

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
ESCOLA DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

CARLOS EDUARDO MOTOOKA

**COMPARAÇÃO DE DIFERENTES MÉTODOS PARA
DESCELULARIZAÇÃO DE NERVO**

CURITIBA

2019

CARLOS EDUARDO MOTOOKA

**COMPARAÇÃO DE DIFERENTES MÉTODOS PARA
DESCELULARIZAÇÃO DE NERVO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Pontifícia Universidade Católica do Paraná como requisito para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Felipe Francisco Bondan Tuon

CURITIBA

2019



Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Escola de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE EXAME DE DISSERTAÇÃO DO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE EM NÍVEL
DE MESTRADO DA PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ.

Aos 24 dias do mês de setembro de 2019 às 14:30, realizou-se a sessão pública de Defesa de Dissertação "COMPARAÇÃO DE DIFERENTES MÉTODOS PARA DESCELULARIZAÇÃO DE NERVO PARA BANCO DE TECIDOS" apresentado por Carlos Eduardo Motooka para obtenção do título de mestre; Área de concentração: Medicina e áreas afins.

A banca examinadora foi composta pelos seguintes membros:

MEMBROS DA BANCA	ASSINATURA
Prof. Dr. Felipe Francisco Bondan Tuon – Presidente (PUCPR)	
Prof. Dr. Ricardo Aurino de Pinho (PUCPR)	
Prof. Dr. Jamil Faissal Soni (UFPR)	

De acordo com as normas regimentais a Banca Examinadora deliberou sobre os conceitos a serem distribuídos e que foram os seguintes:

Prof. Dr. Felipe Francisco Bondan Tuon Conceito: Aprovado
Prof. Dr. Ricardo Aurino de Pinho Conceito: Aprovado
Prof. Dr. Jamil Faissal Soni Conceito: Aprovado

Parecer Final: Aprovado

Observações da Banca Examinadora:

Contribuir a inclusão dos sujeitos da banca da dissertação

Prof. Dr. Felipe Francisco Bondan Tuon
Presidente da Banca Examinadora

Prof. Dra. Cristina Pellegri Baeha
Coordenadora do PPGCS-PUCPR

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Edna e Isao, que me deram o dom da Vida, que sempre dedicaram seus esforços e amor aos filhos.

A minha esposa Vanessa, amor da minha vida, minha alma gêmea, minha companheira, que me ajudou, me apoiou, me deu o maior presente da minha vida nosso filho Vinicius, nossa razão de viver.

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da PUC-PR e a Coordenadora do Programa Professora Doutora Cristina Pellegrino Baena pela oportunidade de realizar o Mestrado.

Ao Professor Doutor Felipe Francisco Bondan Tuon, pela amizade, pela dedicação, pelos ensinamentos, pela orientação, pelo exemplo de médico e professor que me ajudou a acreditar em um sonho e na realização desse trabalho.

A Doutora Paula Hansen Suss pelo companheirismo, pelos conselhos, pelas orientações, pelo auxílio na realização de todas as etapas da deste trabalho.

A Mestre Victoria Stadler Tasca Ribeiro pelo incentivo, pelo auxílio na realização dos processos de descélularização.

Ao Laboratório de Patologia Experimental da PUC-PR, coordenado pela Profa. Dra. Lúcia Noronha, em especial a Ana Paula Camargo Martins, Caroline Busatta Vaz De Paula e Seigo Nagashima, por todo o empenho e boa vontade na preparação das lâminas histológicas.

Ao Laboratório de Biomateriais e Engenharia de Superfície PUC-PR, Departamento de Engenharia Mecânica, coordenado pelo Prof. Dr. Paulo Cesar Soares Junior, pela colaboração prestada durante as análises de microscopia eletrônica de varredura.

A Letícia Corso De Melo, aluna de medicina e iniciação científica do Laboratório de Doenças Infecciosas Emergentes da PUC-PR, pelo auxílio nas análises histomorfológicas.

Aos pacientes doadores de tecidos e seus familiares que autorizaram no momento de dor a captação dos nervos para realização deste trabalho

Aos hospitais e funcionários que auxiliaram e tornaram possível a captação dos tecidos

Aos amigos médicos, professores, funcionários e todos que de alguma forma contribuíram para realização desse trabalho.

RESUMO

INTRODUÇÃO: Lesões em nervos periféricos resultam em perda da função do tecido e, na maioria dos casos, requerem intervenção cirúrgica. Várias técnicas cirúrgicas são utilizadas para promover a ponte dos cotos e reparação nervosa. Embora tenham sido desenvolvidas pesquisas com enxertos autógenos, alogênicos e sintéticos, os enxertos alogênicos ainda são os mais indicados e utilizados, porém apresentam uma série de fatores de risco, como o desencadeamento da resposta imune e a possível transmissão de doenças. **OBJETIVO:** Avaliar a eficácia de dois protocolos de descclularização na remoção de componentes celulares e manutenção da arquitetura da matriz extracelular de nervos periféricos humanos. **MÉTODOS:** 24 segmentos de nervos mediano e ulnar humano foram obtidos e tratados por dois métodos de descclularização combinando procedimentos físicos (agitação e sonicação) e químicos (detergentes e ácidos). Método 1 e Método 2. A eficácia da descclularização dos nervos foi avaliada em microscopia ótica com coloração de Hematoxilina/Eosina (H&E) e Luxol Fast Blue (LFB), em microscopia de fluorescência com marcação nuclear com 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI), imuno-histoquímica (IHQ) para S100 e por quantificação e visualização eletroforética de DNA. A manutenção da matriz extracelular (MEC) foi avaliada em microscopia ótica com coloração de tricrômico de Gomori (TG) com análise histomorfométrica dos parâmetros diâmetro das fibras, densidade das fibras e a presença e/ou ausência de mielina e por microscopia eletrônica de varredura (MEV). **RESULTADOS:** A análise histológica por H&E e DAPI e a IHQ para S100 demonstrou que os tecidos descclularizados por ambos os métodos estavam acelulares. A coloração LFB revelou redução significativa da mielina nos tecidos descclularizados pelos métodos estudados. Pela coloração de TG, foi possível observar que a estrutura do arcabouço de colágeno se manteve inalterada após o processo de descclularização, preservando epineuro, perineuro e endoneuro. A quantificação do conteúdo de DNA revelou uma significativa redução para todas as amostras descclularizadas pelo método 1 (mediano $p=0,0047$ e ulnar $p=0,065$) e pelo método 2 (mediano $p=0,0019$ e ulnar $p=0,007$). No entanto, não apresentaram diferença significativa entre os métodos (mediano $p=0,278$ e ulnar $p=0,234$). Foi observado a integridade do DNA no nervo controle e, em todas as amostras de nervos descclularizados por ambos os métodos, foi possível observar apenas um rastro de DNA. Foi verificado o afrouxamento das fibras após a descclularização pelos métodos

1 e 2, bem como a ultraestrutura bem preservada e organizada. **CONCLUSÃO:** Em conjunto, os resultados obtidos neste trabalho sugerem que ambos os métodos de descelularização foram eficazes em modelo de nervo humano.

PALAVRAS-CHAVE: nervo periférico, descelularização, matriz extracelular, aloenxerto, banco de tecidos humanos

ABSTRACT

INTRODUCTION: Injuries in peripheral nerves result in loss of tissue function and, in most cases, require surgical intervention. Several surgical techniques are used to promote bridging of the stumps and nerve repair. Although research with autogenous, allogeneic and synthetic grafts has developed, allogeneic grafts are still the most indicated and used, however they present a series of risk factors, such as the triggering of the immune response and the possible transmission of diseases. **OBJECTIVE:** To evaluate the efficacy of two decellularization protocols in the removal of cellular components and maintenance of the architecture of the extracellular matrix of human peripheral nerves. **METHODS:** 24 segments of the human median and ulnar nerves were obtained and treated by two decellularization methods combining physical (agitation and sonication) and chemical (detergents and acids) procedures. Method 1 and Method 2. Efficacy of nerve decellularization was assessed by Hematoxylin / Eosin (H&E) and Luxol Fast Blue (LFB) stained light microscopy under 4^x, 6-diamino-2 nuclear-labeled fluorescence microscopy - phenylindole (DAPI), immunohistochemistry (IHC) for S100, and by electrophoretic DNA quantification and visualization. The maintenance of the extracellular matrix (ECM) was evaluated by optical microscopy with Gomori trichrome staining (TG) with histomorphometric analysis of the parameters fiber diameter, fiber density and the presence and / or absence of myelin and by scanning electron microscopy (MEV). **RESULTS:** Histological analysis by H&E and DAPI and IHC for S100 showed that the decellularized tissues by both methods were acellular. LFB staining revealed significant reduction of myelin in decellularized tissues by the studied methods. By TG staining, it was possible to observe that the structure of the collagen framework remained unchanged after the decellularization process, preserving epineurium, perineurium and endoneurium. Quantification of DNA content revealed a significant reduction for all samples decellularized by method 1 (median $p = 0.0047$ and ulnar $p = 0.065$) and by method 2 (median $p = 0.0019$ and ulnar $p = 0.007$). However, there were no significant differences between the methods (median $p = 0.278$ and ulnar $p = 0.234$). DNA integrity was observed in the control nerve, and in all nerve samples decellularized by both methods, only one DNA trace could be observed. The fiber loosening after decellularization was verified

by methods 1 and 2, as well as the well preserved and organized ultrastructure.

CONCLUSION: The methods were effective in the decellularization of the human nerve segment.

KEY WORDS: peripheral nerve, decellularization, extracellular matrix, allograft, human tissue bank

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Anatomia do nervo periférico.....	16
Figura 2. Classificação para lesões de nervo periférico.....	18
Figura 3. Degeneração e regeneração do nervo.....	19
Figura 4. Exposição do nervo mediano durante processo de captação.....	26
Figura 5. Fluxograma referente às etapas da pesquisa em relação às amostras do estudo.....	27
Figura 6. Preparo dos nervos.....	28
Figura 7. Principais etapas dos métodos de descelularização.....	28
Figura 8. Análise histológica e imuno-histoquímica comparativa de cortes transversais.....	35
Figura 9. Análise histológica e imuno-histoquímica comparativa de cortes longitudinais.....	36
Figura 10. Marcação nuclear de seções transversais através da coloração de DAPI.....	37
Figura 11. Esquema demonstrando a mensuração dos parâmetros dos nervos.....	37
Figura 12. Análise da densidade de feixe com mielina por μm^2 para nervo mediano e ulnar.....	38
Figura 13. Quantificação e observação de DNA.....	39
Figura 14. Microscopia eletrônica de varredura para o nervo não processado (controle) e descelularizado pelo método M1 e pelo método M2.....	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Métodos e características dos processos de descelularização.....	21
Tabela 2. Característica dos doadores dos nervos.....	26
Tabela 3. Tamanho dos segmentos nervos captados.....	26
Tabela 4. Relação de colorações utilizadas para evidenciar células e elementos da matriz extracelular dos nervos periféricos.....	29

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
DAPI	4',6'-diamino-2-fenilindol (do inglês: <i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i>)
DNA	Ácido Desoxirribonucleico (do inglês: <i>Deoxyribonucleic Acid</i>)
dsDNA	DNA dupla fita (do inglês: <i>double-stranded DNA</i>)
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético (do inglês: <i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>)
FDA	Administração de Comidas e Remédios (do inglês: <i>Food and Drug Administration</i>)
GAG	Glicosaminoglicano
H&E	Hematoxilina e Eosina
INPI	Instituto Nacional de Propriedade Industrial
ISO	Organização Internacional de Normalização (do inglês: <i>International Organization for Standardization</i>)
LFB	Luxol Fast Blue
MEC	Matriz extracelular
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
pb	Pares de base
PBS	Solução tampão fosfatada (do inglês: <i>phosphate buffered saline</i>)
SDS	Dodecil sulfato de sódio (do inglês: <i>sodium dodecyl sulfate</i>)
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TG	Tricrômico de Gomori

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO.....	15
1.1 O sistema nervo periférico.....	15
1.2 Lesão de nervo periférico.....	17
1.3 Regeneração dos nervos periféricos.....	19
1.4 Descelularização.....	20
2.JUSTIFICATIVA.....	23
3.OBJETIVOS.....	24
4.MÉTODOS.....	25
4.1 Amostras.....	25
4.2 Captação.....	25
4.3 Preservação do nervo até descelularização.....	27
4.4 Descelularização.....	28
4.5 Análise histológica.....	29
4.6 Imuno-histoquímica.....	29
4.7 Histomorfometria.....	30
4.8 Análise de DNA residual.....	31
4.9 Microscopia eletrônica de varredura.....	31
4.10 Análise estatística	32
5.RESULTADOS.....	33
5.1 Análise histológica e imuno-histoquímica.....	33
5.2 Histomorfometria.....	37
5.3 Análise molecular e quantificação de DNA.....	38
5.4 Microscopia Eletrônica de Varredura.....	39
6.DISSCUSSÃO.....	41
7.CONCLUSÃO.....	45
8.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	46
9.ANEXOS.....	50
9.1 TCLE.....	50
9.2 Parecer CEP.....	53
9.3 Outros.....	56

1. INTRODUÇÃO

A lesão em nervos periféricos leva a perda de função do órgão efector. Nos membros periféricos as lesões traumáticas são comuns e afetam 2,8% dos politraumatizados (Grinsell *et al.*, 2014). Cerca de 350 mil lesões de nervo por anos nos Estados Unidos (Beris *et al.*, 2019). Causam incapacidade aos membros principalmente em lesões traumáticas nas mãos (Grinsell *et al.*, 2014). A perda funcional, com conseqüente incapacidade laboral, gera dor, desconforto e alto custo financeiro. Nos Estados Unidos cerca de 150 milhões de dólares são gastos diretamente com pacientes com qualquer grau de lesão nervosa (Houschyar *et al.*, 2016). No entanto, o custo indireto muitas vezes não é avaliado, pois engloba todas as morbidades e complicações relacionadas à perda funcional do membro.

O uso do enxerto de nervo autólogo é restrito devido às limitações do número de fonte de enxertos, se faz necessário a criação de um modelo como possível fonte opcional na prática clínica (Safa *et al.*, 2016). Nesse cenário, desenvolver novas técnicas e processos que melhorem a recuperação do doente é o desafio de todo médico e pesquisador.

1.1. O Sistema Nervoso Periférico

O Sistema Nervoso Periférico (SNP) é constituído por gânglios e nervos, com a função de conectar o sistema nervoso central (SNC) às demais partes do corpo humano. Aglomerados de corpos celulares de neurônios sensitivos formam os gânglios nervosos, enquanto que os nervos consistem de feixes dispostos paralelamente e classificados como sensitivos, motores e mistos (Grant *et al.*, 1999). O SNP é formado pelo SNP motor (SNPM) ou somático e SNP autônomo (SNPA) ou visceral. As fibras nervosas motoras do SNPM conduzem impulsos do SNC aos músculos estriados esqueléticos, com a função de controlar estímulos provenientes do ambiente externo. Os gânglios das quais partem as fibras do SNPM localizam-se no encéfalo ou na medula e seguem em direção aos órgãos-alvo (Chang *et al.*, 2015).

Os nervos periféricos são estruturas anatômicas de primordial importância responsáveis pela ligação do sistema nervoso central com todo corpo,

conduzindo o comando das funções voluntárias e involuntárias dos diversos sistemas do organismo (Matsuyama *et al.*, 2000, Grinsell *et al.*, 2010).

Os principais componentes celulares do nervo periférico são as células perineurais, os fibroblastos, os macrófagos e as células de Schwann, estas últimas capazes de produzir a bainha de mielina que envolve os axônios, isolando-os eletricamente o que permite a rápida propagação dos potenciais de ação.

Os nervos periféricos são formados pelo conjunto de axônios dos neurônios existentes no sistema nervoso agrupados em feixes paralelos, denominados de fascículos. O tecido que reveste cada axônio individualmente é o endoneuro, formado por fibras colágenas e glicosaminoglicanos, em que as fibras de colágeno irão formar as paredes de proteção dos tubos endoneurais. Os feixes de axônios agrupadas em fascículos são revestidos pelo perineuro, que é formado por camadas concêntricas de fibroblastos, fibras colágenas entre as células. O tecido que reveste todo o tronco nervoso é denominado epineuro, constituído de tecido conjuntivo denso cujas fibras colágenas tem como função proteger os fascículos de traumas externos (Lin *et al.*, 2013) (Fig 1).

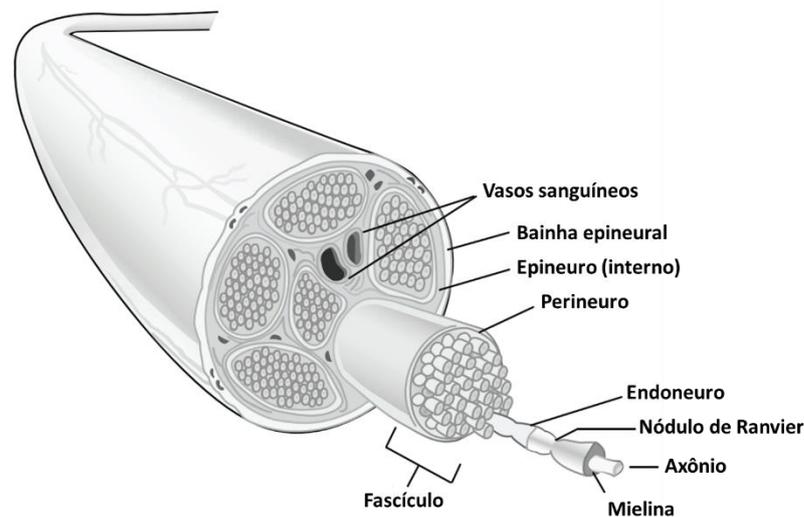


Figura 1. Anatomia nervo periférico – Adaptado de Grinsell e Keating, 2014.

A matriz extracelular (MEC) dos nervos periféricos é composta principalmente por colágeno, fibronectina, laminina e componentes não fibrilares (proteoglicanos e glicosaminoglicanos como ácido hialurônico, sulfato de condroitina e sulfato de heparana) que estão organizados em uma estrutura tridimensional (Chernousov *et al.*, 2008; Deumens *et al.*, 2010; Allodi *et al.*,

2012). Estas moléculas estão presentes em diferentes proporções ao longo das camadas estromais dos nervos periféricos, sendo importantes parâmetros do ponto de vista regenerativo e biomecânico (Topp e Boyd, 2006). Estes componentes da MEC são fundamentais para a orientação e o crescimento axonal durante o processo de regeneração nervosa. Os colágenos formadores de fibras tipo I e III formam o epineuro, enquanto o colágeno tipo IV, formador de rede, está localizado na lâmina basal dos vasos sanguíneos e nas fibras dos nervos periféricos (Gonzalez-Perez *et al.*, 2013). Segundo Sridharan *et al.* (2014) fibras colágenas são organizadas em fibrilas em um padrão ondulado, permitindo flexibilidade ao nervo.

1.2. Lesão do nervo periférico

A lesão em nervos periféricos leva a perda de função do órgão efector. Nos membros periféricos as lesões nervosas traumáticas são comuns e afetam 2,8 a 5% dos politraumatizados. Causam incapacidade aos membros principalmente em lesões traumáticas nas mãos (Grinsell *et al.*, 2014; Beris *et al.*, 2019). A perda funcional, com conseqüente incapacidade laboral, gera dor, desconforto e alto custo financeiro. Nos Estados Unidos são 350 mil casos de lesão de nervo ao ano e cerca de 150 milhões de dólares são gastos diretamente com pacientes com qualquer grau de lesão nervosa (Houschyar *et al.*, 2016; Beris *et al.*, 2019). No entanto, o custo indireto muitas vezes não é avaliado, pois engloba todas as morbidades e complicações relacionadas à perda funcional do membro.

A etiologia das lesões traumáticas de nervos periféricos ocorre por diversos mecanismos: lesão penetrante, esmagamento, tração, isquemia e mecanismos menos comuns, tais como, o choque térmico, elétrico, radiação, percussão e vibração (Robinson *et al.*, 2000). Em geral, as lesões por estiramento são o tipo mais comum de trauma do nervo em civis, especialmente em acidentes de automóvel. As lacerações, por vidro, faca, lâmina de serra ou fraturas de ossos longos correspondem a cerca de 30% das lesões nervosas graves (Campbell, 2008). Outro mecanismo comum de lesão é a compressão, a qual pode envolver deformação mecânica bem como isquemia (Stanec *et al.*, 1997).

Os diferentes tipos de lesões foram classificados por Seddon (1942) pelos níveis de gravidade em neuropraxia, axoniotmese e neurotmeze. A neuropraxia

ocorre pelo bloqueio fisiológico da transmissão sem rompimento da estrutura do nervo periférico. A axoniotmese ocorre pela lesão com ruptura do axônio sem o rompimento da bainha externa. A neurotmese ocorre pela ruptura do axônio bem como da bainha externa, promovendo uma separação total da estrutura (Fig 2). Posteriormente, Sunderland (1951) descreveu outra classificação dividindo a lesão nervosa em 5 níveis. A lesão Grau 1: semelhante a neuropraxia de Seddon; Grau 2: lesão do axônio mantendo endoneuro intacto; Grau 3: lesão do axônio e endoneuro mantendo perineuro e epineuro íntegro; Grau 4: lesão do axônio, endoneuro e perineuro mantendo epineuro íntegro; Grau 5: lesão total semelhante a neurotmese de Seddon (Fig 2).

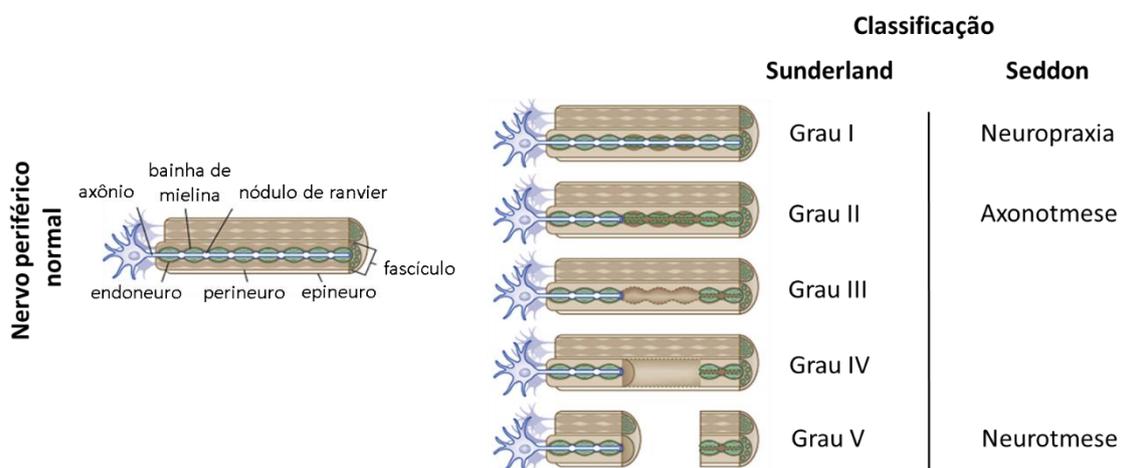


Figura 2. Classificação de Seddon e Sunderland para lesão do nervo periférico. Adaptado de Menorca et al., 2013.

Após a lesão, em que há rompimento axonal, ocorre um processo de degeneração causado pela separação do corpo celular de sua porção distal. Há uma quebra da transmissão sináptica e inicia-se a degeneração do citoesqueleto axonal através de proteólise ativada pelo Ca^{++} (Degeneração Walleriana). As células de Schwann se multiplicam e, em conjunto com macrófagos, removem os *debris* de mielina e de axônio, além de estimular a produção de citocinas indutoras do crescimento axonal. O novo broto cresce nos nódulos de Ranvier guiado pelas células de Schwann pelo *gap* dos cotos. Este processo de regeneração acontece na taxa de 1mm por dia e a re-inervação funcional ocorre quando o broto axonal alcança o órgão efector. Após a regeneração total do axônio com envolvimento das células de Schwann ocorre a remielinização. (Griffin *et al.*, 2014, Houschyar *et al.*, 2016). Contudo, nas lesões de

axoniotmese, com destruição do endoneuro e perineuro, e de neurotmeze, a regeneração não é possível naturalmente, pois há a necessidade da permanência do conduto para que o broto neural alcance a outra extremidade e refaça a nova conexão. Nestes casos é necessária uma intervenção externa com a reconstrução cirúrgica possibilitando o crescimento do novo broto do nervo (Griffin *et al.*, 2014, Houschyar *et al.*, 2016) (Fig 3).

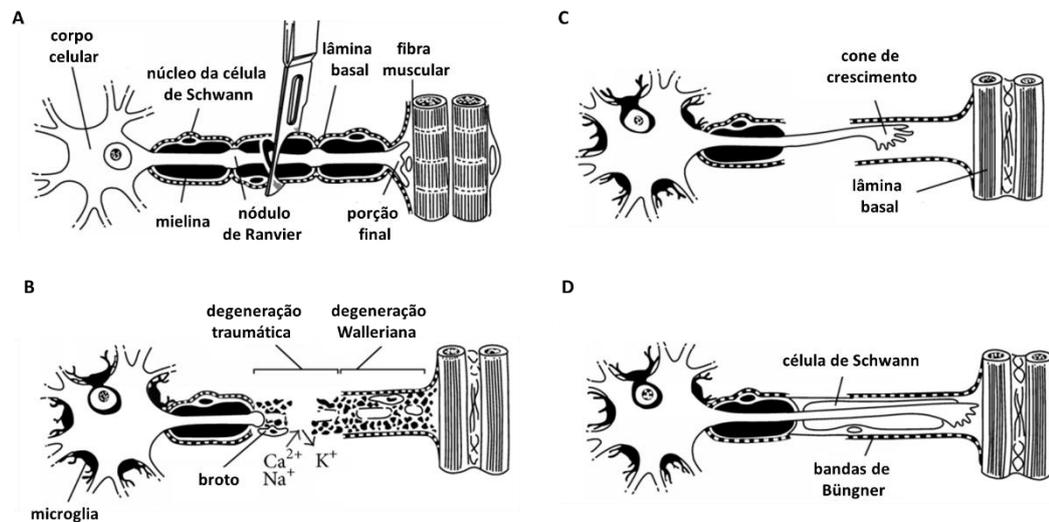


Figura 3. Degeneração e regeneração do nervo. Adaptado de Grinsell e Keating, 2014.

1.3. Estratégias para a regeneração dos nervos periféricos

Atualmente a técnica microcirúrgica é a mais aceita no reparo das lesões nervosas através da neurorafia termino-terminal, unindo os cotos do nervo (Matsuyama *et al.*, 2000). A união dos cotos possibilita a regeneração com o crescimento axonal dentro do coto distal vazio após a degeneração walleriana. Nas lesões sem possibilidade da neurorafia termino-terminal devido a retração dos cotos ou lesões de maior gravidade com perda de segmento do nervo, há a necessidade de uma ponte de ligação entre os cotos. Neste caso o padrão ouro para regeneração do nervo é a utilização de enxerto de nervo autólogo, em que se retira um segmento de nervo de outro sítio anatômico do próprio paciente. O enxerto promoverá a ligação entre os cotos provendo o canal para regeneração axonal. O diâmetro e o comprimento do enxerto são uma dificuldade, que muitas vezes não são compatíveis entre a área doadora e receptora. Uma restrição da técnica é uma perda de função da área doadora (Matsuyama *et al.*, 2000, Dvali *et al.*, 2007, Ray *et al.*, 2010). Na tentativa de evitar esse problema, diversas

técnicas foram utilizadas para promover a ponte de ligação dos cotos tais como o uso do aloenxerto de doador cadáver, criação de neurotubos sintéticos ou naturais, reparo de nervo término-lateral e transferências nervosas (Griffin *et al.*, 2014, Grinsell *et al.*, 2014, Houschyar *et al.*, 2016, Safa *et al.*, 2016).

O uso do aloenxerto proveniente de cadáver é a técnica que mais se aproxima do autoenxerto. Tem o benefício de não lesar a área doadora como no autoenxerto e facilita a técnica cirúrgica pela possibilidade de escolha do comprimento e diâmetro do enxerto. O aloenxerto demonstrou ser mais eficiente do que o neurotubo e até equivalente ao enxerto autólogo em certos casos (Lin *et al.*, 2013, Safa *et al.*, 2016). No entanto, a falta de preparação deste enxerto de nervo pode levar a uma reação imunológica, hospedeiro *versus* enxerto. A abordagem clínica mais comum, nesse caso, é a imunossupressão farmacoterápica dos pacientes submetidos a reconstrução de nervo por aloenxertia (Ray *et al.*, 2010).

1.4. Descelularização

Os tecidos alogênicos e os xenogênicos são alternativas possíveis aos autoenxertos, mas embora estejam disponíveis e sejam abundantes, apresentam uma série de fatores de risco, como a resposta imunogênica e a possível transmissão de doenças. Em tais circunstâncias, é necessária a imunossupressão sistêmica de forma a prevenir a rejeição do enxerto, contudo a morbidade associada à terapia imunomoduladora limita a aplicação de aloenxerto de nervo. Por esta razão, tem sido desenvolvida uma estratégia para a remoção dos componentes imunogênicos, que consiste na remoção do material celular e nuclear, preservando a composição, atividade biológica e integridade mecânica da MEC remanescente (Crapo *et al.*, 2011; Carriel *et al.*, 2014). Desta forma, o processo de descelularização de segmentos de nervos periféricos permite aprimorar a reconstrução de nervos sem a necessidade de imunossupressão, uma vez que o nervo doado terá um potencial de rejeição muito baixo ou mesmo nulo (Szynkaruk *et al.*, 2013).

Existem diferentes metodologias descritas na literatura para a descelularização de nervos (Tab1): preservação a frio (Evans *et al.*, 1998), congelamento e descongelamento (Boyer *et al.*, 2015; Kaizawa *et al.*, 2017),

detergentes químicos (Sondell *et al.*, 1998; Hudson *et al.*, 2004; Zilic *et al.*, 2016), degradação enzimática (Krekoski *et al.* 2001).

Tabela 1. Métodos e características dos processos de descelularização.

Preservação a frio	Nervo em solução de preservação a 4°C por 7 a 14 dias. Descelularização natural (Evans <i>et al.</i> , 1998)
Congelamento	Congelamento e descongelamento em solução que evite a cristalização da água (Boyer <i>et al.</i> , 2015; Kaizawa <i>et al.</i> , 2017)
Detergentes químicos	Troca de soluções com detergentes químicos. Descelularização com lise celular através de agentes químicos (Sondell <i>et al.</i> , 1998; Hudson <i>et al.</i> , 2004)
Degradação enzimática	Troca de soluções com agentes enzimáticos. Descelularização com lise celular através de agentes enzimáticos (Krekoski <i>et al.</i> 2001)
Sonicação	Agitação em sonicador que auxilia na quebra celular e degradação de moléculas (Boriani <i>et al.</i> 2017)

A técnica de preservação a frio promove a regeneração neuronal, evidenciando recuperação funcional. A implantação de células de Schwann no aloenxerto aumentou a eficiência do método (Jesuraj *et al.*, 2013). Esta metodologia, porém, mantém presentes células do doador no aloenxerto, trazendo a necessidade do uso de medicação imunossupressora, temporária ou permanente, aumentando a morbidade do tratamento (Fox *et al.*, 2004, Ray *et al.*, 2010; Ray *et al.*, 2011).

A descelularização química utiliza lavagens do tecido nervoso em solução com detergentes que possibilitam a degradação celular, remoção dos *debris* e bainha de mielina. O protocolo mais utilizado foi desenvolvido por Sondell *et al.* (1998), que demonstrou boa remoção *in vitro* de células e da bainha de mielina, além disso, apresentou satisfatória regeneração nervosa com ausência de resposta inflamatória *in vivo*. Este método baseia-se em dois passos sequenciais com uma solução de Triton X-100 a 3% seguida por uma solução de desoxicolato de sódio a 4%, em que a combinação de um agente tensoativo não iônico com um detergente aniônico é considerada eficiente para lisar quimicamente as células.

Hudson *et al.* (2004) propuseram um tratamento químico mais suave para preservar melhor a estrutura da MEC. Esta metodologia requer várias etapas com duas repetições com uma solução de sulfobetaina-10 (SB-10) 125 mM e uma solução detergente aniônica de 0,14% de Triton X-200 e 0,6 mM de

sulfobetaina-16 (SB-16). O uso de detergentes com uma toxicidade moderada em baixas concentrações permitiu reduzir a imunogenicidade e melhorar a regeneração do nervo (Hudson *et al.*, 2004). A fim de eliminar o sulfato de condroitina, que são conhecidos por inibir o crescimento axonal, Krekoski *et al.* (2001) introduziram uma etapa de degradação dos proteoglicanos por meio da enzima condroitinase ABC. Ao inserir esta etapa nas metodologias, alguns autores conseguiram otimizar seus protocolos (Krekoski *et al.*, 2001; Neubauer *et al.*, 2007).

Dentre os métodos descritos na literatura, Boriani *et al.* (2017) associaram um processo físico, a sonicação, ao tratamento químico já utilizados anteriormente. Philips *et al.* (2018) associou reação enzimática com DNase e RNase aos processos químicos já descritos demonstrando melhor efetividade na descelularização dos nervos. Outro fator que demonstrou melhora da efetividade do aloenxerto é o método conservação e armazenamento do aloenxerto até sua utilização (Sridharan *et al.*, 2014).

Um dos passos mais importantes após o processo de descelularização é a confirmação de que o nervo não apresenta mais componentes celulares. Na comprovação de descelularização de um tecido, há critérios mínimos a serem atingidos, atendendo a proposta de baixa resposta imunológica do hospedeiro, sendo: (1) Ausência de núcleos em lâmina corada; (2) Resíduo de DNA dupla fita (dsDNA) menor que 50ng por mg de tecido seco; (3) Fragmentos de DNA menores que 200 pares de base (pb) (Crapo *et al.*, 2011). Além destes, os nervos descelularizados precisam manter suas características mecânicas para resistir a força de tração dos movimentos do membro (Wang *et al.*, 2012).

É importante ter uma avaliação completa do equilíbrio entre a remoção das células e a preservação da MEC, pois se faz necessário a manutenção do conduto endoneural suficientemente resistente e biocompatível para conduzir novos axônios.

2. JUSTIFICATIVA

Tendo em vista que as lesões traumáticas de nervos periféricos constituem uma importante causa de morbidade se faz necessário o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas na tentativa de diminuir o imenso impacto social e econômico que estas causam na sociedade moderna.

No Brasil não há aprovação dos órgãos reguladores para o uso de aloenxerto na prática clínica. O projeto compara duas novas metodologias utilizando detergentes em diferentes concentrações associados ao processo de sonicação modificando metodologias já descritas na literatura.

O estudo se propõe a contribuir com o desenvolvimento de métodos simples, reproduzíveis, de baixo custo. Trará benefícios a diversos pacientes, evitando uso de imunossupressores pós-operatório, diminuindo tempo cirúrgico, sendo relevante para a saúde pública nacional.

3. OBJETIVOS

Principal

Avaliar e comparar a eficácia de dois protocolos de decelularização na remoção de componentes celulares e manutenção da arquitetura da matriz extracelular de nervos periféricos humanos.

Específicos

Avaliar e comparar a eficácia de dois processos de descclularização de nervos periféricos e a integridade tecidual;

Avaliar e comparar a eficácia do processo de descclularização de nervos periféricos;

Avaliar e comparar a arquitetura tecidual de nervos periféricos após o processo de descclularização.

4. MÉTODOS

4.1 Amostras

As amostras de nervos periféricos utilizadas neste trabalho foram provenientes de pacientes que foram diagnosticados com morte encefálica ou parada cardiorrespiratória que entraram no programa de doação de órgãos. Os familiares foram abordados pessoalmente para que o doador entrasse no estudo com a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) após concordância com o estudo. No período de junho de 2018 a março de 2019, foram abordados 12 familiares com 6 autorizações. Este estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (aprovação nº 2.534.605).

4.2 Captação do nervo

Foram captados os nervos ulnar (n=12) e mediano (n=12) nível do antebraço bilateralmente de 6 doadores (Tab 2) com trinta minutos pós óbito, totalizando 24 segmentos de nervos periféricos (Tab 3). A escolha dos nervos mediano e ulnar se deve pela facilidade da captação por um único acesso cirúrgico e por apresentarem característica macroscópica semelhantes. Em ambiente cirúrgico com os cuidados de assepsia adequados, foi realizada uma incisão longitudinal anterior do antebraço entre prega do cotovelo e punho com dissecação cuidadosa, expondo o nervo mediano e ulnar sem fazer lesão à estrutura. Após a dissecação foi retirado o segmento de cada nervo. Os nervos foram dissecados mecanicamente para remoção de gordura e debris teciduais (Fig 4).

Tabela 2: Características dos doadores.

Doador	Sexo	Idade (anos)	Altura (cm)	Peso (kg)
1	F	31	170	90
2	F	58	165	56
3	M	78	173	78
4	F	54	165	78
5	M	21	171	70
6	M	57	168	70

Tabela 3: Descrição do comprimento em milímetros (mm) dos nervos coletados.

Doador	Nervo			
	Mediano Direito	Mediano Esquerdo	Ulnar Direito	Ulnar Esquerdo
1	180 mm	170 mm	160 mm	145 mm
2	165 mm	160 mm	135 mm	160 mm
3	155 mm	140 mm	135 mm	130 mm
4	150 mm	160 mm	160 mm	165 mm
5	145 mm	140 mm	150 mm	145 mm
6	150 mm	145 mm	135 mm	140 mm
Média	157,50 mm	152,50 mm	145,83 mm	147,50 mm
Desvio Padrão	±12,94 mm	±12,54 mm	±12,41 mm	±12,94 mm

**Figura 4.** Exposição do Nervo Mediano durante captação.

4.3 Preservação do nervo até a descellularização

Após a captação, os nervos foram imersos em água destilada (dH₂O) e transportados em temperatura ambiente até o Laboratório de Doenças Infecciosas Emergentes da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (LEID/PUCPR). Os nervos foram medidos com o auxílio de régua em campo cirúrgico estéril e divididos para os diferentes processamentos. O nervo ulnar direito, o nervo ulnar esquerdo, o nervo mediano direito e o nervo mediano esquerdo foram divididos e submetidos a dois processos diferentes de descellularização: Método 1 (M1) e Método 2 (M2). Um segmento fresco de todos os nervos captados foi utilizado como controle. (Fig 5 e 6).

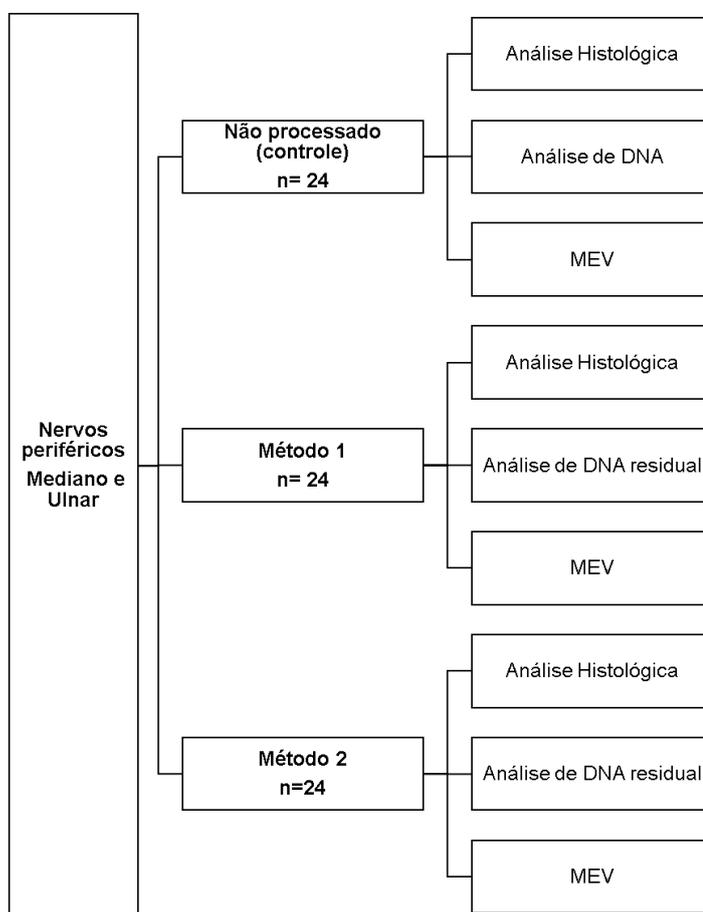


Figura 5. Fluxograma referente às etapas da pesquisa em relação às amostras do estudo.

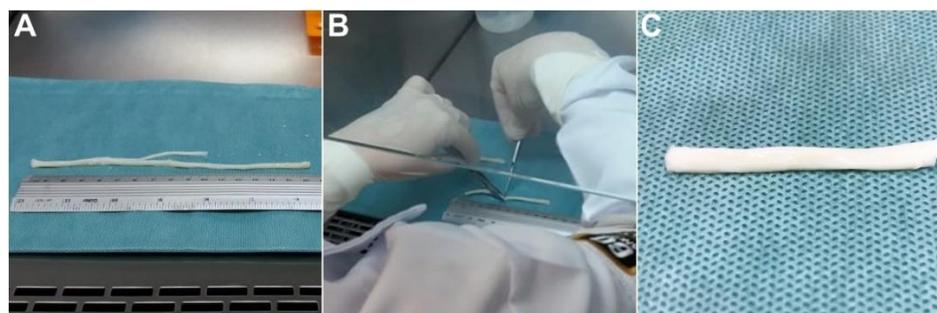


Figura 6. Preparo dos nervos. A) mensuração do segmento de nervo; B) Manipulação do tecido em fluxo laminar; C) Segmento de nervo para descelularização.

4.4 Descelularização

Para a descelularização, foram utilizados os detergentes Triton X-100 e dodecil sulfato de sódio (SDS), ácido etilenodiamintetracético (EDTA) e o ácido peracético e sonicação. M1 descelularização em solução com detergentes em agitação e M2 descelularização em solução com detergentes em agitação e **sonicação**. Após foi realizada lavagem com água por 5 dias para assegurar a remoção completa dos detergentes. Os diferentes processos estão demonstrados na figura 7.

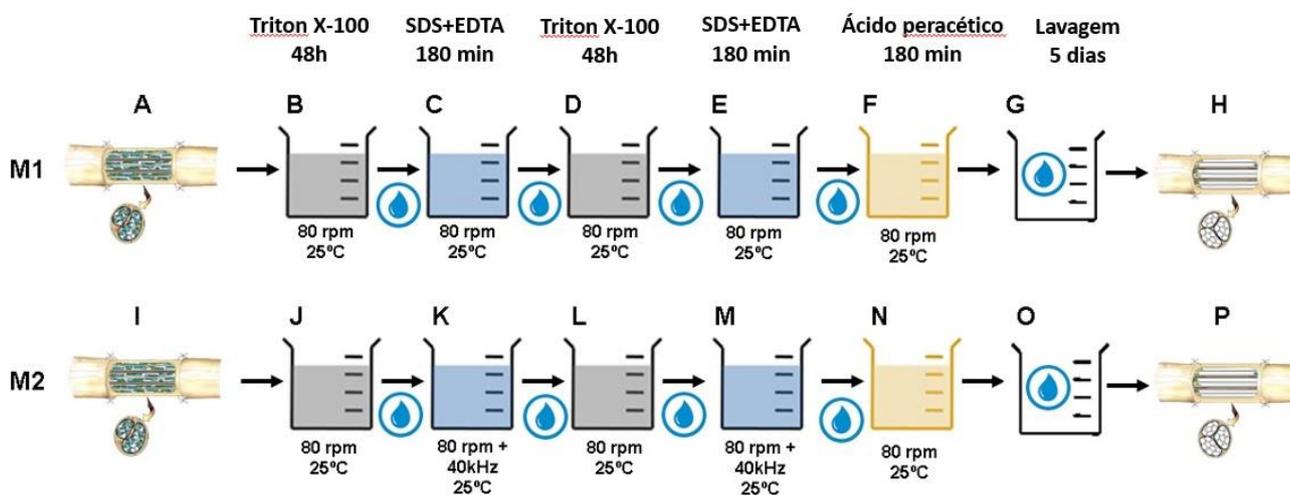


Figura 7. Principais etapas dos diferentes métodos de descelularização. M1: (A) Nervo fresco; (B) solução de Triton X-100 por 48h, (C) solução de SDS + EDTA por 180 min; (D) solução de Triton X-100 por 48h; (E) solução de SDS + EDTA por 180 min; (F) solução tampão fosfatada (PBS) com ácido peracético por 180 min; (G) Lavagem com água por 5 dias com troca a cada 24 horas; (H) Nervo descelularizado. M2: (I) Nervo fresco; (J) solução de Triton X-100 por 48h, (K) solução de SDS + EDTA por 180 minutos + **sonicação**; (L) solução de Triton X-100 por 48h; (M) solução de SDS + EDTA por 180 minutos + **sonicação**; (N) solução tampão fosfatada (PBS) com ácido peracético por 180 min; (O) Lavagem com água por 5 dias com troca a cada 24 horas; (P) Nervo descelularizado.

4.5 Análise Histológica

Com o objetivo de comparar o potencial de descelularização dos protocolos utilizados, amostras de tecido de todos os grupos foram submetidas a processamento histológico e análise do DNA residual. Para a realização do exame anatomopatológico, as amostras foram fixadas em formol 10%, emblocadas em parafina e cortadas em micrótomo (4µm) para em seguida, serem coradas com 0,05 IL/mL de 4',6- diamidino-2-phenylindole (DAPI) para microscopia de fluorescência e Hematoxilina-Eosina (H&E) para microscopia ótica para análise de presença de material nuclear. Para verificar possíveis alterações na matriz extracelular dos tecidos descelularizados, os cortes histológicos foram corados com Tricrômico de Gomori (TG) e Luxol Fast Blue (LFB) para microscopia ótica. As preparações histológicas foram analisadas em microscópio óptico (Olympus™ BX51, Tóquio, Japão) e digitalizadas no scanner Axio Scan.Z1 (Carl Zeiss - Oberkochen, Alemanha). O tecido descelularizado foi comparado ao tecido não processado (controle), sendo observados os aspectos de disposição das células e organização das fibras de matriz extracelular (Tab 4).

Tabela 4. Relação das colorações utilizadas para evidenciar células e elementos da matriz extracelular dos nervos periféricos.

Coloração	Componentes teciduais	Visualização
H&E	Núcleo	Roxo
	Tecido conjuntivo Bainha de mielina	Rosa
Tricrômico de Gomori	Fibras colágenas	Verde
Luxol Fast Blue	Bainha de mielina	Azul
DAPI	Núcleo	Fluorescência Azul

4.6 Imuno-histoquímica

A identificação do S100, um marcador específico de célula de Schwann, se deu por meio da técnica de imuno-histoquímica. Foi realizada a desparafinização dos cortes em estufa a 60°C por 30 minutos seguido por 1 banho de 10 minutos em

xilol. Os cortes foram reidratados através de banhos sucessivos de 5 minutos em graduações descendentes de etanol (etanol 100%, etanol 85% e etanol 70%) e por fim em água destilada. O bloqueio da peroxidase endógena foi feito com solução de peróxido de hidrogênio e metanol a 5%. Em seguida foi realizada a recuperação antigênica com recuperador Imuno Retrivaler pH 6/9 em cuba de banho-maria a 99°C por 25 min. Após, as lâminas esfriaram a temperatura ambiente, foram lavadas com água destilada, secas e o contorno da amostra foi realizado com caneta hidrofóbica para delimitar o corte. Para avaliar a presença de células de Schwann foi adicionado o anticorpo primário S100 (Dako, Glostrup, Hovedstaden, Dinamarca, diluição 1:400) e as lâminas foram incubadas em câmara úmida entre 2 e 8°C em geladeira, *overnight*. Para detectar o antígeno foi utilizado o kit HRP-DAB (Reveal Polyvalent HRP-DAB Detection System, Spring Bioscience, CA, USA). Foi adicionado o anticorpo de revelação complemento por 10 min em temperatura ambiente. Em seguida, as lâminas foram lavadas com tampão TBS tris pH 7.3, secas, foi adicionado o anticorpo de revelação polímero que reage com o anticorpo primário e o substrato-cromogênio (DAB) e incubadas por 15 min em temperatura ambiente. A reação foi revelada por meio da adição do cromógeno DAB (1:1) até a visualização da cor castanha em seguida foi realizada lavagem com água destilada. As lâminas foram contracoradas com Hematoxilina de Harris por 5 minutos, posteriormente lavadas em água corrente por 5 minutos, desidratadas em graduações de álcool (70%, 85% e 100%) e montadas em resina Histolan® e lamínula.

4.7 Histomorfometria

Parâmetros como o diâmetro das fibras, densidade das fibras e a presença e/ou ausência de mielina foram analisados através de secções transversais coradas por Tricrômico de Gomori. As lâminas de cada amostra analisadas em microscópio óptico em aumento de 40x (Olympus™ BX51) e digitalizadas no scanner Axio Scan.Z1 (Carl Zeiss - Oberkochen, Alemanha). Posteriormente, uma fibra central de cada amostra de nervo foi escolhida e a área em μ^2 foi calculada. Adicionalmente, dentro dessa mesma fibra foram contados os números de feixes (com e sem mielina), além da densidade feixes/ μ^2 também ter sido calculada. Ainda, essa mesma fibra central foi dividida em

quatro quadrantes, onde 15 feixes em cada quadrante foram escolhidos aleatoriamente para mensuração do diâmetro médio. Os resultados obtidos foram expressados de acordo com a área total analisada. Os valores registrados nos nervos pré descclularização foram utilizados para comparação com os diferentes métodos.

4.8 Análise de DNA Residual

Para análise do DNA residual as amostras de tecido foram liofilizadas, separadas em amostras de 5mg, foi utilizado o kit de purificação de DNA genômico PureLink® (Invitrogen, CA – USA), de acordo com as instruções do fabricante, digestão, purificação e filtragem. Uma vez purificadas, as alíquotas de DNA foram quantificadas por leitura de absorbância no espectrofotômetro NanoDrop (ND-1000 Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA) em um comprimento de onda na faixa de 260nm. A quantidade de DNA foi expressa em µg/mg de tecido seco de amostra e o protocolo foi realizado em triplicata técnica. Para confirmar os resultados, também foi realizada uma eletroforese com as amostras de DNA extraídas dos nervos descclularizados e não processados (controle). O gel foi composto por 2% de agarose (Sigma-Aldrich) em tampão TBE 1x (Tris 89 mM, ácido bórico mM e EDTA 50 mM) e para a solubilização completa foi aquecido em forno micro-ondas. O gel foi transferido para a cuba de eletroforese horizontal e após a solidificação, a cuba foi preenchida com tampão TBE 1x. Foi retirado o pente e foi aplicado em cada “*slot*” 5µL da amostra, previamente preparada com 1µL de tampão 3µL do marcador GelRed e 5µL da amostra. Para o controle em um “*slot*” foi utilizado o marcador molecular de 1kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). Foi aplicada uma amperagem constante de 100V por um período de 90 minutos. A visualização foi realizada em um transiluminador UV e o gel foi fotodocumentado.

4.9 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Para a observação da estrutura neural após a remoção das células do tecido, fragmentos de aproximadamente 2 mm³ dos nervos foram fixados em 2,0% de glutaraldeído e pós-fixados em tetróxido de ósmio 1%, ambos preparados em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2. Em seguida, as preparações foram desidratadas utilizando soluções crescentes de etanol e

submetidas ao método de secagem pelo ponto crítico, utilizando CO₂. Posteriormente, os tecidos foram montados em suportes metálicos, recobertos com ouro coloidal para serem analisados em microscópio eletrônico de varredura (JEOL JSM 6010PLUS-LA).

4.10 Análise Estatística

Para analisar os valores de DNA foi aplicado o teste t de Student para amostras não pareadas através do software GraphPad Prism 7 (GraphPad Prism Software Inc., San Diego, EUA). Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Todos os valores são apresentados como média \pm desvio padrão.

5. RESULTADOS

5.1 Avaliação Histológica e Imuno-Histoquímica

A análise histológica foi realizada para avaliar a remoção de material celular e nuclear e a preservação de componentes essenciais da MEC. Nas amostras de tecido não processado (controle) coradas em H&E em corte longitudinal foi possível observar a estrutura dos canais com diversos fascículos bem definidos, sendo visível o epineuro, o perineuro e o endoneuro, com a presença dos núcleos das células de Schwann (Fig 9). É mais evidente a presença do núcleo celular, dos canais e a presença de bainha de mielina. Nos cortes transversais foi possível avaliar a morfologia geral. Nos nervos não processados (controle), o padrão regular e cilíndrico do endoneuro e o padrão denso do epineuro puderam ser distinguidos.

Após a descelularização por ambos os métodos, a estrutura dos fascículos permaneceu inalterada, porém os núcleos celulares não são mais identificados (Fig 8 e 9). O arcabouço colágeno é mais visível na coloração Tricrômico de Gomori que tem maior especificidade ao tecido conjuntivo, apresentando a sua integridade após o processo de descelularização.

No corte transversal, é visualizado cada canal do endoneuro com resíduo de axônio e mielina no seu interior (Fig 8). A ausência de núcleos também é característica do tecido descelularizado. Não há alteração do arcabouço colágeno comparativamente ao tecido não processado (controle).

Os núcleos das células de Schwann também são indetectáveis na utilização da microscopia de fluorescência pela marcação com DAPI (Fig 10), quanto na utilização da imuno-histoquímica com S100 quando comparado tecido não processado (controle) e descelularizado (Fig 8 e 9).

Foi observada a diminuição da bainha de mielina após o processamento M1 e M2. Nos cortes transversais do tecido fresco observamos a bainha de mielina com axônio centralizado. No tecido processado apenas resíduos são identificados dentro de cada endoneuro. Na utilização de coloração específica para bainha de mielina (Luxol Fast Blue) é significativo a diminuição da concentração de mielina haja vista diminuição da intensidade do corante no tecido descelularizado (Fig 8 e 9).

Na avaliação histológica os tecidos descelularizados por M1 e M2 mostraram-se acelulares nas colorações de H&E e DAPI (Fig 8 e 9), em comparação ao tecido não processado (controle), o qual exibiu marcação nuclear positiva em toda a sua extensão. A avaliação da estrutura do arcabouço de colágeno se manteve inalterada após o processo de descelularização, preservando epineuro, perineuro e endoneuro.

A análise da presença de mielina após os processos de descelularização foi realizada em cortes transversais através da coloração Luxol Fast Blue que revelou redução significativa nos tecidos descelularizados pelos métodos 1 e 2.

A coloração imuno-histoquímica para S100, que é um marcador para células de Schwann, também confirmou a ausência de células nos tecidos descelularizados pelos métodos 1 e 2.

Para avaliar melhor o conteúdo celular após a descelularização, foi realizada a coloração com DAPI e os resultados foram semelhantes aos obtidos com coloração H&E (Fig 10).

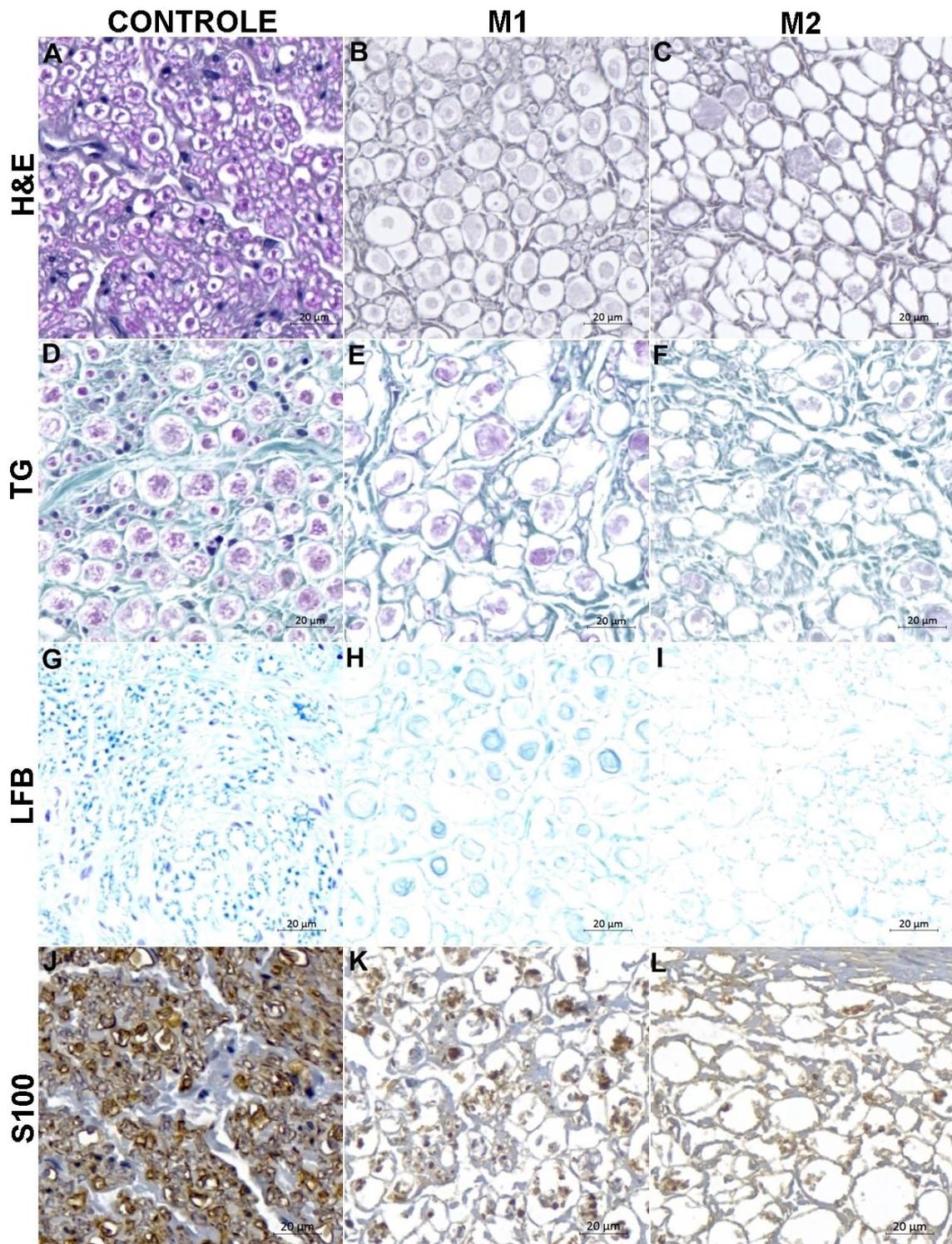


Figura 8. Análise histológica e imuno-histoquímica comparativa de cortes transversais. Aumento de 40x. Marcação nuclear através da coloração de Hematoxilina Eosina mostra a ausência de núcleos celulares no tecido descelularizado pelo método M1 (B) e pelo método M2 (C) em comparação ao nervo não processado (controle) (A). Marcação do colágeno através da coloração de Tricrômico de Gomori mostra a manutenção da matriz extracelular no tecido descelularizado pelo método M1 (E) e pelo método M2 (F) em comparação ao nervo não processado (controle) (D). Marcação da bainha de mielina através da coloração de Luxol Fast Blue mostra a redução da bainha de mielina no tecido descelularizado pelo método M1 (H) e pelo método M2 (I) em comparação ao nervo não processado (controle) (G). Marcação das células de Schwann através da imuno-histoquímica para S100 mostra a redução celular no tecido descelularizado pelo método M1 (K) e pelo método M2 (L) em comparação ao nervo não processado (controle) (J). Fonte: LEID – PUCPR, 2019.

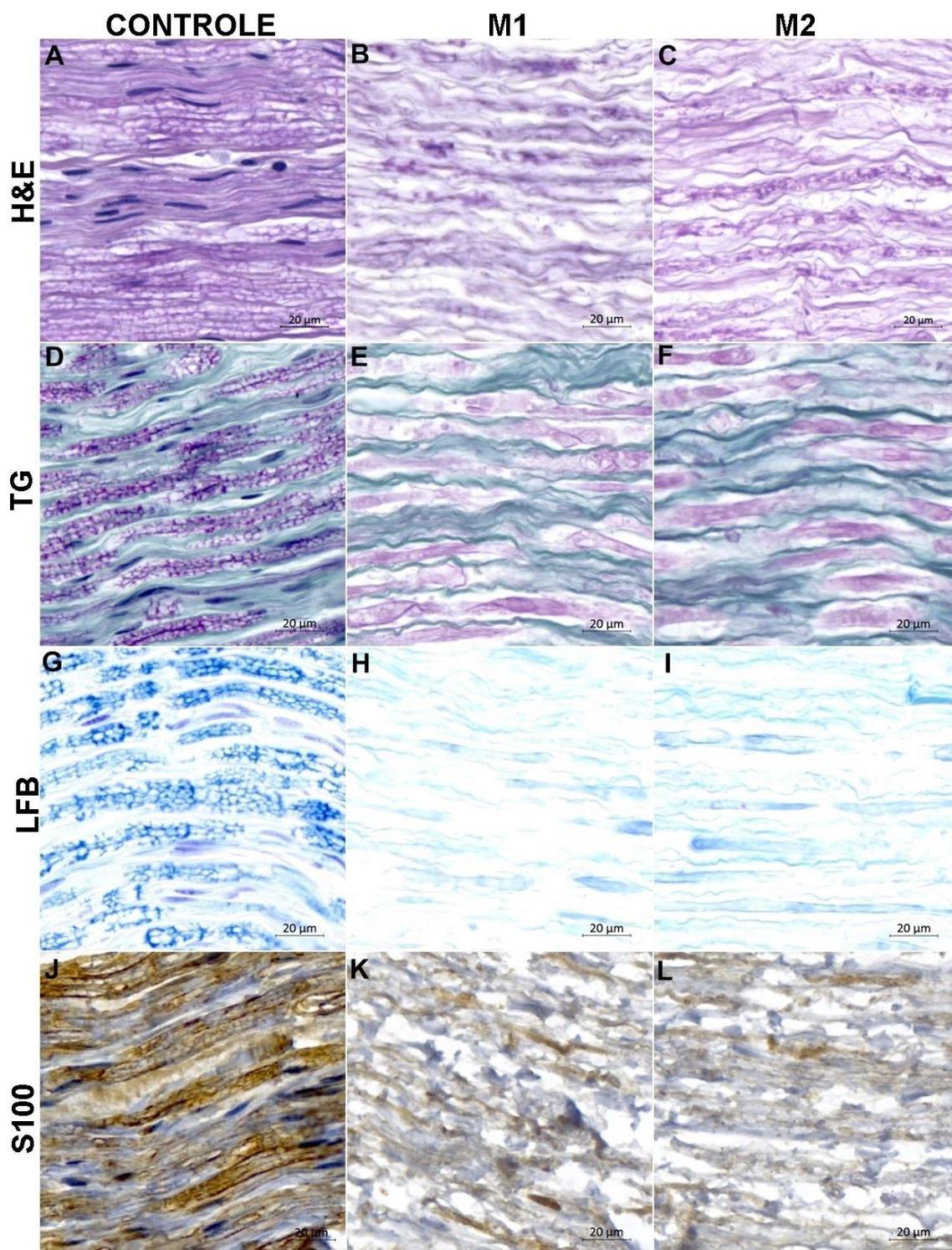


Figura 9. Análise histológica e imuno-histoquímica comparativa de cortes longitudinais. Aumento de 40x. Marcação nuclear através da coloração de Hematoxilina Eosina mostra a ausência de núcleos celulares no tecido descelularizado pelo método M1 (B) e pelo método M2 (C) em comparação ao nervo não processado (controle) (A). Marcação do colágeno através da coloração de Tricrômico de Gomori mostra a manutenção da matriz extracelular no tecido descelularizado pelo método M1 (E) e pelo método M2 (F) em comparação ao nervo não processado (controle) (D). Marcação da bainha de mielina através da coloração de Luxol Fast Blue mostra a redução da bainha de mielina no tecido descelularizado pelo método M1 (H) e pelo método M2 (I) em comparação ao nervo não processado (controle) (G). Marcação das células de Schwann através da imuno-histoquímica para S100 mostra a redução celular no tecido descelularizado pelo método M1 (K) e pelo método M2 (L) em comparação ao nervo não processado (controle) (J). Fonte: LEID – PUCPR, 2019.

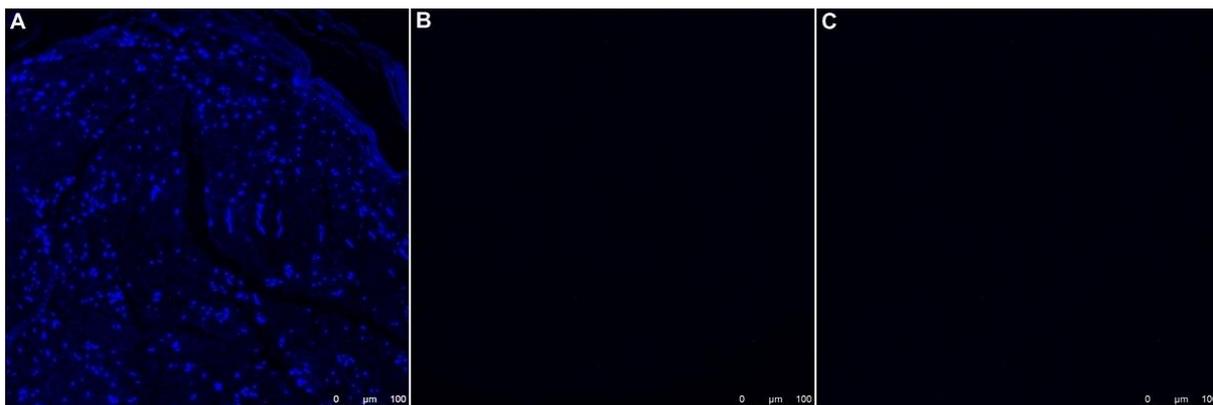


Figura 10. Marcação nuclear de seções transversais através da coloração de DAPI. Aumento de 40x. Tecido não processado (controle) exibiu marcação nuclear positiva em toda a sua extensão (A). Os tecidos descelularizados pelo método 1 (B) e pelo método 2 (C) apresentaram ausência de núcleos celulares. Fonte: o autor, 2019.

5.2 Histomorfometria

A análise histomorfométrica avaliamos a densidade do número de feixes com mielina por área demarcada (Fig 11). A densidade encontrada no nervo fresco foi de 0,004941 fibras/ μm^2 . Comparativamente com nervo descelularizado houve uma diminuição da densidade. No método 1 a densidade observada foi 0,003520 fibras/ μm^2 e método 2 com densidade de 0,003734 fibras/ μm^2 .

Os dados foram analisados por teste t de *Student* não demonstrou diferença estatística entre o nervo fresco e o nervo descelularizado nos métodos 1 e 2 com $p=0,094$ (Fig 12).

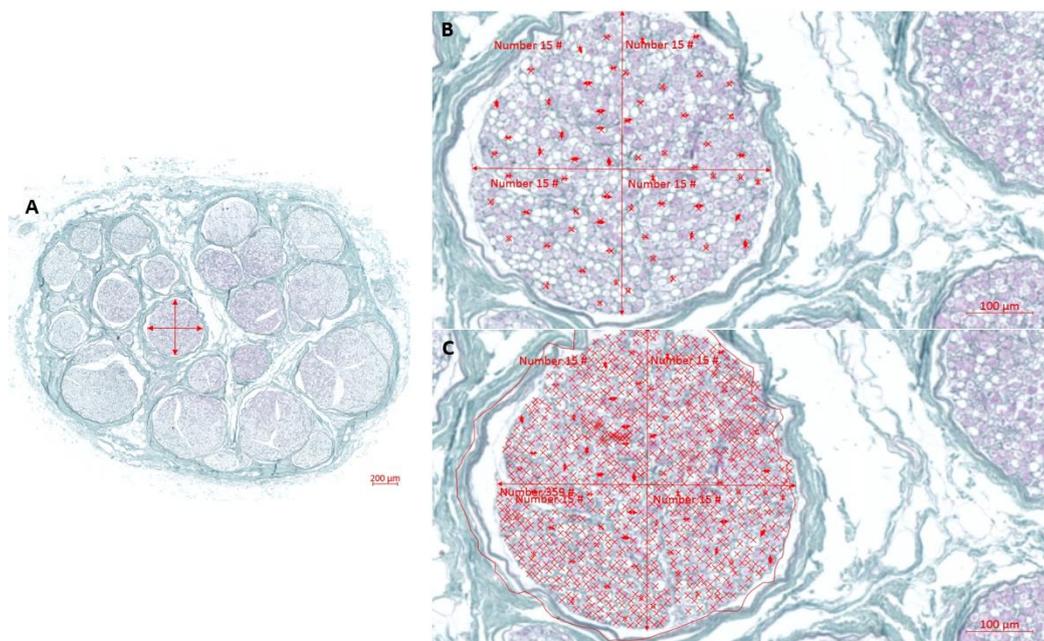


Figura 11. Esquema demonstrando a mensuração dos parâmetros dos nervos. A) Escolha da fibra central e definição dos quatro quadrantes. Corte transversal corado por Tricrômico de Gomori. B) Mensuração do diâmetro de 15 feixes aleatórios por quadrante. C) Mensuração da área total da fibra central, contagem do número total de feixes. Fonte: LEID – PUCPR, 2019.

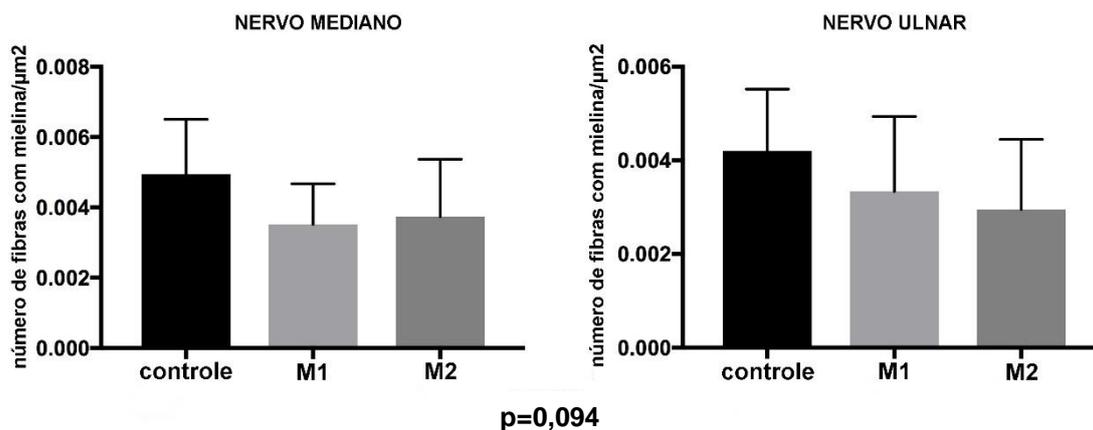


Figura 12. Análise da densidade de feixe com mielina por μm^2 para nervo mediano e ulnar.

5.3 Análise molecular - Quantificação de DNA

O conteúdo de DNA das amostras de nervo mediano descclularizado pelo método 1 foi de $451,02 \pm 256,54$ ng/mg, pelo método 2 foi de $302,23 \pm 190,40$ ng/mg e o controle foi de $1072,72 \pm 355,75$ ng/mg. O conteúdo de DNA das amostras de nervo ulnar descclularizado pelo método 1 foi de $389,17 \pm 170,70$ ng/mg, pelo método 2 foi de $274,51 \pm 174,84$ ng/mg e o controle foi de $873,43 \pm 488,08$ ng/mg.

Os dados foram analisados por teste t de Student que revelou uma significativa redução na quantidade de DNA para os nervos medianos descclularizados pelo método 1 ($p = 0,0047$) (Fig. 13 A). Em relação ao método 2, os nervos medianos e ulnares descclularizados apresentaram uma significativa redução na quantidade de DNA ($p = 0,0019$) e ($p = 0,007$), respectivamente (Fig. 13 A e B). Além disso, uma eletroforese em gel de agarose foi feita para confirmar a presença de DNA nas amostras (Fig 13 C). Assim, foi possível observar a presença de bandas íntegras de DNA no nervo controle (fresco) e, em todas as amostras de nervos descclularizados pelo método 1 e 2, foi possível observar um rastro de DNA.

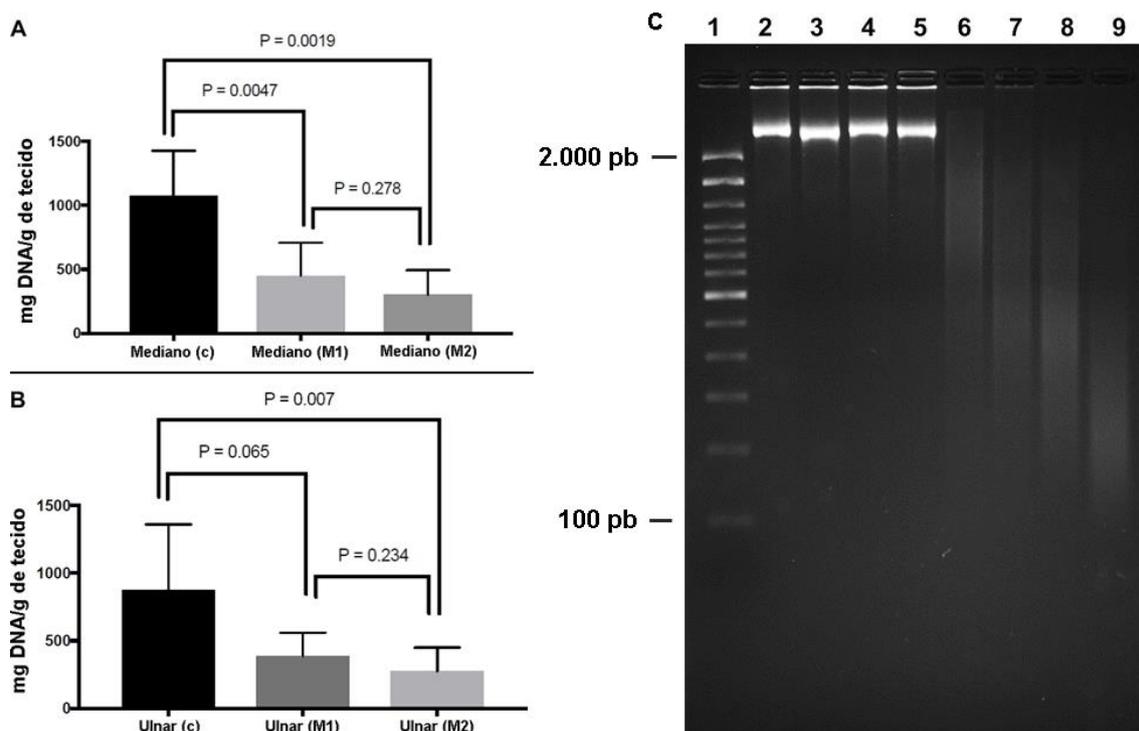


Figura 13. Quantificação e observação de DNA. Quantificação do conteúdo de DNA genômico para os nervos medianos (A) e ulnares (B) descelularizados pelos métodos 1 e 2 em comparação ao controle. O DNA total é apresentado pela média das amostras em $\text{ng/mg} \pm$ desvio padrão. Os valores considerados significativos foram aqueles com $p \leq 0,05$. Eletroforese de DNA extraído de amostras de tecido descelularizado em comparação ao tecido não processado (controle) (C).

5.4 Microscopia Eletrônica de Varredura

A microscopia eletrônica de varredura possibilitou a visualização mais detalhada da superfície dos nervos e o monitoramento da conservação tecidual após descelularização. Foi possível visualizar o afrouxamento das fibras após a descelularização. Os nervos tratados pelos métodos 1 e 2 apresentaram a ultraestrutura bem preservadas e organizadas. (Fig 14)

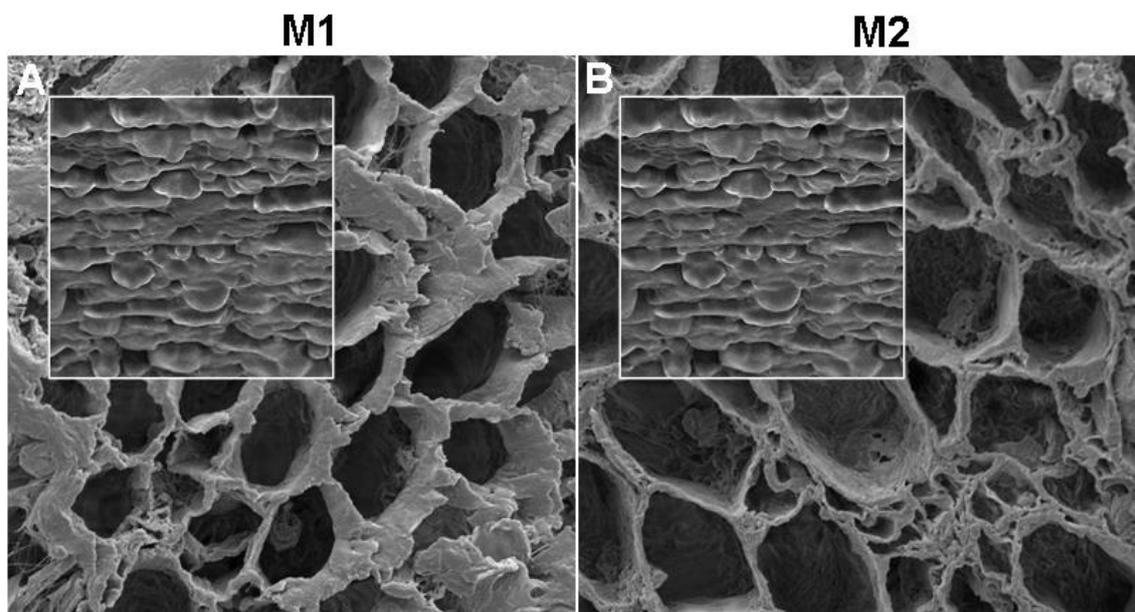


Figura 14. Microscopia eletrônica de varredura para o nervo não processado (controle) e decelularizado pelo método M1 e pelo método M2. Presença de tubos endoneurais vazios e bem preservados no tecido decelularizado pelo método M1 (A) e pelo método M2 (B) em comparação ao nervo não processado (controle) (área quadrada interna). Fonte: LEID – PUCPR, 2019.

6. DISCUSSÃO

No presente estudo avaliamos a eficácia de dois métodos de descclularização na remoção de componentes celulares e na manutenção da arquitetura da matriz extracelular de nervo periférico humano. Os resultados demonstraram que a descclularização com a sonicação aumentou o potencial de remoção de resíduos de células e da bainha de mielina em relação ao processo sem sonicação. Utilizamos uma metodologia simples de baixo custo compatível com a realidade existente no nosso meio.

A avaliação em microscopia ótica com coloração de H&E demonstrou a remoção de núcleos em cortes transversais e seções longitudinais do nervo descclularizado em ambos os métodos. Não foi observada diferença na avaliação por microscopia ótica entre os métodos M1 e M2. Esses resultados são semelhantes aos relatados na literatura sobre a descclularização de nervos. No estudo de Sondell *et al.* (1998), em que os nervos foram descclularizados com uma combinação de Triton X-100 e desoxicolato de sódio, não foram detectados núcleos de células visíveis na histologia. Em contraste, os nervos do grupo estudado por Hudson *et al.* (2004) claramente não estavam livres de células após a descclularização com SB-10 e SB-16. Outra metodologia associando a degradação química e sonicação descrita por Boriani *et al.* (2017) apresentou resultado equivalente com total ausência de núcleos na avaliação microscópica. Philips *et al.* (2018) compararam um método de descclularização com dois outros processos baseados em detergentes, descritos anteriormente por Sondell *et al.* (1998) e Hudson *et al.* (2004) com uma combinação de Triton X-100, DNase, RNase e tripsina, o que resultou na remoção bem-sucedida do material nuclear.

Os resultados da microscopia ótica com coloração H&E foram confirmados pela falta de material nuclear visível nas seções de tecido coradas com DAPI. No entanto, apesar da maior especificidade em comparação com a coloração H&E, a coloração com DAPI é pouco usada pelos pesquisadores para confirmar a ausência de material celular em nervos descclularizados (Boriani *et al.*, 2017; Philips *et al.*, 2018).

Sendo as células de Schwann as mais abundantes em nervos periféricos, representando cerca de 90% das células em cortes histológicos, buscamos identificá-las imuno-histoquimicamente. Essas células expressam moléculas como vimentina, CD56, CD57, CD146, NCAM, GFAP, O4 e p75, mas são mais comumente identificados por S-100 (Jessen e Mirsky, 2002; Kingham *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2015). Corroborando com os dados obtidos por H&E e DAPI, foi possível verificar a remoção da maioria das células, pois os tecidos não apresentaram marcação celular para S100 após a descclularização pelos dois métodos.

A análise quantitativa do DNA revelou uma redução de 56,59% nas amostras tratadas pelo M1 e de 70,19% nas amostras tratadas pelo M2. Na comparação entre os métodos, o método M2 com sonicação demonstrou pequena vantagem na redução do DNA embora sem significância estatística. No entanto, nossos resultados de quantificação de DNA estavam acima dos 50ng/mg estipulados por Crapo *et al.* (2011). Os valores obtidos pelas duas metodologias estão de acordo com os relatados por Philips *et al.* (2018), onde o conteúdo de DNA de nervos de rato Winstar tratados com Triton X-100 e desoxicolato de sódio diminuiu drasticamente de 852,24±302,28 ng/mg para 195,85±53,34 ng/mg. No entanto, estes mesmos autores obtiveram um resultado mais efetivo ao utilizar Triton X-100 associado as enzimas DNase, RNase e tripsina, resultando em 35,15±7,11 ng/mg de DNA.

O DNA isolado foi avaliado quanto ao tamanho do fragmento, utilizando eletroforese em gel de agarose. Nas amostras preparadas utilizando os protocolos M1 ou M2, todo o DNA residual tinha menos de 100 pb. Gilbert *et al.* (2009) avaliaram os resíduos de DNA em materiais de arcabouço da MEC comercialmente disponíveis e encontraram pequenos fragmentos com menos de 300 pb e, portanto, é improvável que desempenhem um papel significativo na transmissão da doença ou em uma resposta de remodelação tecidual adversa.

Os resultados demonstraram que os ciclos de sonicação aumenta o potencial de remoção de resíduos de DNA, embora o conteúdo de DNA não seja diferente estatisticamente entre os dois processos (com e sem sonicação). Syazwani *et al.* (2015) relataram que a descclularização da aorta porcina com ultrassom em uma frequência de 170 kHz em dodecil sulfato de sódio a 2% reduziu o tempo de tratamento, causou menos ruptura mecânica à matriz

extracelular e proporcionou equilíbrio entre a preservação da integridade da MEC e a eficiência da remoção do DNA. No entanto, segundo Boriani *et al.* (2017) ciclos mais curtos de energia de ultrassom não foram capazes de descelularizar o tecido, enquanto ciclos mais longos de energia de ultrassom tiveram efeitos prejudiciais na integridade da estrutura nervosa. Uma das possibilidades para ajudar a remover o DNA residual é incrementar a concentração de SDS. Em um estudo realizado por Azhim *et al.* (2014) o incremento das concentrações de SDS, como em 2% em comparação com 0,1%, levou a melhora da penetração do detergente SDS de lavagem, o que leva à descelularização mais eficiente.

Philips *et al.* (2018) propuseram uma extensão dos critérios para a avaliação de aloenxertos de nervos periféricos descelularizados. Além dos critérios já estabelecidos por Crapo *et al.* (2011), foi proposto a análise de remanescentes citoplasmáticos que também podem contribuir significativamente para reações adversas do hospedeiro. Para os restos citoplasmáticos, o nervo periférico descelularizado deve ser (1) negativo para imunocoloração de S-100 e / ou vimentina, que reconhece células de Schwann e fibroblastos, (2) negativo para proteínas axonais estruturais como neurofilamento e / ou β -III tubulina e (3) negativo para colorações histoquímicas ou imuno-histoquímicas de mielina tais como LFB ou proteína básica de mielina.

Londono *et al.* (2017) não consideram a quantificação de DNA como melhor indicador de descelularização tecidual. Diferentes componentes celulares são capazes de causar reações imunes adversas que podem levar a eventos negativos de remodelação tecidual. Na literatura encontramos diversos protocolos de avaliação do nervo descelularizado, mas ainda sem um consenso do protocolo padrão para análise do tecido nervoso. (Philips *et al.*, 2018).

A perda da integridade estrutural dos nervos ou a interrupção entre os componentes, resulta na perda sua flexibilidade e rigidez. Avaliamos os efeitos da descelularização na MEC por análise histológica com coloração TG e MEV. Análises histológica e de MEV indicaram que a ausência de ruptura das fibras de colágeno e da MEC dos nervos foi caracterizada pela presença de tubos endoneurais vazios e bem preservados. Sridharan *et al.* (2014) relataram uma redução de 50% no conteúdo de colágeno no nervo descelularizado em relação

ao não-descelularizado, porém concluíram que a análise histologia não permite avaliar a aparência, densidade e continuidade de fibras nervosas de colágeno.

As análises histomorfométricas ou quantitativas em cortes histológicos do nervo também permitem avaliar a integridade estrutural do nervo. Transforma a avaliação clássica descritiva da histologia em uma informação numérica de possível análise estatística (Raimondo *et al.*, 2009). Com relação histomorfometria, não se observou diferença estatística entre o nervo fresco e o descelularizado, não havendo, também, diferença estatística entre métodos M1 e M2.

Comparativamente os métodos M1 e M2 foram igualmente eficazes na descelularização do nervo e manutenção da estrutura neural. Identificamos uma melhor eficiência de M2 sobre M1, entretanto sem significância estatística.

Foi avaliado, em particular, o efeito do processamento apenas *in vitro*, necessitando testar o aloenxerto *in vivo* para avaliar o crescimento neural, a eficácia do aloenxerto na recuperação funcional do órgão efector e a ausência de resposta imunogênica ou citotoxicidade.

Reconhecemos como limitação do nosso estudo, a avaliação de nervo com comprimento e espessura semelhantes, sendo necessário avaliar diferentes tamanhos a fim de possibilitar maior variedade de enxerto. É necessário, além disso, avaliar as propriedades biomecânicas, residuais e biocompatibilidade do nervo descelularizado.

Os estudos sobre aloenxerto nervoso continuam em evidências sem um consenso sobre a melhor metodologia. Houve uma significativa diminuição dos resíduos de DNA com a manutenção da arquitetura dos canais intraneurais. Conseguimos resultados, em nervo humano, semelhantes aos que encontramos na literatura obtidos com nervo em modelo experimental em animais.

7. CONCLUSÃO

Em conjunto, os resultados obtidos neste trabalho sugerem que ambos os métodos de descelularização foram eficazes na remoção de componentes celulares e na manutenção da arquitetura natural do nervo.

Concluimos que não houve diferença estatística entre os parâmetros analisados para ambos os métodos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Allodi I, Udina E, Navarro X. Specificity of peripheral nerve regeneration: interactions at the axon level. *Prog. Neurobiol.* (2012). 98, 16–37.

Azhim A, Syazwani N, Morimoto Y, Furukawa KS, Ushida T. The use of sonication treatment to decellularize aortic tissues for preparation of bioscaffolds. *J Biomater Appl.* (2014) Jul; 29(1): 130-41.

Beris A, Gkiatas I, gelalis I, Papadopoulos D, Kostas-Agnantis I. Current concepts in peripheral nerve Surgery. *Eur J Orthop Sur Traumat* (2019) 29: 263-269.

Boriani F, Fazio N, Fotia C, Savarino L, Nicoli Aldini N, Martini L, Zini N, Bernardini M, Baldini N. A novel technique for decellularization of allogenic nerves and *in vivo* study of their use for peripheral nerve reconstruction. *J Biomed Mater Res* (2017) Aug, 105(8): 2228-40.

Boyer R B, Sexton K W, Rodriguez-Feo C L, Nookala R, Pollins A C, Cardwell N L, Tisdale K Y, Nanney L B, Shack R B and Thayer W P. Adjuvant neurotrophic factors in peripheral nerve repair with chondroitin sulfate proteoglycan-reduced acellular nerve allografts *J. Surg. Res.* (2015) 193: 969–77.

Campbell WW. Evaluation and management of peripheral nerve injury. *Clin Neurophysiol* (2008); 119(9):1951-65.

Carriel, V., Alaminos, M., Garzon, I., Campos, A. & Cornelissen, M. Tissue engineering of the peripheral nervous system. *Expert Rev Neurother* (2014) 14: 301-318.

Carriel V, Garzon I, Alaminos M, Campos A. Evaluation of myelin sheath and collagen reorganization pattern in a model of peripheral nerve regeneration using an integrated histochemical approach. *Histochem Cell Biol.* (2011a); 136: 709–717.

Chang RB, Strohlic DE, Williams EK, Umans BD, Liberles SD. Vagal sensory neuron subtypes that differentially control breathing. *Cell.* (2015) Apr 23; 161(3): 622-633.

Chernousov, MA, Yu WM, Chen ZL, Carey DJ, Strickland S. Regulation of Schwann cell function by the extracellular matrix. *Glia* (2008). 56, 1498–1507.

Crapo PM, Gilbert TW, Badylak SF. An overview of tissue and whole organ decellularization process. *Biomaterials* (2001) April, 32(12): 3233-43.

Daly W, Yao L, Zeugolis D, Windebank A and Pandit A. A biomaterials approach to peripheral nerve regeneration: bridging the peripheral nerve gap and enhancing functional recovery. *J R Soc Interface.* (2012) Feb, 7, 9 (67): 202-21.

Deumens R, Bozkurt A, Meek MF, Marcus MA, Joosten EA, Weis J, Brook GA. Repairing injured peripheral nerves: bridging the gap. *Prog. Neurobiol.* (2010). 92, 245–276.

Dvali L, Mackinnon SE. The role of microsurgery in nerve repair and nerve grafting. *Hand Clin* (2007) 23: 73-81.

Evans P J, Mackinnon S E, Levi A D, Wade J A, Hunter D A, Nakao Y and Midha R. Cold preserved nerve allografts: changes in basement membrane, viability, immunogenicity, and regeneration. *Muscle Nerve* (1988) 21: 1507–22.

Gonzalez-Perez, F., Udina, E. & Navarro, X. Extracellular matrix components in peripheral nerve regeneration. *Int Rev Neurobiol* (2013) 108: 257-275.

Grant GA, Goodkin R, Kliot M. Evaluation and surgical management of peripheral nerve problems. *Neurosurg.* (1999) Apr; 44(4):825-39.

Griffin MF, Malahias M, Hindocha S, Khan WS. Peripheral nerve injury: Principles for repair and regeneration. *The Open Orthop J* (2014) 8, Suppl 1: M10: 199-203.

Grinsell D, Keating CP. Peripheral nerve reconstruction after injury: A review of clinical and experimental therapies. *BioMed Res Int Vol* (2014), Article ID698256, 13 pages.

Gulati AK, Evaluation of acellular and cellular nerve grafts in repair of rat peripheral nerve. *J Neurosurg* (1988), Jan, 68(1): 117-23.

Houschyar KS, Momeni A, Pyles MN, Cha JY, Maan ZN, Duscher D, Jew OS, Simers F, Schoonhoven J van. The role of current techniques and concepts in peripheral nerve repair. *Plast Surg Intl, Vol* (2016), Article ID 4175293, 8 pages.

Hudson TW, Zawko S, Deister C, Lundy S, Hu CY, Lee K, Schmidt CE. Optimized acellular nerve graft is immunologically tolerated and supports regeneration. *Tissue Eng.* (2004) Nov-Dec;10 (11-12):1641-51.

Hudson TW, Liu SY, Schmidt CE. Engineering an improved acellular nerve graft via optimized chemical processing. *Tissue Eng.* (2004) 10: 1346–58.

Jessen K R and Mirsky R. Signals that determine Schwann cell identity *J. Anat.* (2002) 200: 367–76.

Jesuraj NJ, Santosa KB, Macewan MR, Moore AM, Kasukurthi R, Ray WZ, Flagg ER, Hunter DA, Borschel GH, Johnson PJ, Mackinnon SE, Sakiyama-Elbert SE. Schwann cells seeded in acellular nerve grafts improve functional recovery. *Muscle Nerve* (2014) 49: 267–76.

Kaizawa Y, Kakinoki R, Ikeguchi R, Ohta S, Nogushi H, Oda H, Yurie H, Matsuda S. A nerve conduit containing a vascular bundle and implanted with bone marrow stromal cells and decellularized allogenic nerve matrix. *Cell Transplant* (2017) Feb 16; 26(2): 215-228.

Kingham PJ, Kalbermatten DF, Mahay D, Armstrong S J, Wiberg M and Terenghi G. Adipose-derived stem cells differentiate into a Schwann cell phenotype and promote neurite outgrowth in vitro (2017) *Exp. Neurol.* 207: 267–74.

Krekoski C A, Neubauer D, Graham J B and Muir D. Metalloproteinase-dependent predegeneration in vitro enhances axonal regeneration within acellular peripheral nerve grafts *J. Neurosci* (2002) 22: 10408–15.

Krekoski CA, Neubauer D, Zuo J, Muir D. Axonal regeneration into acellular and cellular nerve grafts is enhanced by degradation of chondroitin sulfate proteoglycan. *J Neurosci* (2001); 21: 6206-13.

Lin MY, Manzano G, Gupta R. Nerve allograft and conduits in peripheral nerve repair. *Hand Clin* 29 (2013) :331–348.

Liu Z, Jin Y Q, Chen L, Wang Y, Yang X, Cheng J, Wu W, Qi Z and Shen Z. Specific marker expression and cell state of Schwann cells during culture in vitro. *PLoS One* (2015) Apr 10; 10(4) e0123278.

Londino R, Dziki JL, Haljasmaa E, Turner NJ, Leifer CA, Badyrak SF. The effect of cell debris within biologic scaffolds upon the macrophage response. *J Biomed Mater Res A*. (2017) Aug; 105(8): 2109-2118.

Matsuyama T, Mackay M, Midha R. Peripheral nerve repair and grafting techniques: A review. *Neurol Med Chir (Tokyo)* (2000). 40: 187-99.

Menorca RM, Fussell TS, Elfar JC. Nerve physiology: mechanism of injury and recovery. *Hand Clin* (2013) Aug; 29(3): 317-30

Neubauer D, Graham J B and Muir D. Chondroitinase treatment increases the effective length of acellular nerve grafts *Exp. Neurol.* (2007) 207: 163–70.

Philips C, Campos F, Roosens A, Sánchez-Quevedo MDC, Declercq H, Carriel V. Qualitative and Quantitative Evaluation of a Novel Detergent-Based Method for Decellularization of Peripheral Nerves. *Ann Biomed Eng.* (2018) Nov; 46(11): 1921-1937.

Philips C, Cornelissen M and Carriel V. Evaluation methods as quality control in the generation of decellularized peripheral nerve allografts. *J. Neural Eng.* (2018) Apr; 15(2).

Porzionato A, Stocco E, Barbon S, Grandi F, Macchi V, De Caro R. Tissue-engineered grafts from human decellularized extracellular matrices: A systematic review and future perspectives. *Int J Mol Sci.* (2018) Dec 18;19(12).

Raimondo S, Fornaro M, Di Scipio F, Ronchi G, Giacobini-Robecchi MG, Geuna S. Chapter 5: Methods and protocols in peripheral nerve regeneration experimental research: part II-morphological techniques. *Int Rev Neurobiol.* (2009); 87: 81–103.

Ray WZ, Kale SS, Kasukurthi R, Papp EM, Johnson PJ, Santosa KB, Yan Y, Hunter DA, Mackinnon SE, Tung TH. Effect of cold nerve allograft preservation on antigen presentation and rejection. *J Neurosurg* 2011. Jan; 114(1): 256-62.

Ray WZ, Mackinnon SE. Management of nerve gaps: Autografts, allografts, nerve transfers and end-to-side neurotization. *Experimental Neurol* (2010). 223: 77-85.

Robinson LR. Traumatic injury to peripheral nerves. *Muscle nerve.* 2000; 23(6):863-73.

Safa B, Buncke G. Autograft Substitutes conduits and processed nerve allografts. *Hand Clin* 32 (2016): 127-140.

Seddon H J. A Classification of Nerve Injuries. *Br Med J* (1942).

Seddon HJ. *Surgical disorders of the peripheral nerves*, 2nd ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, (1975).

Sondell M, Lundborg G, Kanje M. Regeneration of the rat sciatic nerve into allografts made acellular through chemical extraction. *Brain Res* (1998). Jun 8;795 (1-2): 44-54.

Sridharan R, Reilly RB, Buckley CT. Decellularized grafts with axially aligned channels for peripheral nerve regeneration *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* (2015) 41: 124–35.

Stanec S, Tonkovic I, Stanec Z, Tonkovic D, Dzepina I. Treatment of upper limb nerve war injuries associated with vascular trauma. *Injury*. 1997;28 (7):463-8.

Sunderland S. A classification of peripheral nerve injuries producing loss of function. *Brain* (1951) Dec, 74(4): 491-516.

Szynkaruk, M., Kemp, S.W., Wood, M.D., Gordon, T. & Borschel, G.H. Experimental and clinical evidence for use of decellularized nerve allografts in peripheral nerve gap reconstruction. *Tissue Eng Part B Rev* (2013)19: 83-96.

Topp KS and Boyd BS. Structure and biomechanics of peripheral nerves: nerve responses to physical stresses and implications for physical therapist practice *Phys. Ther.* (2006) 86: 92–109.

Wang Q, Zhang C, Zhang L, Guo W, Feng G, Zhou S, Zhang Y, Tian T, Li Z and Huang F. The preparation and comparison of decellularized nerve scaffold of tissue engineering *J. Biomed. Mater. Res.* (2014) A 102: 4301–8.

Whitlock E.L., Tuffaha S.H., Luciano J.P., Yan Y., Hunter D.A., Magill C.K., Moore A.M., Tong A.Y., Mackinnon S.E., Borschel G.H. Processed allografts and type I collagen conduits for repair of peripheral nerve gaps. *Muscle Nerve*. (2009);39: 787–799.

Zilic L, Wilshaw SP, Haycock JW. Decellularisation and histological characterisation of porcine peripheral nerves *Biotechnol Bioeng.* (2016) Sept 113 (9): 2041–53.

9. ANEXOS

9.1. TCLE

<p style="text-align: center;">TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA RESPONSÁVEIS POR PARTICIPANTES DOADORES DE TECIDOS NERVOSOS EM MORTE ENCEFÁLICA</p>

Meu familiar ou pessoa por quem sou responsável está sendo convidada a participar do estudo **DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO PARA DECELULARIZAÇÃO DE NERVO PARA BANCO DE TECIDOS** e que tem como objetivo desenvolver um método de descelularizar o nervo doado para banco de tecidos. Acreditamos que ela seja importante porque poderemos desenvolver uma forma de esterilizar nervo doado e assim teremos mais nervos disponíveis para oferecer para as pessoas com doenças ou lesão de nervo periférico.

PARTICIPAÇÃO NO ESTUDO

A participação da pessoa por quem sou responsável será de permitir que um nervo seja doado para pesquisa. Esse nervo será retirado após a autorização da doação dos tecidos para transplante e poderá ser usado para pesquisa caso não possa ser doado para outra pessoa.

RISCOS E BENEFÍCIOS

Através deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido você está sendo alertado de que, da pesquisa a se realizar, seu curatelado ou assistido, não poderá esperar nenhum benefício, porém estará contribuindo para o desenvolvimento de um estudo que permitirá um aumento na disponibilidade de nervos para pacientes com doenças ou lesão de nervo periférico.

Você está sendo alertado também de que, da pesquisa a se realizar, seu curatelado ou assistido, não corre nenhum risco ou desconforto, pois uma vez que o estudo será realizado com tecido nervoso obtido durante o procedimento de doação dos tecidos, sem exposição a nenhum tipo de tratamento ou procedimento adicional, coleta de exames ou exame clínico que possa trazer alguma injúria física, o único risco a que será exposto o seu curatelado ou assistido nesta pesquisa é a possibilidade da divulgação indevida dos seus dados. No entanto, os pesquisadores comprometem-se a seguir os critérios da ética, mantendo sigilo dos dados coletados durante todas as etapas do processo.

SIGILO E PRIVACIDADE

Estou ciente de que minha privacidade e do meu familiar ou do participante que sou responsável, será respeitada, ou seja, meu e do participante que sou responsável nome ou qualquer outro dado ou elemento que possa, de qualquer forma, me identificar ou a de quem eu sou responsável, será mantido em sigilo. Os pesquisadores se responsabilizam pela guarda e confidencialidade dos dados, bem como a não exposição dos dados de pesquisa.

AUTONOMIA

É assegurada a assistência durante toda pesquisa, bem como me é garantido o livre acesso a todas as informações e esclarecimentos adicionais sobre o estudo e suas consequências, enfim, tudo o que eu queira saber antes, durante e depois da minha participação. Também fui informado de que posso recusar que o meu familiar ou a pessoa a qual me responsabilizo participe do estudo, ou retirar meu consentimento a qualquer momento, sem precisar justificar, e de, por desejar sair da pesquisa, o meu familiar ou a pessoa que me responsabilizo não sofrerá qualquer prejuízo à assistência que está recebendo.

RESSARCIMENTO E INDENIZAÇÃO

Não haverá qualquer tipo de despesa decorrente da participação na pesquisa, pois o osso doado será retirado durante uma cirurgia para retirada dos tecidos doados.

De igual maneira, caso ocorra algum dano decorrente da participação de seu curatelado ou assistido no estudo, o seu curatelado ou assistido será devidamente indenizado, conforme determina a lei.

CONTATO

Os pesquisadores envolvidos com o referido projeto são FELIPE TUON e CARLOS MOTOOKA e com eles poderei manter contato pelos telefones (41) 988521893 e (43) 996231145.

O Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP) é composto por um grupo de pessoas que estão trabalhando para garantir que seus direitos como participante de pesquisa sejam respeitados. Ele tem a obrigação de avaliar se a pesquisa foi planejada e se está sendo executada de forma ética. Se você achar que a pesquisa não está sendo realizada da forma como você imaginou ou que está sendo prejudicado de alguma forma, você pode entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da PUCPR (CEP) pelo telefone (41) 3271-2292 entre segunda e sexta-feira das 08h00 às 17h30 ou pelo e-mail nep@pucpr.br.

DECLARAÇÃO

Declaro que li e entendi todas as informações presentes neste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e tive a oportunidade de discutir as informações deste termo. Todas as minhas perguntas foram respondidas e eu estou satisfeito com as respostas. Entendo que receberei uma via assinada e datada deste documento e que outra via assinada e datada será arquivada nos pelo pesquisador responsável do estudo.

Enfim, tendo sido orientado quanto ao teor de todo o aqui mencionado e compreendido a natureza e o objetivo do já referido estudo, manifesto meu livre consentimento na participação do meu curatelado ou assistido _____, estando totalmente ciente de que não há nenhum valor econômico, a receber ou a pagar, por sua participação.

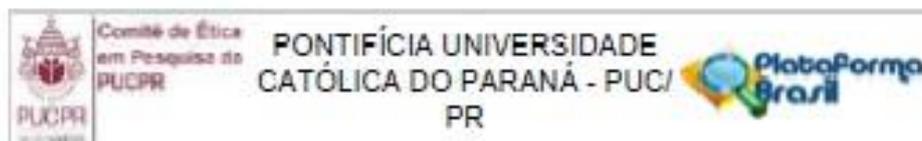
Dados do responsável pelo participante da pesquisa	
Nome:	
Telefone:	
E-mail:	

Local, _____ de _____ de _____.

Assinatura do responsável
pelo participante da pesquisa

Assinatura do Pesquisador

9.2. Parecer do Comitê de Ética e Pesquisa



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Desenvolvimento de um enxerto de nervo periférico humano descelularizado para reconstrução de nervo lesionados.

Pesquisador: FELIPE FRANCISCO BONDAN TUON

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 80162617.7.0000.0020

Instituição Proponente: Pontifícia Universidade Católica do Paraná - PUCPR

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.534.605

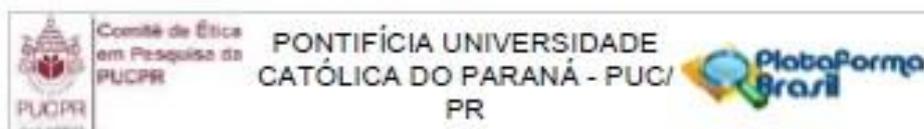
Apresentação do Projeto:

As lesões traumáticas de nervo periférico são muito comuns e cada vez com gravidade mais acentuada. Ocorrem com acidentes domésticos com cortes com faca, lesões laborativas com serra circular, ferimentos por projétil de arma de fogo e politraumatismos de alta energia. Neste caso em que há uma falta de segmento, formando um "gap" entre os cotos do nervo, necessitamos de uma ponte para ligação de ambas extremidades. O presente estudo quer criar um modelo de aloenxerto de nervo periférico acelular de cadáver.

Após a aprovação do TCLE e da documentação necessária, segmentos de nervos periféricos serão coletados no processamento de tecidos músculo esqueléticos de doadores pós morte encefálica e enviados a Laboratório Multiusuário 2 da PUCPR.

Em ambiente asséptico os segmentos de nervo serão dissecados mecanicamente para remoção de gordura e debris teciduais. Serão coletadas amostras de tecido fresco para análise histológica e quantificação de DNA. O início do processo de descelularização os segmentos serão lavados em solução fisiológica isotônica e transferidos para frascos contendo 200ml de solução PUC-I (SDS 0,1% e EDTA 0,02%), incubados à 37°C sob agitação em shaker. Para as análises histológicas as amostras serão fixadas em formalina tamponada à 10% e enviadas a patologia para confecção de lâminas histológicas.

Endereço: Rua Imaculada Conceição 1155
 Bairro: Prado Velho CEP: 80.215-901
 UF: PR Município: CURITIBA
 Telefone: (41)3271-2103 Fax: (41)3271-2103 E-mail: nep@pucpr.br



Continuação do Parecer: 2.034.006

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo citado no projeto PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1023757.pdf é:

Objetivo Primário:

O presente estudo quer criar um modelo de aloenxerto de nervo periférico acelular de cadáver.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos e benefícios citados no projeto estão em acordo com o Sistema CEP/Conep.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Projeto de pesquisa apresenta metodologia em consonância com os objetivos.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

TCLE foi apresentado.

Recomendações:

Recomenda-se, para que TCLE esteja em plena adequação à Resolução CNS 466/12 que se inclui o campo INDENIZAÇÕES. Como o TCLE está voltado ao responsável pelo cadáver que será doador de tecidos, deve constar que a frase "caso ocorra algum dano decorrente da participação do doador no estudo, você será devidamente indenizado, conforme determina a lei".

Ainda, recomenda-se que os termos "assistido e/ou curatelado" sejam substituídos no TCLE por "a pessoa doadora do tecido".

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

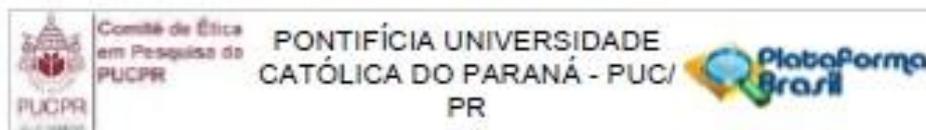
Projeto encontra-se em adequação à Res. CNC 466/12.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1023757.pdf	06/12/2017 17:38:18		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TLCE2nervo1.docx	06/12/2017 17:35:38	FELIPE FRANCISCO BONDAN TUON	Aceito
Folha de Rosto	folharostonervo.pdf	17/11/2017 22:39:46	FELIPE FRANCISCO BONDAN TUON	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projetonervomestrado.doc	04/11/2017 15:47:26	FELIPE FRANCISCO BONDAN TUON	Aceito

Endereço: Rua Imaculada Conceição 1155
 Bairro: Prado Velho CEP: 80.215-901
 UF: PR Município: CURITIBA
 Telefone: (41)3271-2103 Fax: (41)3271-2103 E-mail: nep@puqpr.br



Continuação do Parecer: 2.534.908

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Aprovação da CONEP:

Não

CURITIBA, 09 de Março de 2018

Assinado por:
NAIM AKEL FILHO
(Coordenador)

Endereço: Rua Imaculada Conceição 1155
Bairro: Prado Velho CEP: 80.215-901
UF: PR Município: CURITIBA
Telefone: (41)3271-2103 Fax: (41)3271-2103 E-mail: nep@pucpr.br

9.3. Outros

A descrição das concentrações dos reagentes utilizados nas soluções foi omitida, pois este projeto está em fase de depósito do pedido de patente ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI).