia de tecidos.

Na avaliação da área de colágeno através do microscópio óptico polarizado, independente do tempo, T2 foi significativamente superior a T1 ( $p < 0,05$ ). Em 90 dias, T1 e T2 apresentaram médias de  $67\% \pm 13,72$  e  $79\% \pm 5,9$  de área de colágeno, respectivamente. A coloração picro sirius red combinada à microscopia de polarização tem sido amplamente utilizada na avaliação de fibras de colágeno para determinar seu conteúdo quantitativamente. O colágeno apresenta-se com coloração vermelha e as células aparecem verdes; o colágeno expõe-se com aparência brilhante, pois é birrefringente, devido à sua organização molecular anisotrópica (meio óptico no qual as propriedades do objeto dependem da direção). No presente estudo foi quantificada a área de colágeno que representou o índice de biocompatibilidade.<sup>(85, 86)</sup> Após uma intervenção cirúrgica, como foi o caso no presente estudo, para implantação dos biomateriais nos animais, a área de colágeno não será mais reestabelecida 100%. Portanto, o material T2 (PLGA/tacrolimus) apresentou bons resultados, sugerindo que

esta associação é superior ao biomaterial isolado e favorece a reposição do colágeno e reconstituição tecidual.

Na avaliação da biocompatibilidade do copolímero PLGA *in vivo*, foi possível observar uma resposta inflamatória aguda, com presença de granulomas e células gigantes com grande expressão em 7, 14 e 21 dias. Constata-se também, que esta resposta inflamatória é mais discreta no períodos subsequentes (30 e 90 dias).

Estudos semelhantes que avaliaram implantes subcutâneo de PLGA-polyhexylthiophene demonstraram diminuição da inflamação ao longo do tempo, sendo observadas estruturas de tecido bem organizadas e a deposição de colágeno. Sugerem que o biomaterial é promissor para várias aplicações clínicas.<sup>(87)</sup>

A estrutura porosa do PLGA permite melhor nutrição ao nervo e, ao mesmo tempo, apresenta uma barreira para a infiltração de produtos indesejáveis.<sup>(5)</sup> A vantagem do PLGA em reação a outros polímeros biodegradáveis, tal como poli (L-ácido lático), PLLA, por exemplo, é um menor tempo para a sua completa degradação, o que implica uma menor probabilidade de reações adversas.

Na avaliação da biodegradação, foi observado ao final do experimento (90 dias) que as espessuras 450  $\mu\text{m}$  e 600  $\mu\text{m}$  apresentaram, em 90 dias, perdas de massa menores que 20%. Considerando 90 dias o tempo de recuperação de lesão em nervo periférico de ratos, estas dimensões parecem ser mais adequadas para esta finalidade. A espessura 150  $\mu\text{m}$  apresentou maior degradação em relação às demais, com valores significativos. Dois espécimes desta espessura apresentaram deformações na sua estrutura, com rupturas nas suas paredes. Possivelmente tubos com esta espessura não seriam adequados para aplicação no reparo nervoso de ratos. Os resultados na perda de espessura equivalem aos de perda de massa, com diferenças estatísticas. Os dados indicam que a espessura influencia no perfil de degradação e que a menor espessura testada neste experimento tem degradação mais acelerada.

Na avaliação da perda de massa molar, a espessura 150  $\mu\text{m}$  deferiu estatisticamente de 600  $\mu\text{m}$ , exceto no período de 60 dias. Também diferiu estatisticamente da espessura 450  $\mu\text{m}$  em 14 dias.

A degradação de poliésteres bioabsorvíveis normalmente ocorre por uma reação de hidrólise que quebra as ligações ésteres, resultando na formação de ácido carboxílico e grupos que agem como catalisadores da reação.<sup>(88, 89)</sup> O mecanismo de degradação hidrolítica pode ser classificado de duas maneiras: degradação de

superfície e degradação estrutural. No primeiro mecanismo, ocorre a degradação na superfície do material, com perda de massa e tamanho. No segundo mecanismo, a degradação ocorre uniformemente na direção vertical em relação à superfície, que resulta em perda de massa molecular.<sup>(90)</sup>

Para avaliar a viabilidade como câmara de regeneração de nervo periférico dos dois tipos de tubos aplicados no presente estudo, foi realizado um defeito de 10mm em nervo ciático de ratos e avaliada a regeneração nervosa em 90 dias pós-cirúrgicos. Como grupo controle, foi utilizado a técnica de reparo com enxerto autólogo.

Os dois tratamentos foram inseridos na mesma técnica de reparo, tubulização, onde foi possível observar que o efeito do tacrolimus foi positivo sobre o reparo de nervo ciático de ratos no período de 90 dias pós-cirúrgicos. Nos três segmentos do nervo avaliados – proximal, medial e distal, houve diferenças entre os grupos nos parâmetros analisados. Ao comparar o diâmetro da fibra nervosa entre os grupos (EA, T1 e T2), as médias do grupo T2 foram significativamente maiores nos segmentos proximal e medial em relação ao T1, enquanto que EA não foi estatisticamente diferentes dos demais grupos. Não existe na literatura a combinação do copolímero PLGA e do fármaco tacrolimus. Contudo, Li et al.<sup>(10)</sup> desenvolveram um conduto para o nervo composto de quitosana e tacrolimus, e encontraram resultados semelhantes ao presente estudo. Segundo os autores, seus resultados indicam que a incorporação do fármaco ao biomaterial durante a fabricação do tubo, foi favorável na minimização da resposta inflamatória e acelerou a reinervação das fibras mielinizadas em 8 semanas. Encontraram valores significativamente maiores no diâmetro da fibra nervosa no tubo contendo tacrolimus, semelhante aos dados encontrados nesse estudo.

Os efeitos do imunossupressor tacrolimus incluem a elevação da taxa de regeneração axonal (alongamento axonal pode ser resultado de uma estimulação da síntese de NGF)<sup>(9, 47, 49)</sup>, aumento do comprimento do axônio regenerado e o grau de mielinização. No presente estudo, o grupo tratado com tubo de PLGA sem tacrolimus, apresentou espessura da bainha de mielina com diferenças significativas em relação ao tubo de PLGA e tacrolimus, o que indica a ação neurotrófica de tacrolimus sobre a regeneração nervosa. O grupo T1 apresentou valores significativamente menores no segmento proximal comparado ao EA; nos segmentos medial e distal foi significativamente menor comparado ao EA, e também em relação ao grupo T2.

O número de axônios não foi estatisticamente diferente em nenhum dos segmentos na comparação dos três grupos.

Na avaliação funcional, na qual obteve-se o índice de função ciática (IFC) em 30, 60 e 90 dias pós-cirúrgicos, foi observada diferenças estatísticas nos três períodos avaliados entre EA e T1, tendo o último as menores médias. Em 90 dias, as médias e DP foram  $-46,16 \pm 6,88$ ;  $-70,78 \pm 11,39$  e  $-58,54 \pm 9,30$  nos grupos EA, T1 e T2, respectivamente. T1 e T2 não foram significativamente diferentes, porém T2 também não diferiu do grupo padrão-ouro (EA).

Azizi e colaboradores<sup>(9)</sup> afirmaram que o tacrolimus aplicado localmente, junto a um enxerto de veia safena, favorece a recuperação funcional e os índices histomorfométricos de nervo ciático. Os autores utilizaram um volume de 10mL com concentração de 10ng/mL do fármaco, totalizando 100ng de tacrolimus aplicado. A principal vantagem da utilização de tacrolimus é o seu elevado potencial imunossupressor, permitindo o melhoramento das taxas de regeneração neuronais *in vivo* e *in vitro*.<sup>(53)</sup>

Uma das limitações do presente estudo, que se inclui dentro das melhorias a serem desenvolvidas para uma aplicação mais eficiente e segura da câmara de regeneração nervosa desenvolvida e testada, é a ausência de métodos mais precisos para confeccionar os tubos e incorporar o fármaco. Sua liberação não ocorreu de forma constante, o que sugere que sua distribuição pode não ter sido homogênea.

A quantidade de tacrolimus incluída na preparação do tubo foi de 165 mg. Na avaliação *in vitro* da liberação de tacrolimus em PBS, houve uma alta liberação inicial no primeiro dia de 871,05ng/mL, e a liberação acumulada foi de 964,78 em 7 dias, 1029,11 em 14 dias, 1098,94 em 30 dias, 1101,0 em 60 dias e 1131,66 no final do experimento, em 90 dias. Diferentes doses foram avaliadas em estudo experimental, (0,2 ; 0,5, 1 ; 2; 5 ou 10 mg / kg ), porém os autores não encontraram diferenças estatísticas entre elas, que foram diferentes do controle (solução salina).

Udina et al. testaram diferentes doses (0,2 e 5 mg / kg) de tacrolimus em modelo de esmagamento de nervo periférico e não encontraram diferenças no efeito sobre brotamento de axônios nociceptivos. Indicam, ainda, que o fármaco melhora a recuperação funcional.

Nesse contexto, mais estudos são necessários para encontrar a dose ideal de tacrolimus para promover a regeneração de nervos periféricos.<sup>(46)</sup>

Tacrolimus atua como um fator neurotrófico para aumentar a taxa de regeneração do axônio e contribuindo para mais rápida recuperação neurológica.<sup>(48, 50, 51, 53)</sup>. Essa ação está ligada à imunofilina FKBP- 52, e não a FKBP -12 ( responsável pelas ações imunossupressoras).<sup>(46, 51, 52)</sup>

Semelhante à ciclosporina A, o tacrolimus tem o poder de inibir a calcineurina, através da supressão da função de células T, e exerce a sua ação neuroprotetora *in vitro* e *in vivo*. Apenas o tacrolimus, no entanto, aumenta regeneração do nervo *in vivo*.<sup>(9, 46)</sup> Diversas vias intracelulares, tais como imunossupressão, homeostase do cálcio, neuroproteção e neuroregeneração fazem do tacrolimus (FK506) candidato para melhorar a reparação de nervos.<sup>(52)</sup>

Os dados apontam para um melhor desempenho do tubo T2 (tubo PLGA poroso nanotexturizado contendo tacrolimus). Recentemente, estudos têm demonstrado a atividade neuroprotetora e neurotrófica do fármaco, com importante papel promotor na reinervação e recuperação funcional após lesão de nervos periféricos.<sup>(9, 10, 48)</sup> Sua administração sistêmica, em conjunto com tubulização ou utilização de enxerto autólogo, promove um aumento da taxa de regeneração do nervo e grau de recuperação funcional, porém, apresenta efeitos colaterais, tais como nefrotoxicidade, hipertensão, hiperestesia, fraqueza muscular e sintomas gastrintestinais, ocasionados por seu mecanismo não seletivo. Estes efeitos tornam-se fatores limitantes para sua aplicação clínica no reparo de lesão em nervo periférico.<sup>(9, 10)</sup>

Sua aplicação localizada é capaz de minimizar os efeitos adversos e potencializar sua ação neuroprotetora e neurotrófica, sendo uma alternativa terapêutica mais eficiente. Considerando a aplicação local de tacrolimus como um tratamento mais eficaz e livre de efeitos colaterais, sugere-se que sua combinação com biomateriais absorvíveis seja uma alternativa de tratamento para lesões de nervos periféricos de grande extensão extremamente atraente.<sup>(10)</sup>

## CONCLUSÕES

- 1 A técnica empregada para desenvolver a câmara de regeneração nervosa (tubo) tridimensional de PLGA nanotexturizado foi bem sucedida. As dimensões do tubo mais adequadas são: 12 mm de comprimento, 2mm de diâmetro e 600 $\mu$ m de espessura.
- 2 A incorporação do fármaco ao PLGA durante sua fabricação foi executada com êxito. A liberação acumulada do tacrolimus após 90 dias foi de 1131,66 ng/mL.
- 3 Os tubos de PLGA nanotexturizado possuem interconectividade e poros em escalas micro e nanométricas.
- 4 A espessura influencia na perda de massa e na diminuição de espessura. Espessuras menores degradam de forma mais acelerada quando analisados estes parâmetros.
- 5 As membranas de PLGA porosas nanotexturizadas apresentaram altos percentuais de adesão celular em ensaios com células NIH 3T3. Na viabilidade celular, o PLGA contendo tacrolimus apresentou estatisticamente melhores médias em relação ao PLGA sem o fármaco. Nas avaliações *in vivo*, os tecidos circunjacente aos polímeros exibiram processo inflamatório agudo e reativo, típico de corpo estranho. A inflamação diminuiu gradualmente ao longo dos períodos de avaliação. A área de colágeno em 7 dias nos dois tipos de PLGA (com e sem tacrolimus) foi significativamente menor dos que os demais períodos, o que sugere estar associada à lesão criada na inserção dos implantes.
- 6 A espessura da bainha de mielina do nervo ciático do grupo tratado com tubo poroso nanotexturizado de PLGA foi significativamente menor do que o tubo poroso nanotexturizado de PLGA com tacrolimus em 90 dias de avaliação nos segmentos proximal, medial e distal. Da mesma forma, o diâmetro da fibra nervosa do primeiro grupo foi estatisticamente menor do que o segundo nos segmentos proximal e medial. No teste funcional não houve diferença estatística entre os dois tubos, porém o tubo contendo tacrolimus exibiu numericamente melhor IFC.
- 7 O tubo contendo tacrolimus não diferiu do enxerto autólogo em nenhum dos parâmetros analisados (histomorfométricos e funcionais). Em contrapartida o tubo sem tacrolimus foi significativamente diferente comparado ao enxerto

autólogo, em relação ao IFC, espessura da bainha de mielina e diâmetro da fibra nervosa, com médias inferiores.

- 8 O presente estudo sugere que a combinação de PLGA e tacrolimus favorece a regeneração de nervo ciático de rato, e esta poderá ser uma potente alternativa para aplicação clínica em lesões de nervos periféricos.

## REFERÊNCIAS

1. Noble J, Munro CA, Prasad VS, Midha R. Analysis of upper and lower extremity peripheral nerve injuries in a population of patients with multiple injuries. *J Trauma*. 1998;45(1):116-22.
2. Oliveira ALR. Peripheral nerve regeneration through the nerve tubulization technique. . In: Pierucci A PK, editor. 2004. p. 225-31.
3. Liu B, Cai SX, Ma KW, Xu ZL, Dai XZ, Yang L, et al. Fabrication of a PLGA-collagen peripheral nerve scaffold and investigation of its sustained release property in vitro. *J Mater Sci Mater Med*. 2008;19(3):1127-32.
4. Johnson PJ, Skornia SL, Stabenfeldt SE, Willits RK. Maintaining bioactivity of NGF for controlled release from PLGA using PEG. *J Biomed Mater Res A*. 2008;86(2):420-7.
5. Oh SH, Kim JH, Song KS, Jeon BH, Yoon JH, Seo TB, et al. Peripheral nerve regeneration within an asymmetrically porous PLGA/Pluronic F127 nerve guide conduit. *Biomaterials*. 2008;29(11):1601-9.
6. Thapa A, Miller DC, Webster TJ, Haberstroh KM. Nano-structured polymers enhance bladder smooth muscle cell function. *Biomaterials*. 2003;24(17):2915-26.
7. Thapa A, Webster TJ, Haberstroh KM. Polymers with nano-dimensional surface features enhance bladder smooth muscle cell adhesion. *J Biomed Mater Res A*. 2003;67(4):1374-83.
8. Gao J, Niklason L, Langer R. Surface hydrolysis of poly(glycolic acid) meshes increases the seeding density of vascular smooth muscle cells. *J Biomed Mater Res*. 1998;42(3):417-24.
9. Azizi S, Mohammadi R, Amini K, Fallah R. Effects of topically administered FK506 on sciatic nerve regeneration and reinnervation after vein graft repair of short nerve gaps. *Neurosurg Focus*. 2012;32(5):E5.
10. Li X, Wang W, Wei G, Wang G, Zhang W, Ma X. Immunophilin FK506 loaded in chitosan guide promotes peripheral nerve regeneration. *Biotechnol Lett*. 2010;32(9):1333-7.

11. Gartner LP, Hiatt JL. Color text book of histology. 3 ed. Philadelphia: Saunders; 2006.
12. Landon DN, Hall S. The myelinated nerve fiber. The peripheral nerve. London: Chapman and Hall; 1976. p. 1-105.
13. Peters A, Palay SL, Webster HF. The fine structure of the nervous system: the neurons and sprouting cells. Philadelphia: Saunders; 1976.
14. Lundborg G. Peripheral nerve injuries: pathophysiology and strategies for treatment. *J Hand Ther.* 1993;6(3):179-88.
15. Seim III DVM. Peripheral nerve surgery. In: *Small Animal Surgery.* 2 ed. St. Louis: Mosby; 2002. p. 1336-50.
16. Shores A. Lesão e reparo do nervo periférico. In: *Técnicas atuais em cirurgia de pequenos animais.* 3 ed. São Paulo: Roca; 1996. p. 49-56.
17. Mirsky R, . Jessen KR. Embryonic and early postnatal development of Schwann cells. In: *Glial cell development.* 2 ed. New York: Oxford; 2001. p. 1-20.
18. Thomas PK. Changes in the endoneurial sheaths of peripheral myelinated nerve fibres during wallerian degeneration. *J Anat.* 1964;98:175-82.
19. Ide C. Peripheral nerve regeneration. *Neurosci Res.* 1996;25(2):101-21.
20. Zochodne DW. The microenvironment of injured and regenerating peripheral nerves. *Muscle Nerve Suppl.* 2000;9:S33-8.
21. Lunn ER, Brown MC, Perry VH. The pattern of axonal degeneration in the peripheral nervous system varies with different types of lesion. *Neuroscience.* 1990;35(1):157-65.
22. Talor SM. Distúrbios neuromusculares. In: *Medicina interna de pequenos animais* 3ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2006. p. 1013-25.
23. Kiefer R, Kieseier BC, Stoll G, Hartung HP. The role of macrophages in immune-mediated damage to the peripheral nervous system. *Prog Neurobiol.* 2001;64(2):109-27.
24. Rutkowski JL, Tuite GF, Lincoln PM, Boyer PJ, Tennekoon GI, Kunkel SL. Signals for proinflammatory cytokine secretion by human Schwann cells. *J Neuroimmunol.* 1999;101(1):47-60.

25. Erhart EA. Neuroanatomia. 3 ed. São Paulo: Atheneu; 1965
26. Kasra Rowshan, Jones NF, Gupta R. Current surgical techniques of peripheral nerve repair Operative Techniques in Orthopaedics. 2004;14(3):163-70.
27. Seddon H. Three types of nerve injury. Brain. 1943;66:237–88.
28. Sunderland S. Nerves and nerve injuries. 2 ed. New York: Churchill Livingstone; 1978. p. 133-8.
29. Hudson TW, Evans GR, Schmidt CE. Engineering strategies for peripheral nerve repair. Orthop Clin North Am. 2000;31(3):485-98.
30. Kalbermatten DF, Erba P, Mahay D, Wiberg M, Pierer G, Terenghi G. Schwann cell strip for peripheral nerve repair. J Hand Surg Eur Vol. 2008;33(5):587-94.
31. Tremp M, Schwabedissen MM, Kappos EA, Engels PE, Fischmann A, Scherberich A, et al. The regeneration potential after human and autologous stem cell transplantation in a rat sciatic nerve injury model can be monitored by MRI. Cell Transplant. 2013.
32. Lichtenfels M, Colomé L, Sebben AD, Braga-Silva J. Effect of Platelet Rich Plasma and platelet rich fibrin on sciatic nerve regeneration in a rat model. Microsurgery. 2013;33(5):383-90.
33. Farrag TY, Lehar M, Verhaegen P, Carson KA, Byrne PJ. Effect of platelet rich plasma and fibrin sealant on facial nerve regeneration in a rat model. Laryngoscope. 2007;117(1):157-65.
34. Sariguney Y, Yavuzer R, Elmas C, Yenicesu I, Bolay H, Atabay K. Effect of platelet-rich plasma on peripheral nerve regeneration. J Reconstr Microsurg. 2008;24(3):159-67.
35. Ding T, Luo ZJ, Zheng Y, Hu XY, Ye ZX. Rapid repair and regeneration of damaged rabbit sciatic nerves by tissue-engineered scaffold made from nano-silver and collagen type I. Injury. 2010;41(5):522-7.
36. Madduri S, Feldman K, Tervoort T, Papaloizos M, Gander B. Collagen nerve conduits releasing the neurotrophic factors GDNF and NGF. J Control Release. 2010;143(2):168-74.

37. Yao L, Wang S, Cui W, Sherlock R, O'Connell C, Damodaran G, et al. Effect of functionalized micropatterned PLGA on guided neurite growth. *Acta Biomater.* 2009;5(2):580-8.
38. Kalbermatten DF, Pettersson J, Kingham PJ, Pierer G, Wiberg M, Terenghi G. New fibrin conduit for peripheral nerve repair. *J Reconstr Microsurg.* 2009;25(1):27-33.
39. Ichihara S, Inada Y, Nakamura T. Artificial nerve tubes and their application for repair of peripheral nerve injury: an update of current concepts. *Injury.* 2008;39 Suppl 4:29-39.
40. Braga-Silva J. The use of silicone tubing in the late repair of the median and ulnar nerves in the forearm. *J Hand Surg Br.* 1999;24(6):703-6.
41. Schmidt CE, Leach JB. Neural tissue engineering: strategies for repair and regeneration. *Annu Rev Biomed Eng.* 2003;5:293-347.
42. Lee AC, Yu VM, Lowe JB, Brenner MJ, Hunter DA, Mackinnon SE, et al. Controlled release of nerve growth factor enhances sciatic nerve regeneration. *Exp Neurol.* 2003;184(1):295-303.
43. Wallemacq PE, Reding R. FK506 (tacrolimus), a novel immunosuppressant in organ transplantation: clinical, biomedical, and analytical aspects. *Clin Chem.* 1993;39(11 Pt 1):2219-28.
44. Honbo T, Kobayashi M, Hane K, Hata T, Ueda Y. The oral dosage form of FK-506. *Transplant Proc.* 1987;19(5 Suppl 6):17-22.
45. Tanaka H, Nakahara K, Hatanaka H, Inamura N, Kuroda A. [Discovery and development of a novel immunosuppressant, tacrolimus hydrate]. *Yakugaku Zasshi.* 1997;117(8):542-54.
46. Chen B, Song Y, Liu Z. Promotion of nerve regeneration in peripheral nerve by short-course FK506 after end-to-side neuroorrhaphy. *J Surg Res.* 2009;152(2):303-10.
47. Navarro X, Udina E, Ceballos D, Gold BG. Effects of FK506 on nerve regeneration and reinnervation after graft or tube repair of long nerve gaps. *Muscle Nerve.* 2001;24(7):905-15.

48. Udina E, Rodríguez FJ, Verdú E, Espejo M, Gold BG, Navarro X. FK506 enhances regeneration of axons across long peripheral nerve gaps repaired with collagen guides seeded with allogeneic Schwann cells. *Glia*. 2004;47(2):120-9.
49. Chunasuwankul R, Ayrout C, Dereli Z, Gal A, Lanzetta M, Owen E. Low dose discontinued FK506 treatment enhances peripheral nerve regeneration. *Int Surg*. 2002;87(4):274-8.
50. Doolabh VB, Mackinnon SE. FK506 accelerates functional recovery following nerve grafting in a rat model. *Plast Reconstr Surg*. 1999;103(7):1928-36.
51. Lee M, Doolabh VB, Mackinnon SE, Jost S. FK506 promotes functional recovery in crushed rat sciatic nerve. *Muscle Nerve*. 2000;23(4):633-40.
52. Gold BG, Densmore V, Shou W, Matzuk MM, Gordon HS. Immunophilin FK506-binding protein 52 (not FK506-binding protein 12) mediates the neurotrophic action of FK506. *J Pharmacol Exp Ther*. 1999;289(3):1202-10.
53. Steiner JP, Connolly MA, Valentine HL, Hamilton GS, Dawson TM, Hester L, et al. Neurotrophic actions of nonimmunosuppressive analogues of immunosuppressive drugs FK506, rapamycin and cyclosporin A. *Nat Med*. 1997;3(4):421-8.
54. Williams DF. On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials*. 2008;29(20):2941-53.
55. Vallet-Regí M. Synthesis and characterisation of calcium deficient apatite. In: Rodríguez-Lorenzo LM, Salinas AJ, editors.: *Solid State Ionics*; 1997. p. 1279–85.
56. Hench LL, Wilson J. Introduction to biomaterials In: *An Introduction to Bioceramics*. 1993. p. 1-15.
57. Merle M, Dellon AL, Campbell JN, Chang PS. Complications from silicon-polymer intubulation of nerves. *Microsurgery*. 1989;10(2):130-3.
58. Novikova LN, Mosahebi A, Wiberg M, Terenghi G, Kellerth JO, Novikov LN. Alginate hydrogel and matrigel as potential cell carriers for neurotransplantation. *J Biomed Mater Res A*. 2006;77(2):242-52.

59. Bini TB, Gao S, Xu X, Wang S, Ramakrishna S, Leong KW. Peripheral nerve regeneration by microbraided poly(L-lactide-co-glycolide) biodegradable polymer fibers. *J Biomed Mater Res A*. 2004;68(2):286-95.
60. Liu JJ, Wang CY, Wang JG, Ruan HJ, Fan CY. Peripheral nerve regeneration using composite poly(lactic acid-caprolactone)/nerve growth factor conduits prepared by coaxial electrospinning. *J Biomed Mater Res A*. 2011;96(1):13-20.
61. Park GE, Pattison MA, Park K, Webster TJ. Accelerated chondrocyte functions on NaOH-treated PLGA scaffolds. *Biomaterials*. 2005;26(16):3075-82.
62. Kim SM, Lee SK, Lee JH. Peripheral nerve regeneration using a three dimensionally cultured schwann cell conduit. *J Craniofac Surg*. 2007;18(3):475-88.
63. Sakurai E, Nozaki M, Okabe K, Kunou N, Kimura H, Ogura Y. Scleral plug of biodegradable polymers containing tacrolimus (FK506) for experimental uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2003;44(11):4845-52.
64. Holy CE, Dang SM, Davies JE, Shoichet MS. In vitro degradation of a novel poly(lactide-co-glycolide) 75/25 foam. *Biomaterials*. 1999;20(13):1177-85.
65. Bruggeman JP, Bettinger CJ, Langer R. Biodegradable xylitol-based elastomers: in vivo behavior and biocompatibility. *J Biomed Mater Res A*. 2010;95(1):92-104.
66. McBane JE, Sharifpoor S, Cai K, Labow RS, Santerre JP. Biodegradation and in vivo biocompatibility of a degradable, polar/hydrophobic/ionic polyurethane for tissue engineering applications. *Biomaterials*. 2011;32(26):6034-44.
67. Grayson AC, Cima MJ, Langer R. Size and temperature effects on poly(lactic-co-glycolic acid) degradation and microreservoir device performance. *Biomaterials*. 2005;26(14):2137-45.
68. Tsuji H, Ogiwara M, Saha SK, Sakaki T. Enzymatic, alkaline, and autocatalytic degradation of poly(L-lactic acid): effects of biaxial orientation. *Biomacromolecules*. 2006;7(1):380-7.
69. Miller DC, Thapa A, Haberstroh KM, Webster TJ. Endothelial and vascular smooth muscle cell function on poly(lactic-co-glycolic acid) with nano-structured surface features. *Biomaterials*. 2004;25(1):53-61.

70. Kim BS, Mooney DJ. Development of biocompatible synthetic extracellular matrices for tissue engineering. *Trends Biotechnol.* 1998;16(5):224-30.
71. Luis AL, Rodrigues JM, Lobato JV, Lopes MA, Amado S, Veloso AP, et al. Evaluation of two biodegradable nerve guides for the reconstruction of the rat sciatic nerve. *Biomed Mater Eng.* 2007;17(1):39-52.
72. Panseri S, Cunha C, Lowery J, Del Carro U, Taraballi F, Amadio S, et al. Electrospun micro- and nanofiber tubes for functional nervous regeneration in sciatic nerve transections. *BMC Biotechnol.* 2008;8:39.
73. Clavijo-Alvarez JA, Nguyen VT, Santiago LY, Doctor JS, Lee WP, Marra KG. Comparison of biodegradable conduits within aged rat sciatic nerve defects. *Plast Reconstr Surg.* 2007;119(6):1839-51.
74. Chen G, Xia Y, Lu X, Zhou X, Zhang F, Gu N. Effects of surface functionalization of PLGA membranes for guided bone regeneration on proliferation and behavior of osteoblasts. *J Biomed Mater Res A.* 2013;101(1):44-53.
75. Lu L, Peter SJ, Lyman MD, Lai HL, Leite SM, Tamada JA, et al. In vitro and in vivo degradation of porous poly(DL-lactic-co-glycolic acid) foams. *Biomaterials.* 2000;21(18):1837-45.
76. de Medinaceli L, Freed WJ, Wyatt RJ. An index of the functional condition of rat sciatic nerve based on measurements made from walking tracks. *Exp Neurol.* 1982;77(3):634-43.
77. Lowdon IM, Seaber AV, Urbaniak JR. An improved method of recording rat tracks for measurement of the sciatic functional index of de Medinaceli. *J Neurosci Methods.* 1988;24(3):279-81.
78. Bain JR, Mackinnon SE, Hunter DA. Functional evaluation of complete sciatic, peroneal, and posterior tibial nerve lesions in the rat. *Plast Reconstr Surg.* 1989;83(1):129-38.
79. de Boer R, Knight AM, Spinner RJ, Malessy MJ, Yaszemski MJ, Windebank AJ. In vitro and in vivo release of nerve growth factor from biodegradable poly-lactic-co-glycolic-acid microspheres. *J Biomed Mater Res A.* 2010;95(4):1067-73.

80. Braga-Silva J, Gehlen D, Padoin AV, Machado DC, Garicochea B, Costa da Costa J. Can local supply of bone marrow mononuclear cells improve the outcome from late tubular repair of human median and ulnar nerves? *J Hand Surg Eur Vol.* 2008;33(4):488-93.
81. Curran JM, Tang Z, Hunt JA. PLGA doping of PCL affects the plastic potential of human mesenchymal stem cells, both in the presence and absence of biological stimuli. *J Biomed Mater Res A.* 2009;89(1):1-12.
82. 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;22(1):99-106.
83. Lundborg G, Rosén B, Dahlin L, Holmberg J, Rosén I. Tubular repair of the median or ulnar nerve in the human forearm: a 5-year follow-up. *J Hand Surg Br.* 2004;29(2):100-7.
84. Agrawal CM, Ray RB. Biodegradable polymeric scaffolds for musculoskeletal tissue engineering. *J Biomed Mater Res.* 2001;55(2):141-50.
85. Greca FH, de Paula JB, Biondo-Simões ML, da Costa FD, da Silva AP, Time S, et al. The influence of differing pore sizes on the biocompatibility of two polypropylene meshes in the repair of abdominal defects. Experimental study in dogs. *Hernia.* 2001;5(2):59-64.
86. Junqueira LC, Bignolas G, Brentani RR. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem J.* 1979;11(4):447-55.
87. Subramanian A, Krishnan UM, Sethuraman S. In vivo biocompatibility of PLGA-polyhexylthiophene nanofiber scaffolds in a rat model. *Biomed Res Int.* 2013;2013:390518.
88. Loo SC, Ooi CP, Wee SH, Boey YC. Effect of isothermal annealing on the hydrolytic degradation rate of poly(lactide-co-glycolide) (PLGA). *Biomaterials.* 2005;26(16):2827-33.
89. Shin RH, Friedrich PF, Crum BA, Bishop AT, Shin AY. Treatment of a segmental nerve defect in the rat with use of bioabsorbable synthetic nerve conduits:

a comparison of commercially available conduits. *J Bone Joint Surg Am*. 2009;91(9):2194-204.

90. Yoshioka T, Kawazoe N, Tateishi T, Chen G. In vitro evaluation of biodegradation of poly(lactic-co-glycolic acid) sponges. *Biomaterials*. 2008;29(24-25):3438-43.

91. Xie F, Li QF, Gu B, Liu K, Shen GX. In vitro and in vivo evaluation of a biodegradable chitosan-PLA composite peripheral nerve guide conduit material. *Microsurgery*. 2008;28(6):471-9.

92. Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science*. 1993;260(5110):920-6.

93. Ikada Y. Tissue engineering: fundamentals and applications In: Press/Elsevier A, editor. *Interface science and technology*. (8): 2006.

94. Shalumon KT, Anulekha KH, Chennazhi KP, Tamura H, Nair SV, Jayakumar R. Fabrication of chitosan/poly(caprolactone) nanofibrous scaffold for bone and skin tissue engineering. *Int J Biol Macromol*. 2011;48(4):571-6.

95. Oh SH, Kim JR, Kwon GB, Namgung U, Song KS, Lee JH. Effect of surface pore structure of nerve guide conduit on peripheral nerve regeneration. *Tissue Eng Part C Methods*. 2013;19(3):233-43.

96. Kay S, Thapa A, Haberstroh KM, Webster TJ. Nanostructured polymer/nanophase ceramic composites enhance osteoblast and chondrocyte adhesion. *Tissue Eng*. 2002;8(5):753-61.

97. Savaiano JK, Webster TJ. Altered responses of chondrocytes to nanophase PLGA/nanophase titania composites. *Biomaterials*. 2004;25(7-8):1205-13.

98. Souza MC, Fialho SL, Souza PA, Fulgêncio GO, Da Silva GR, Silva-Cunha A. Tacrolimus-Loaded PLGA Implants: In Vivo Release and Ocular Toxicity. *Curr Eye Res*. 2014;39(1):99-102.

## **ANEXOS**

## ANEXO A

### ARTIGO ORIGINAL

#### **Biocompatibility of three-dimensional porous poly(lactide-co-glycolide) with tacrolimus (FK506) for nerve repair**

Alessandra Deise Sebben, Daniel Rodrigo Marinowic, Vinicius Duval da Silva, Mariane Giacomini Schardosim, Roberto Hubler, Jefferson Braga Silva

#### **Abstract**

The present study aims the fabrication of tacrolimus loaded-PLGA films treated with NaOH and evaluated *in vitro* and *in vivo* biocompatibility. *In vitro* biocompatibility, viability and adhesion cells were evaluated through MTT and DAPI assays. The copolymers with and without incorporation of tacrolimus were implanted in 63 rats to evaluate the *in vivo* biocompatibility 7, 14, 21, 30 and 90 days (3 animals received no implant). For histological evaluation, the samples were evaluated for staining with Hematoxylin–Eosin (HE) reagent and picosirius red staining. Nanotextured PLGA films, containing tacrolimus or not, differ from the negative control cell viability assays *in vitro* ( $p = 0.000$ ) cells. The film containing tacrolimus was significantly improved, regardless of the time when compared with the film without the drug ( $p = 0.026$ ). *In vivo* biocompatibility evaluation, the surrounding tissue to PLGA implants showed acute inflammation, which was decreasing the long 90 days evaluation. The implants were inserted after seven days, it was evident less collagen deposition in both biomaterials,  $p \leq 0.020$ . In the study, it is suggested that nanotextured PLGA containing tacrolimus may become an interesting alternative for future application in nerve repair. Further tests to evaluate the effectiveness of the copolymer as a nerve conduit are required.

#### **Introduction**

Injuries in peripheral nerves generally result in pain and morbidity and can generate permanent sequelae, such as sensory disorders and functional loss, with important social and economic consequences. The current repair techniques

frequently offer unsatisfactory results. (1) Autologous peripheral nerve represents the gold standard of repair when there is loss of substance that precludes neuroorrhaphy. Although, it has numerous disadvantages, such as graft availability, donor's site morbidity and the sensory deficit resulting in the removal site.(2)

For improving peripheral nerve regeneration, the use of artificial biodegradable nerve chambers has become one of the most promising alternatives in the reconstruction of complex nerve injuries. This synthetic biodegradable polymers have been widely utilized as scaffolds in tissue engineering (3), and their use aims to be a platform to support cell adhesion, to promote regenerating axons and to support the cellular proliferation and differentiation, to facilitate the transport of nutrients, and to hold the integrated cells and extracellular matrices; in addition, to provide the initial mechanical strength necessary to protect the new tissues or organs from the suppression of the surrounding environment.(4, 5)

Poly (DL-lactic-coglycolic acid) (PLGA) copolymers are among the few synthetic polymers approved for human clinical uses. They can be easily processed into desired configuration and their physical, chemical, mechanical, and degradative properties can be engineered to fit a particular need. The biocompatibility of PLGA has also been demonstrated in many biological sites.(5, 6)

Studies have shown that treatment of polyesters, such as PLGA, with sodium hydroxide (NaOH) allows that the biomaterial ester bonds can be hydrolyzed and its surface becomes more hydrophilic, which facilitates the adsorption of proteins hydrophilics. PLGA treated with NaOH also have their surface area and porosity increased, creating more cell adhesion sites. (7-9)

These features provide the best conditions for PLGA being used to create chambers of peripheral nerve regeneration. Furthermore, it is important to maximize its effect incorporating neurotrophic factors and neuroprotective. Tacrolimus is an immunosuppressant approved by the FDA that has positive effects on the repair of peripheral nerves. Systemic administration coupled with chambers or grafts has proven to be effective. However, there are adverse reactions in this application, such as nephrotoxicity and hypertension. The local release of tacrolimus during the process of nerve regeneration is indicated for a safer and more effective application of the drug in order to minimize side effects. (10, 11)

The aim of this study was to develop nanotextured absorbable poly (lactic-coglycolic acid) tube treated with sodium hydroxide (NaOH) loaded tacrolimus, and to

test the biocompatibility *in vitro* and *in vivo* of polymer, to develop future tubes for using in peripheral nerve repair.

## **Material and Methods**

Nanotextured PLGA films were produced in the ratio of 82:18 (PLA : PGA) poly (lactic-co- glycolic acid) (PURAC - PURASORB PLG ® 8218) . The copolymer was dissolved in chloroform (Merck®) in the weight ratio of the copolymer of solvent per volume of 5% (w / v).

Three kinds of PLGA films were made with the objective of measuring the cytotoxicity and cell proliferation. The three surfaces of films produced and evaluated are below:

M1 - porous films: the copolymer was dissolved in 40 kHz ultrasound (Unique model USC- 1600) at room temperature using chloroform as a solvent. The solution was poured into Petri dishes and the solvent evaporated in chapel with air flow for about two hours, thus enabling the formation of pores in the film surface. (12, 13)

M2 - nanotextured porous films: produced using the same solvent as previously mentioned. After complete dissolution of the copolymer, particles of sodium chloride (NaCl) (Merck®) were added as porogenic agent at a ratio of 1:16 (copolymer / salt). The following, the films were immersed in NaOH solution (Merck ®) (1 M) for five minutes to functionalize nanoporous films. The films were washed with deionized water until reaching a pH close to neutrality. The films were maintained for one hour in ultrasound for removal of any waste of NaOH solution. For 48 h, the films remained in vacuum at a pressure of 10 Pa to remove the residual solvent.(14)

M3 - nanotextured porous films with tacrolimus: the same protocol films M2 were used. However, during dissolution of the copolymer, tacrolimus was added in a concentration of 3% by mass of the biomaterial (m / m). (11)

## **Cell culture**

NIH 3T3 fibroblasts were first cultured in DMEM and supplemented by 10% FBS and 1% antibiotics. The cells were incubated at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>, in the Instituto de Pesquisas Biomédicas - PUCRS.

## **Cytotoxicity**

The indirect cytotoxicity evaluation of the PLGA films was conducted according to the ISO10993-5 standard test method. Briefly, the PLGA films were cut into 15 X 15 mm samples (n=4) and sterilized by UV irradiation. The extraction media were prepared by immersing the samples in a 24-well culture plate, and incubated for 1, 2, 7, 14 e 30 days. Cells cultured without the polymer were positive control, and sodium hypochlorite is used as negative control. NIH 3T3 fibroblasts were seeded in a 96-well plate at a density of  $1.0 \times 10^4$  cells/well and incubated in culture medium. The culture medium was removed after 24 hours and the prepared extraction media was added to the 96-well. The cells were incubated for 24 h and the number of viable cells was quantified by the MTT assay (3-(4, 5-dimethylthiozole-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide).(15) The samples were washed twice using PBS and 200  $\mu$ L of 5mg/mL MTT solution were added to each well and incubated at 37°C, and 5% CO<sub>2</sub> for 4 hours. After incubation, the MTT solutions were removed, and 500  $\mu$ L of DMSO were added to dissolve the formazan crystals. The absorbance was measured at 490 nm using a microplate reader. The optical density was recorded for quantification of cells. The absorbance was normalized with that of control (no polymer), which is taken as 100%.(16)

## **Cell adhesion**

The PLGA films cell adhesion was studied by DAPI staining (n=2). PLGA films were cut into 15  $\times$ 15 mm samples. The samples were placed in 24-well culture plate, and the NIH 3T3 cells were seeded at a density of  $1.0 \times 10^5$  cells/well. Cells were treated by blue-fluorescent DAPI (5 mg/mL in sterile dH<sub>2</sub>O) at 24h after cell seeding. The samples were stained with DAPI (5mg/mL in sterile dH<sub>2</sub>O) for 5 min followed by PBS washing. The samples were fixed in 4% paraformaldehyde for 15 min and washed with PBS three times for 5min each. Fluorescence image of labeled cells was observed by a fluorescence microscope with appropriate filters (emission 488 nm). The percentage of cell proliferation of the polymer was calculated using the control cells (no polymer) as 100% proliferation.(17)

## ***In vivo* Biocompatibility**

PLGA films were implanted in dorsal subcutaneous into male Wistar rats (250–300g). Male rats were anesthetized with meperidine (5mg.Kg<sup>-1</sup>) and ketamine (5mg.Kg<sup>-1</sup>).

Sixty-three animals were used in the experiment and they were divided into two groups: T1 - nanotextured PLGA porous film and T2 - nanotextured PLGA porous film with tacrolimus; three animals received no implant (control). The animals were shaved in the area of surgical access and subsequently placed in the prone position under general anesthesia that was already described. The paravertebral 1 cm incision was made on the dorsum of the right side of each rat, 1 cm lateral to the spine. Tubes were sterilized (by ethylene oxide) and implanted subcutaneously in the animals. The incisions were sutured with nylon 5-0 (Ethilon ®, Johnson & Johnson).(18)

The rats were sacrificed and the overdose and surrounding tissue isolated after 7, 14, 21, 30, and 90 days. For histological evaluation, the samples were fixed in 10% neutral buffered formalin and then embedded in parafin and stained with Hematoxylin–Eosin (HE) reagent, and picrosirius red staining.

## **Results**

### **Cytotoxicity – MTT assay**

The *in vitro* cytotoxicity of PLGA was evaluated by cell viability obtained by MTT assays in cell cultures of NIH 3T3 of the mice line on the three films described (M1, M2, and M3) at different periods of incubation time in PBS (1, 2, 7, 14, and 30 days).

Despite the time, M2 was statistically different from M3, with  $p = 0.026$ . In the periods of 7 and 14 days, there was a greater difference between the means of the two groups:  $74.12 \pm 31.88\%$  (M2) and  $107.79 \pm 34.75\%$  (M3) in 7 days;  $72.17 \pm 10.28\%$  (M2) and  $101.89 \pm 20.70\%$  in 14 days.

All samples showed significantly higher means compared to the negative control (sodium hypochlorite) ( $p=0.000$ ). Comparing the groups, M2 and M3 were not statistically different from M1 ( $p \geq 0.05$ ), the positive control, in which cells were not exposed to any material or additive, representing the default value of 100% (Figure 1).

### **Cell adhesion - DAPI staining analysis**

The cell adhesion and proliferation of NIH 3T3 cells in the M1, M2 and M3 films assay was used DAPI in 24h. The positive control (cells cultured without exposure to materials) was used as the standard of 100% compliance. The percentages for the three samples, whose values and their standard deviations are shown in Table 1, were calculated.

The film M1 showed the underperformed, with average cell adhesion of  $38.60 \pm 24.07\%$ , differing significantly from the samples M2 and M3 ( $p = 0.000$ ), which showed results above 100% cell adhesion in 24h and were not statistically different (Table 1).

In fluorescence images, it is possible to observe the adhesion of NIH 3T3 cells on the films and the control (Figure 2).

### ***In vivo* biocompatibility**

#### ***Clinical observations***

Animals were sequentially sacrificed at each time point on post-operative days (7, 14, 21, 30, and 90). No behavioral changes or visible signs of physical impairment indicating systemic or neurological toxicity were observed.

#### ***Hematoxylin–Eosin (HE)***

The subcutaneous tissue surrounding to the PLGA copolymer without (M2) and with tacrolimus (M3) was evaluated in periods of 7, 14, 21, 30, and 90 days to assess the acute and chronic inflammatory reaction. No differences between the two tested biomaterials in rating were observed by HE and both showed very similar inflammatory responses.

The tissue in contact with PLGA (M2 and M3) matrices evoked a mild inflammatory response by the end of seven days post implantation. The implant site contained congested blood vessels and a thin fibrous layer. The inflammation was

characterized by a mild infiltration of lymphocytes and neutrophils, intense macrophages, mast cells and giant cells in the 7<sup>th</sup> day.

At 14 days, inflammation was still present, but more discreet, a predominance of fibroblasts and macrophages. There was the presence of mast cells in the muscle layer and proper healing with excellent retraction. In the 21<sup>th</sup> day, there were excellent skin healing, reactive inflammation, characterized by the presence of macrophages and fibrosis with collagen deposition more mature, typical of foreign body reaction. Mast cells were still present in the tissue, but more discreetly. At 30 days, there still were inflammatory cells, though fewer in number, with very slight reaction. There was the presence of macrophages and giant cells, possibly in response to degradation of the polymer. Below the muscle layer, there was a fibrous tissue and the presence of mast cells. After 90 days, there was remodeled collagen and few mast cells. Throughout the observation, it was observed a constant temporal sequence, with decreasing inflammatory response and remodeled collagen (inert material). The presence of mast cells in all phases was observed in all groups, including the normal tissue (no implants).

### ***Histomorphometry - Picrosirius red staining***

When comparing the mean of the two groups (T1 and T2) at different times (7, 14, 21, 30, and 90 days), it was showed a statistically significance in 7 days compared to other periods difference. Regardless of time, M2 and M1 were significantly higher ( $p < 0.05$ ). In the 90<sup>th</sup> day, M1 and M2 had mean  $67\% \pm 13.72$  and  $79 \pm 5.9\%$  collagen area, respectively (Figure 3 and 4).

### **Discussion**

Traumatic peripheral nerve results in sensory deficits and functional impairment, and rarely occurs without a nerve repair surgery. When there is loss of nerve substance, the consequences are more serious, often permanent, there is an increased pain and morbidity of patients, significantly decreasing their life quality, causing physical disability, partial or total loss of productive activities and generating large socioeconomic impact.

In cases where the extent of the injury precludes simple combination of stumps (neurorrhaphy), a technique of repair available and widely employed is the tubing. This technique, also called entubulation, is a surgical procedure in which the severed nerve stumps are inserted and fixed inside a tubular chamber with a view to provide a favorable environment for regeneration. It also gives the guidance of nerve growth of broken or sectioned ends (1), protecting the nerve fibers of scar tissue and preventing the formation of neuroma 5. The tubing has another interesting feature: it can be optimized with the addition of regenerative factors.<sup>84-86</sup>

Additionally, the use of an artificial guide allows the creation of a favorable microenvironment using neurotrophic and neuroprotective substances, enriching chamber regeneration. Current studies have focused on the choice of substances and routes of administration that can maximize its effect locally. The combination of PLGA copolymer and tacrolimus drug fits in this context, and it can optimize the axonal growth and functional recovery of peripheral nerve injuries.

The viability of PLGA films evaluated statistically different mean of the negative control. The film M2 (nanotextured porous PLGA) was significantly lower, despite the time, compared to the film M3 (nanotextured tacrolimus porous PLGA). Its averages in 7 days of incubation were 74.12 % and 107.79 respectively. In 14 days, a difference between the two films was also observed, with averages of 72.17 (M2) and 101.89 (M3).

As for the cell adhesion, the M1 film can be observed as unfavorable for proliferation of NIH 3T3 cells surface. Its structure has pores only on the surface. Three-dimensional scaffolds with interconnected pores are desirable to facilitate cell adhesion and cultivation, for being used as temporary headquarters in reconstructive medicine and tissue engineering. In the morphological characterization of nanotextured porous PLGA, it was showed the presence of pores in the micro and nanometer scales and their interconnections. (19, 20)

M2 and M3 films prepared with NaCl and NaOH treatment, with and without addition of tacrolimus, respectively, were proved to be an excellent surface for growth and cell adhesion, which can be explained by the presence of three-dimensional nanopores created by the combined treatment with NaCl nanofunctionalization obtained by addition of NaOH, which allows the material surface to become hydrophilic, which facilitates the absorption of nutrients and cell adhesion.

In the evaluation of the collagen time-independent, M2 to M1 was significantly higher ( $p < 0.05$ ). In 90 days, M1 and M2 had mean  $67 \% \pm 13.72$  and  $79 \pm 5.9$  % area of collagen, respectively. After surgical intervention, as it was the case in this experiment, biomaterials for implantation in animals, the collagen area will no longer be reestablished 100 %. Therefore, the material M2 (PLGA / tacrolimus) showed good results, suggesting that this combination is superior to the isolated biomaterial and favors the replacement of collagen and tissue reconstitution.

The M2 and M3 films did not differ significantly, and showed values above 100% of cell adhesion. The data indicate that the two films (M1 and M2) are surface with high potential for growth and cell adhesion, which can be explained by the presence of three-dimensional nanopores created by the combined treatment with NaCl nanofunctionalization obtained by NaOH addition, which allows the surface of the material becomes hydrophilic and promotes nutrient absorption and adhesion cellular. (7, 8, 21, 22)

Surface properties of a scaffold biomaterial play a significant role in cell adhesion proliferation, and subsequent functions. Studies have demonstrated that, compared to conventional PLGA, NaOH-treated PLGA scaffolds greatly promotes the adhesion and proliferation of various cell lines (13, 14, 23, 24).

*In vivo* evaluations, the tissue circumjacent to polymers exhibited sharp and reactive inflammatory process, typical of a foreign body. We observed an acute inflammatory response, with granulomas and giant cells with strong expression in 7, 14 and 21 days. We also noted that this inflammatory response is more discreet in subsequent periods (30 and 90 days). The inflammation gradually decreased over the evaluation period.

The collagen area in 7 days in both types of PLGA (with and without tacrolimus) was significantly lower than other periods, suggesting it was associated with the injury created at the insertion of the implants.

There are few studies in the literature that evaluate the biocompatibility of PLGA containing tacrolimus. Souza et. al. (25) evaluated *in vivo* release and ocular toxicity of a tacrolimus-loaded PLGA intravitreal implant. The authors reported that 99.97% of the drug was released from the devices at 6 weeks and that ophthalmic examination revealed no evidence of toxic effects of implants. A similar study has found tolerance and feasibility of the tacrolimus-loaded PLGA implants.

The present study was conducted for testing the biocompatibility of nanotextured PLGA containing or not containing tacrolimus, in order to a conduit for nerve regeneration can be produced in the future.

## Conclusion

Nanotextured PLGA films, containing tacrolimus or not, differ from the negative control *in vitro* viability assays ( $p=0.000$ ). The film containing tacrolimus was significantly improved, regardless of the time when compared the film without the drug ( $p=0.026$ ). *In vivo* biocompatibility evaluation, the surrounding tissue to PLGA implants showed acute inflammation, which was decreasing the long 90 days evaluation. Seven days after the implants being inserted, it was evident less collagen deposition in both biomaterials,  $p \leq 0.020$ .

## References

1. Noble J, Munro CA, Prasad VS, Midha R. Analysis of upper and lower extremity peripheral nerve injuries in a population of patients with multiple injuries. *J Trauma*. 1998;45(1):116-22.
2. Xie F, Li QF, Gu B, Liu K, Shen GX. *In vitro* and *in vivo* evaluation of a biodegradable chitosan-PLA composite peripheral nerve guide conduit material. *Microsurgery*. 2008;28(6):471-9.
3. Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science*. 1993;260(5110):920-6.
4. Madduri S, Feldman K, Tervoort T, Papaloizos M, Gander B. Collagen nerve conduits releasing the neurotrophic factors GDNF and NGF. *J Control Release*. 2010;143(2):168-74.
5. Ikada, Y. Tissue engineering: fundamentals and applications In: Press/Elsevier A, editor. *Interface science and technology*. (8)2006.
6. Liu B, Cai SX, Ma KW, Xu ZL, Dai XZ, Yang L, et al. Fabrication of a PLGA-collagen peripheral nerve scaffold and investigation of its sustained release property *in vitro*. *J Mater Sci Mater Med*. 2008;19(3):1127-32.
7. Thapa A, Miller DC, Webster TJ, Haberstroh KM. Nano-structured polymers enhance bladder smooth muscle cell function. *Biomaterials*. 2003;24(17):2915-26.

8. Thapa A, Webster TJ, Haberstroh KM. Polymers with nano-dimensional surface features enhance bladder smooth muscle cell adhesion. *J Biomed Mater Res A*. 2003;67(4):1374-83.
9. Gao J, Niklason L, Langer R. Surface hydrolysis of poly(glycolic acid) meshes increases the seeding density of vascular smooth muscle cells. *J Biomed Mater Res*. 1998;42(3):417-24.
10. Azizi S, Mohammadi R, Amini K, Fallah R. Effects of topically administered FK506 on sciatic nerve regeneration and reinnervation after vein graft repair of short nerve gaps. *Neurosurg Focus*. 2012;32(5):E5.
11. Li X, Wang W, Wei G, Wang G, Zhang W, Ma X. Immunophilin FK506 loaded in chitosan guide promotes peripheral nerve regeneration. *Biotechnol Lett*. 2010;32(9):1333-7.
12. Yao L, Wang S, Cui W, Sherlock R, O'Connell C, Damodaran G, et al. Effect of functionalized micropatterned PLGA on guided neurite growth. *Acta Biomater*. 2009;5(2):580-8.
13. Miller DC, Thapa A, Haberstroh KM, Webster TJ. Endothelial and vascular smooth muscle cell function on poly(lactic-co-glycolic acid) with nano-structured surface features. *Biomaterials*. 2004;25(1):53-61.
14. Park GE, Pattison MA, Park K, Webster TJ. Accelerated chondrocyte functions on NaOH-treated PLGA scaffolds. *Biomaterials*. 2005;26(16):3075-82.
15. Chen G, Xia Y, Lu X, Zhou X, Zhang F, Gu N. Effects of surface functionalization of PLGA membranes for guided bone regeneration on proliferation and behavior of osteoblasts. *J Biomed Mater Res A*. 2013;101(1):44-53.
16. Sakurai E, Nozaki M, Okabe K, Kunou N, Kimura H, Ogura Y. Scleral plug of biodegradable polymers containing tacrolimus (FK506) for experimental uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2003;44(11):4845-52.
17. Shalumon KT, Anulekha KH, Chennazhi KP, Tamura H, Nair SV, Jayakumar R. Fabrication of chitosan/poly(caprolactone) nanofibrous scaffold for bone and skin tissue engineering. *Int J Biol Macromol*. 2011;48(4):571-6.
18. Bruggeman JP, Bettinger CJ, Langer R. Biodegradable xylitol-based elastomers: in vivo behavior and biocompatibility. *J Biomed Mater Res A*. 2010;95(1):92-104.
19. Kim BS, Mooney DJ. Development of biocompatible synthetic extracellular matrices for tissue engineering. *Trends Biotechnol*. 1998;16(5):224-30.
20. Agrawal CM, Ray RB. Biodegradable polymeric scaffolds for musculoskeletal tissue engineering. *J Biomed Mater Res*. 2001;55(2):141-50.
21. Oh SH, Kim JH, Song KS, Jeon BH, Yoon JH, Seo TB, et al. Peripheral nerve regeneration within an asymmetrically porous PLGA/Pluronic F127 nerve guide conduit. *Biomaterials*. 2008;29(11):1601-9.
22. Oh SH, Kim JR, Kwon GB, Namgung U, Song KS, Lee JH. Effect of surface pore structure of nerve guide conduit on peripheral nerve regeneration. *Tissue Eng Part C Methods*. 2013;19(3):233-43.

23. Kay S, Thapa A, Haberstroh KM, Webster TJ. Nanostructured polymer/nanophase ceramic composites enhance osteoblast and chondrocyte adhesion. *Tissue Eng.* 2002;8(5):753-61.
24. Savaiano JK, Webster TJ. Altered responses of chondrocytes to nanophase PLGA/nanophase titania composites. *Biomaterials.* 2004;25(7-8):1205-13.
25. Souza MC, Fialho SL, Souza PA, Fulgêncio GO, Da Silva GR, Silva-Cunha A. Tacrolimus-Loaded PLGA Implants: In Vivo Release and Ocular Toxicity. *Curr Eye Res.* 2014;39(1):99-102.

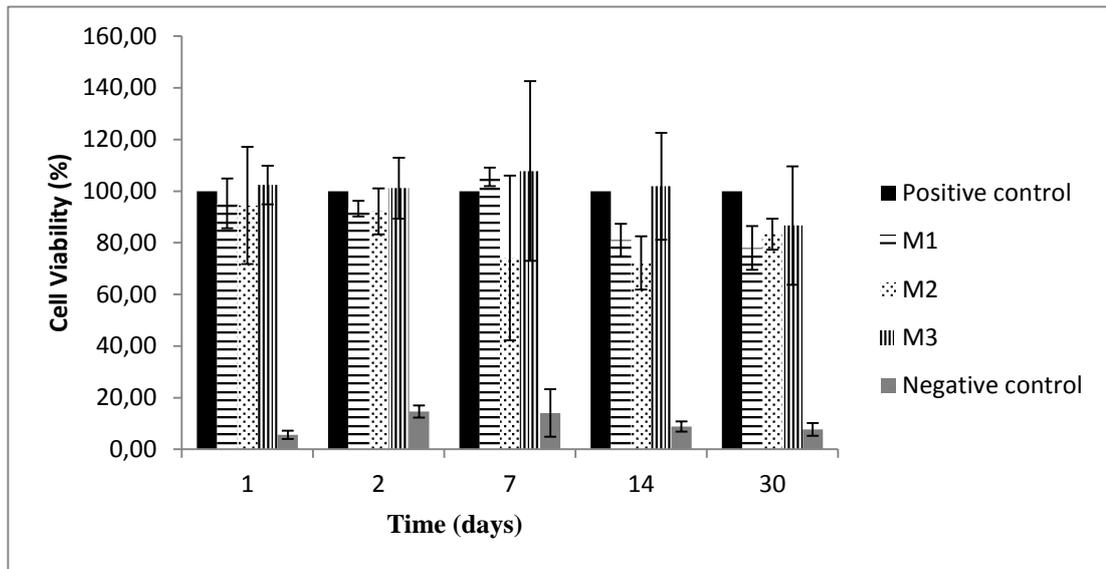


FIGURE 1. Cytotoxicity of biomaterials on NIH 3T3 cells, obtained from the MTT assay at 1, 2, 7, 14 and 30 days. Data represent the mean  $\pm$  SD (n = 4).

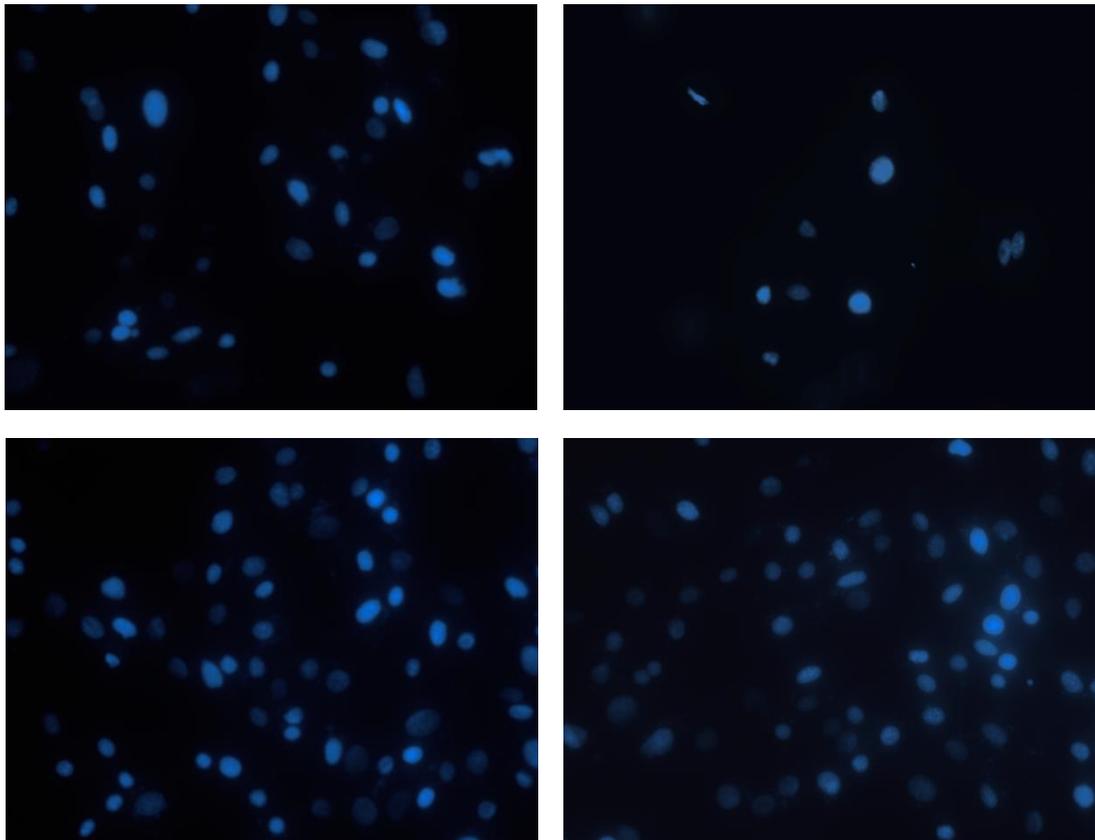


FIGURE 2. Images fluorescent staining with DAPI. There has been an increased proliferation of NIH 3T3 cells over membranes M2 and M3. 20X.

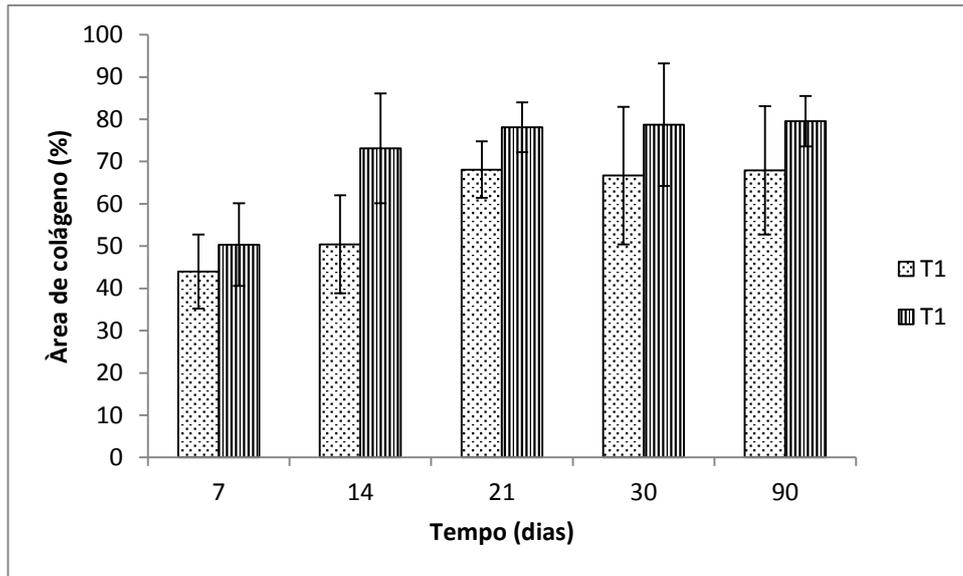


FIGURE 3. Area surrounding tissue present in the copolymer PLGA collagen. T1: Porous PLGA nanotexturizado, T2: Porous PLGA nanotexturizado with tacrolimus.

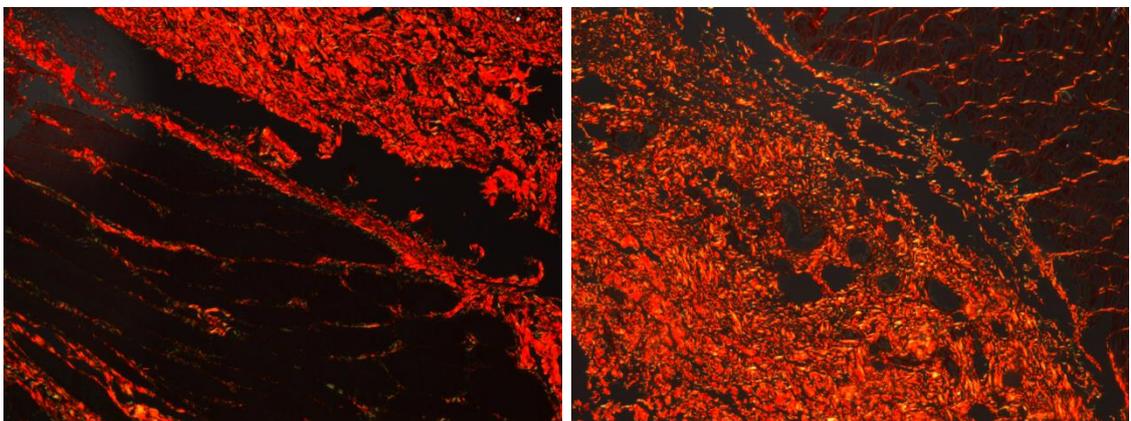


FIGURE 4. Photomicrographs of polarized rat subcutaneous tissue, surrounding the PLGA implants (T1 - T2 image and the left - right image), representing the area of collagen. Picro Sirius Red staining; Increase 100X

## ANEXO B

# ARTIGO DE REVISÃO PUBLICADO

REVIEW ARTICLE

## PERIPHERAL NERVE REGENERATION: CELL THERAPY AND NEUROTROPHIC FACTORS

Alessandra Deise Sebben<sup>1</sup>, Marina Lichtenfels<sup>2</sup>, Jefferson Luis Braga da Silva<sup>3</sup>

### ABSTRACT

Peripheral nerve trauma results in functional loss in the innervated organ, and recovery without surgical intervention is rare. Many surgical techniques can be used for nerve repair. Among these, the tubulization technique can be highlighted: this allows regenerative factors to be introduced into the chamber. Cell therapy and tissue engineering have arisen as an alternative for stimulating and aiding peripheral nerve regeneration. Therefore, the aim of this review was to provide a survey and analysis on the results from experimental and clinical studies that used cell therapy and tissue engineering as tools for optimizing the regeneration process. The articles used came from the LILACS, Medline and SciELO scientific databases. Articles on the use of stem cells, Schwann cells, growth factors, collagen, laminin and platelet-rich plasma for peripheral nerve repair were summarized over the course

of the review. Based on these studies, it could be concluded that the use of stem cells derived from different sources presents promising results relating to nerve regeneration, because these cells have a capacity for neuronal differentiation, thus demonstrating effective functional results. The use of tubes containing bioactive elements with controlled release also optimizes the nerve repair, thus promoting greater myelination and axonal growth of peripheral nerves. Another promising treatment is the use of platelet-rich plasma, which not only releases growth factors that are important in nerve repair, but also serves as a carrier for exogenous factors, thereby stimulating the proliferation of specific cells for peripheral nerve repair.

**Keywords** - Peripheral Nerve System/injuries; Regenerative Medicine; Nerve Regeneration

### INTRODUCTION

Peripheral nerve transection traumas are extremely common in clinical practice and recovery without surgical intervention is rare. Lesions with loss of nerve substance produce serious problems for the patient. Besides causing pain and morbidity, these injuries usually generate permanent sequelae, such as sensory deficit and functional dysfunction. These lesions cause damages that substantially diminish the quality of life of these patients, including physical disability and total or partial loss of their productive activities, which gives rise to important social and economic consequences<sup>(1)</sup>. The current repair techniques offer random and frequently unsatisfactory results. In view

of these limitations, many researchers seek therapeutic options to improve the repair of lesions with peripheral nerve transections<sup>(2)</sup>.

Nowadays autologous peripheral nerve transplantation represents the gold standard of repair when there is loss of substance that precludes neurotaphy. However, it presents some limitations, such as the need to perform two surgical procedures at different sites, the consequent greater morbidity and the shortage of nerve donor sites, besides the resulting sensory deficit in the area from which it was removed<sup>(2,3)</sup>.

In cases where the extent of the lesion precludes the simple joining of the stumps, an available and widely used repair technique is tubulization. This technique,

1 – Biologist, Studying towards Doctoral Degree in Medicine and Health Sciences (PUCRS) – Porto Alegre, RS, Brazil.

2 – Biologist, Studying towards Master's Degree in Medicine and Health Sciences (PUCRS) – Porto Alegre, RS, Brazil.

3 – Physician; Full Professor of the School of Medicine (PUCRS) – Porto Alegre, RS, Brazil.

Study conducted at the Laboratory of Medical Abilities and Surgical Research, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul – PUCRS.

Mailing address: Avenida Ipiranga, 6.690 / 64, Portão – 90610-000 – Porto Alegre, RS. Email: adsebben@gmail.com

Study received for publication: 2/11/2011, accepted for publication: 6/16/2011.

The authors declare that there was no conflict of interest in conducting this work.

This article is available online in Portuguese and English at the websites: [www.rbo.org.br](http://www.rbo.org.br) and [www.scielo.br/rbort](http://www.scielo.br/rbort)

## ANEXO C



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

Ofício 182/10 – CEUA

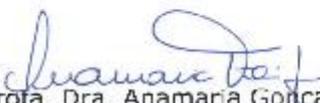
Porto Alegre, 18 de novembro de 2010.

Senhor Pesquisador:

O Comitê de Ética para o Uso de Animais apreciou e aprovou seu protocolo de pesquisa, registro CEUA 10/00190, intitulado: **“Desenvolvimento e aplicação de polímero bioabsorvível como câmara de regeneração de nervo periférico em ratos”**.

Sua investigação está autorizada a partir da presente data.

Atenciosamente,

  
Profa. Dra. Anamaria Gonçalves Feijó  
Coordenadora do CEUA – PUCRS

Ilmo. Sr.  
Prof. Dr. Jefferson Luis Braga da Silva  
N/Universidade

PUCRS

**Campus Central**  
Av. Ipiranga, 5690 – Prédio 60, sala 314  
CEP: 90610-000  
Fone/Fax: (51) 3320-3345  
E-mail: ceua@pucrs.br

## ANEXO D



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

Ofício 025/11 – CEUA

Porto Alegre, 20 de janeiro de 2011.

Senhor Pesquisador:

O Comitê de Ética para o Uso de Animais apreciou e aprovou o acendo ao seu protocolo de pesquisa, registro CEUA 10/00190, intitulado: **“Desenvolvimento e aplicação de polímero bioabsorvível como câmara de regeneração de nervo periférico em ratos”**.

Atenciosamente,

  
Profa. Dra. Anamaria Gonçalves Feijó  
Coordenadora do CEUA – PUCRS

Ilmo. Sr.  
Prof. Dr. Jefferson Luis Braga da Silva  
N/Universidade

PUCRS

Campus Central  
Av. Ipiranga, 6690 – Prédio 60, sala 3L4  
CEP: 90610-000  
Fone/Fax: (51) 3320-3345  
E-mail: ceua@pucrs.br

## ANEXO E



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, INOVAÇÃO E DESENVOLVIMENTO  
ESCRITÓRIO DE TRANSFERÊNCIA DE TECNOLOGIA – ETT

### DECLARAÇÃO

*Ref.: Processo A0086/13, "Conduta absorvível de PLGA/Tacrolimus para regeneração nervosa periférica" de requerimento da aluna de doutorado Alessandra Sebben.*

Declaramos para os devidos fins que a aluna de doutorado Alessandra Sebben, vinculada ao Programa de Pós Graduação em Medicina e Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina, sob orientação do Professor Dr. Jefferson Luis Braga da Silva possui um processo intitulado "Conduta absorvível de PLGA/Tacrolimus para regeneração nervosa periférica", em tramitação junto ao Escritório de Transferência de Tecnologia da FUCRS, sob o nº A0086/13, para avaliação de patenteabilidade.

Devido à vinculação desse processo à Tese de doutorado da aluna, recomenda-se que a banca de avaliação acadêmica deste trabalho ocorra de forma a preservar o sigilo dos dados, mediante assinatura de termo de confidencialidade por todos os membros e avaliadores da banca e participantes internos ou externos. Da mesma forma, recomenda-se que não seja realizada nenhuma publicação envolvendo tal matéria, até a finalização dos trâmites de depósito da possível patente perante o INPI ou sua liberação para publicação pelo ETT, caso a matéria não seja passível de proteção por patente.

Porto Alegre, 23 de Janeiro de 2014.

M. Elizabeth Ritter dos Santos  
Diretora  
Escritório de Transferência de Tecnologia