UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

GUSTAVO LOPES TOLEDO

**Enxerto com tubo de polietileno poroso preenchido com gordura
autóloga no reparo de nervo periférico associado com protocolo de
imersão em câmara hiperbárica**

BAURU
2015

GUSTAVO LOPES TOLEDO

**Enxerto com tubo de polietileno poroso preenchido com gordura
autóloga no reparo de nervo periférico associado com protocolo de
imersão em câmara hiperbárica**

Tese apresentada a Faculdade de Odontologia
de Bauru da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutor em Ciências
Odontológicas Aplicadas

Área de concentração: Estomatologia e Biologia
Oral (opção: Biologia Oral)

Orientador: Prof. Dr. Antonio de Castro
Rodrigues

Versão corrigida

BAURU

2015

T575e Toledo, Gustavo Lopes
Enxerto com tubo de polietileno poroso preenchido com gordura autóloga no reparo de nervo periférico associado com protocolo de imersão em câmara hiperbárica/ Gustavo Lopes Toledo. – Bauru, 2015. 134 p. : il. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia de Bauru. Universidade de São Paulo

Nota: A versão original desta tese encontra-se disponível no Serviço de Biblioteca e Documentação da Faculdade de Odontologia de Bauru – FOB/USP.

Autorizo exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta Tese, por processos fotocopiadoras e outros meios eletrônicos.

Assinatura:

Comitê de Ética da FOB-USP
Protocolo nº: 021/2013
Data: 20/08/2013

DEDICATÓRIA

DEDICO ESTE TRABALHO AS MINHAS JÓIAS **JULIANA E MABI**
QUE SUPORTAM MINHAS LIMITAÇÕES, DIFICULDADES E A
INSISTENTE FALTA DE PACIÊNCIA. **AMO VOCÊS**

AGRADECIMENTOS

A **DEUS** pela vida e nova oportunidade na terra

A **NOSSO SENHOR JESUS CRISTO**, governador divino do orbe, santo irmão que jamais deixou e deixará uma só alma para traz

Ao **PAPAI**, inolvidável alma da minha alma, honesto, exemplo de trabalho e com coração amável. **A MAMÃE** que me facultou a oportunidade de mais uma encarnação, alma alegre e inspiradora.

Ao **Dr. André** meu pai espiritual, que por misericórdia divina me acompanha, luz da minha alma, pai sereno, obrigado meu irmão!

Ao **Tio (Pai e Irmão) Paiva**, espírito que entrelaçado ao meu, segue conosco a jornada evolutiva. Ora ao céu, ora a terra, em alternância quase musical. Não poderia deixar de agradecê-lo.

Ao **Chico e Divaldo** amigos espirituais da minha vida talvez nunca saibam como os amo e como foram importantes na minha encarnação.

A meus irmãos **João, Fabiane e Ricardo**, irmãos biológicos desta vida, não ao acaso nos encontramos, obrigado.

As minhas cunhadas **Patrícia e Fabiane** e a meu cunhado **Rickson**.

A minha nova família **Seu Maurício, Dona Helena, Andrea e Wiliam**, por me aceitarem no dia-dia.

A **minha Vó Cida**, grande matriarca da família, pessoa incomum, forte, singular, de personalidade firme e transparente, muito obrigado vovó. A minha **Vó Dinah**, hoje no plano espiritual.

A **Sônia**, minha segunda mãe carnal, obrigado Sô, especialmente por me apresentar desde cedo as dificuldades da vida, consequência das questões sociais que tanto judiam de nossos irmãos.

Ao meu amigo/irmão **Massaiuki (*in memoriam*)**, meu Deus como devo minha encarnação a você meu irmão, sem sua ação e sua direção não teria retornado a pátria espiritual. Como sinto sua falta...

Ao **Uriel** e sua Linda família, sabe que devo muito a você, meu irmão de causa, a quantos séculos juntos e na mesma direção.

Ao **Aro, Jheyssy e Jhon**, companheiros de jornada e de vida no qual agradeço a todos do Barracão

Ao grupo da **Associação Beneficência Esperança**, meus irmãos MUITO OBRIGADO por me aceitarem em suas vidas! O que seria de minha vida sem vocês!

A **Dona Zair**, incrível como Deus sempre me deu anjos protetores silenciosos e a Sra. também o é.

Ao **Sr. Meira, Seu Demi , Dna Sônia e Ana**, no qual agradeço a todos da Associação Beneficente Cristã, Associação de Proteção a Maternidade e a Criança e Fundação Espírita Sebastião Paiva.

Meus amigos **Carlão, Simone, Julieta e as meninas, Seu Roberto Guedini** amo vocês.

Ao **Professor Doutor Antonio de Castro Rodrigues**, que com paciência incondicional aceitou a difícil tarefa de me orientar! Meu Deus como isto deve ser difícil! Homem integro, vertical, professor insuperável, amável, didático e direto. Jamais encontrei um só aluno que o desabonasse, jamais!!!

Ao **Professor Doutor Clóvis Marzola**, meu pai científico, que me ensinou os primeiros passos na academia experimental, o Senhor não sabe quanto me ajudou e como o admiro.

Ao **Professor Doutor Jesus Carlos Andreo**, parabéns pela impecável carreira, a quantos guiou, a quantos exemplificou. Muito obrigado!

Ao **Professor Doutor Rogério Leone Buchaim** excelente mestre, de didática alva, conteúdo sólido, muito obrigado pela sua amizade.

Ao **Professor Doutor André Shinohara**, meu amigo, fiel, um excelente exemplo de moral e conduta ética. Que com humildade esta onde merece estar!!!

Ao **Prof. Dr. Chico (UNESP)** que gentilmente aceitou, de forma desprendida, participar do projeto.

Ao **Dr. Tadeu**, engenheiro e proprietário da **ENGIMPLAN**, situada na cidade de Rio Claro, que jamais duvidou de nossos ambiciosos projetos, obrigado por acreditar em nós.

Ao **Dr. Sérgio Passerotti**, médico oftalmologista e a **Dra Larissa Camargo Passerotti**, médica Hiperbarista, que desde o começo creditaram em nossos sonhos científicos votos incondicionais de confiança, muito obrigado.

A **Dra Marília Buzalaf**, como sou grato pela sua ajuda... Desde o ingresso no programa de doutorado, pelas defesas a minha humilde pessoa, auxílio silencioso que ao meu coração foi um grito! Muito obrigado!!!

Ao **Professor Doutor Celso Nakassima**, presente de Deus no meu caminho, amigo que simplesmente me adotou como aluno, Pai e conselheiro. Professor o senhor é a encarnação da sutileza da misericórdia divina em nossas vidas!

Aos Professores Doutores **João Navarro (*in memoriam*)**, **Flavio, Renato, Marcos Maurício Capelari, Daniel Zorzetto, Claudio Maldonado Pastori, Paulo Zupelari** pessoas que tenho a honra de conviver e admirar, amigos de caminhada.

Aos meus colegas de pesquisa, que gentilmente me receberam e dedicaram seu precioso tempo em nossa pesquisa, **Geraldo, Marcelie, Dayane, Farooque, Junior, Ciclus,....**

Aos colegas de doutorado, **Livia e Paulo**.

Aos **Residentes** do Serviço de Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial de Bauru, meu muito obrigado.

Ao **Romário, Orivaldo, Cisira (*in memoriam*)**, **Fatiminha (hoje minha irmã)**, **Vera (valeu!)**, vocês são incríveis, ainda bem que a USP os tem!

A **Suelen**, amiga que cresceu comigo profissionalmente, **Luana Cristina, Stela, Dna. Nice**, aos funcionários da APCD.

*“Tudo que é seu, encontrará uma maneira de chegar até
você.”*

Chico Xavier

RESUMO

Os nervos periféricos são extensões do sistema nervoso central e responsável pela interação das atividades entre as extremidades, em suas funções sensitivas e motoras. São vulneráveis aos mesmos tipos de traumas que afetam outros tecidos: contusão, compressão, esmagamento, estiramento, avulsão e laceração. As lesões de nervos periféricos situam-se entre as mais incapacitantes que acometem indivíduos em idade produtiva, em face dos múltiplos aspectos concernentes às sequelas deste tipo de afecção. Desta forma, a interrupção de continuidade da estrutura do nervo, como no caso da neurotmese, por algum tipo de trauma, resulta na interrupção de transmissão dos impulsos nervosos e na desorganização de suas atividades funcionais. Por meio da utilização da microcirurgia foi possível desenvolver técnicas reparadoras que vão desde simples neurorafia término-terminal até sofisticados procedimentos cirúrgicos com a utilização de enxertos de nervos, veias e artérias invertidas, tubos sintéticos de materiais variados, tais como silicone e polietileno. Outro aspecto que intriga pesquisadores de todo mundo é a utilização de fatores neurogênicos capazes de acelerar ou melhorar a regeneração de nervos periféricos. A gordura autóloga tem sido continuamente referenciada pela sua abundante oferta, no próprio sítio cirúrgico, apresentando resultados promissores, visto que a adventícia dos vasos é constituída por tecido conjuntivo frouxo, rico em adipócitos. Assim, em um trauma, os neuritos oriundos do coto proximal do nervo lesado, ficam diretamente em contato com esses adipócitos. Seguindo este raciocínio, e com base em trabalhos anteriores onde foi usada veia preenchida com músculo esquelético a fresco como enxerto, decidiu-se testar a possibilidade de crescimento axonal por meio de enxerto com tubo de polietileno preenchido por tecido adiposo autólogo associado a protocolo de imersão em câmara hiperbárica, por meio de um estudo Randomizado Controlado. Para tanto utilizou-se um tubo com 12 mm de comprimento por 0,25 mm de diâmetro, com poros de 80 μ m de diâmetro, preenchido com tecido adiposo *in natura* retirado das adjacências do referido nervo, na tentativa de se recuperar o nervo isquiático. Os resultados morfométricos demonstraram que,

os grupos experimentais com e sem preenchimento de gordura tiveram resultados, do ponto de vista morfométrico e funcional sem diferenças estatisticamente significantes, contudo, quando estes foram confrontados ao grupo controle final, apresentaram diferenças estatisticamente significantes. Já relevando a avaliação funcional, por meio do *Catwalk*, constatou-se que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais, mas teve diferença ao comparar com o grupo controle final, Diante das evidências encontradas e apoiados na literatura pode-se concluir que a câmara hiperbárica trouxe resultados positivos verificados pela aproximação dos resultados dos grupos experimentais tanto morfométrica como funcionalmente.

Palavras-chave: Nervo isquiático de ratos. Regeneração axonal. Tubo de polietileno poroso. Câmara hiperbárica.

ABSTRACT

The peripheral nerves are extensions of the central nervous system and are responsible for the sensory and motor functions of the limbs. These nerves are vulnerable to the same types of traumas that affect other tissues: contusion, compression, crushing, stretching, avulsion, and laceration. Amongst the most disabling kinds of injuries that affect working-age individuals are those of the peripheral nerves; due to the multifaceted characteristics of the aftereffects of the injury. The break in continuity of the nerve structure due to trauma, as in the case of neurotmesis, results in the disruption of the transmission of nerve impulses and the disorganization of their functions. Through the use of microsurgery, it was possible to develop reconstructive techniques that range from a simple end-to-end neurorrhaphy to sophisticated surgical procedures that utilize nerve grafts, inverted veins and arteries, and synthetic rods of varied materials such as silicone or porous polyethylene. Another aspect that intrigues researchers around the world is the utilization of neurogenic factors capable of accelerating or improving the regeneration of peripheral nerves. Autologous fat has been a constant reference in this field of surgery due to its abundant supply at the surgical site itself. The results are promising, as the adventitia of vessels consists of loose connective tissue rich in adipocytes. Thus in a trauma, the neurites derived from the proximal stump of the damaged nerve are in direct contact with these adipocytes. Following this reasoning, and based on previous studies where veins grafted with fresh skeletal muscle were used, we decided to conduct a randomized controlled study to test the possibility of axonal growth by means of grating with a polyethylene rod filled with autologous adipocytes associated with immersion in a hyperbaric chamber. In an attempt to recover the sciatic nerve, a rod 12 mm in length, with a diameter of 0.25 mm, and with pores of 80 μm in diameter, filled with adipose tissue *in natura* removed from the surroundings of said nerve, was used. The morphometric results showed that the experimental groups with and without fat fillings had results that, from the morphometric and functional point of view, were of no statistically significant difference. However, when these results were compared with the final control group, statistically significant differences were noted. Highlighting the functional evaluation through

the use of *Catwalk*, it was found that there were no statistically significant differences between the experimental groups, but there was indeed a difference in comparison to the final control group. In light of the evidence found and supported by literature, one can conclude that the use of the hyperbaric chamber brought positive results verified by the proximity of both the morphometric and functional results of the experimental groups.

Keywords: Rat sciatic nerve. Axon regeneration. Porous polyethylene rods. Hyperbaric chamber.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURAS

- Figura 1** Fibras nervosas mielínicas em aumento de 650X.
Em roxo nota-se a bainha de mielina. Nos axônios de maior diâmetro, a célula envoltória forma dobras em torno do axônio 58
- Figura 2** Imagem esquemática demonstrando um neurônio mielínico. As flechas demonstram o sentido do impulso, em caráter saltatório, graças a bainha de mielina 59
- Figura 3** A extremidade proximal (A) foi suturada na musculatura adjacente, enquanto a distal (B) foi fixada no tecido subcutâneo..... 82
- Figura 4** Tricotomia da região dorsolateral da coxa direita..... 83
- Figura 5** Incisão unilateral posterior de aproximadamente 20 mm 83
- Figura 6** Exposição do n. isquiático..... 84
- Figura 7** Secção do nervo isquiático 84
- Figura 8** Removido aproximadamente 10 mm do nervo 84
- Figura 9** O defeito foi preenchido com tubo de polietileno Poroso..... 84

Figura 10	O defeito foi preenchido com tubo de polietileno poroso	85
Figura 11	Gordura autóloga retirada da área adjacente ao nervo	85
Figura 12	Tubo recebendo a gordura autóloga	85
Figura 13	Acomodação da gordura autóloga na parede lateral do tubo de polietileno	85
Figura 14	Aspecto final da instalação do tubo com Preenchimento	86
Figura 15	Demonstração esquemática do tubo de polietileno poroso	87
Figura 16	Demonstração esquemática do tubo de polietileno poroso sob outro aspecto.....	87
Figura 17	Aspecto comparativo do tubo de polietileno poroso á lâmina de bisturi número 15	88
Figura 18	Profissional responsável gerenciando painel de controle da câmara hiperbárica.....	90
Figura 19	Porta principal da câmara hiperbárica, pela qual há entrada dos pacientes para as sessões	90

Figura 20	Caixas com os animais depositadas no chão. Notar as mangueiras pelas quais passa o oxigênio	91
Figura 21	Avaliação da marcha dos animais (<i>Catwalk</i>)	92
Figura 22	Imagem aproximada da passarela de vidro por onde foram coletadas as imagens e processadas as informações das passadas	92
Figura 23	Animal aleatoriamente selecionado durante o Exame	92
Figura 24	Autofagia no dedo da pata direita do grupo controle desnervado (GCD)	96
Figura 25	Demonstração da presença de tecido fibroso cicatricial	96
Figura 26	Tubo de polietileno contendo cabo de regeneração. Note os pontos com fio 10.0 fixando os cotos no interior do mesmo	97
Figura 27	Corte histológico do nervo isquiático do GEEP-CP, em aumento de 100x, demonstrando a homogeneidade da coloração	97
Figura 28	Corte histológico do nervo isquiático do GCF, em aumento de 400X nota-se as fibras mielínicas evidentemente coradas pelo azul de toluidina. Seta demonstrando região paranodal	98

Figura 29	Representação gráfica das médias dos diâmetros das fibras nervosas (n=220).....	100
Figura 30	Representação gráfica das médias dos diâmetros dos axônios (n=220)	101
Figura 31	Representação gráfica das médias das áreas das fibras (n=220).....	102
Figura 32	Representação gráfica das médias das áreas dos axônios (n=220).....	102
Figura 33	Representação gráfica das médias das espessuras das bainhas (n=220).....	103
Figura 34	Representação gráfica das médias das áreas das bainhas (n=220)	103
Figura 35	Animal do grupo controle final durante exame no <i>Catwalk XT</i> . Os destaques em verde são a pata anterior (mão) e posteriores (pés). Notar a extensão normal dos dedos da pata posterior direita, aqui denominada de RH	105
Figura 36	Imagem da pegada da pata direita do grupo controle final. Importante observar as impressões dos dedos, com distribuição homogênea da energia da pegada	105
Figura 37	Animal do grupo experimental com tubo	

de polietileno poroso associado com gordura autóloga (GEEPcg). Diferentemente do que ocorreu no grupo controle, observamos o estreitamento da pegada com manutenção da intensidade..... 106

Figura 38 Imagem da pegada da pata direita do grupo experimental enxerto polietileno poroso com preenchimento (GEEPcg), mostrando intensidade da pegada mas não é nítida a distribuição das digitais 106

Figura 39 Tela demonstrando a captura dos dados da pegada pelo *software XT Catwalk* 107

Figura 40 Avaliação das digitais da pegada pelo *software XT Catwalk* 107

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Comparação das duas classificações, de Seddon e Sunderland, das lesões dos nervos periféricos	63
Quadro 2	Demonstração do conteúdo de oxigênio no sangue com as alterações da pressão atmosférica	74
Quadro 3	Demonstração cartesiana comparativa da recuperação funcional do animal controle e experimental	76
Quadro 4	Esquema ilustrativo demonstrando a metodologia adotada para execução da análise morfológica	99

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AA: Área do Axônio

AB: Área da Bainha

AF: Área da Fibra

AEN: Auto enxertos nervosos

ATA: Atmosfera Absoluta

°C: Graus Celsius

CCI: Constrição crônica

cm: Centímetro

CS: Células de Schwann

CTDTA: Células-tronco derivadas de tecido adiposo

CTDPAs: Células-tronco derivadas de pele autólogas

DA: Diâmetro do Axônio

DF: Diâmetro da Fibra

EB: Espessura da Bainha

ECG: Eletroencefalogramas

EMV: Eletromiografia

ENGIMPLAN: Engenharia de Implantes

EUA: Estados Unidos

EVI: Enxerto de veia invertida

FIC: Função Isquiática

Fig.: Figura

FDA: *Food and Drug Administration*

FFb: Fator fibroblasto básico

FOB-USP: Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo

g: Gramas

GCI: Grupo controle inicial

GCD: Grupo Controle Desnervado

GCF: Grupo Controle Final

GEEPsg: Grupo Experimental Enxerto com Tubo de Polietileno poroso sem
gordura

GEEPcg: Grupo Experimental Enxerto com tubo de Polietileno poroso com gordura

h: hora

HBO: Oxigenoterapia hiperbárica

L4: Lombar 4

L5: Lombar 5

MEC: Matriz extracelular

MET: Microscopia Eletrônica de Transmissão

min.: Minuto

mm: Milímetro

mg / Kg: Miligramas por quilograma

ml/dl: Mililítros por decilítros

mmHg: Milímetros de mercúrio

m/s: metros por segundo

n: Número

N.: nervo

Na⁺: Sódio

ng / ml: Nanograma por mililitr

OTH: Oxigenoterapia hiperbárica

O₂: Oxigênio

OPF: Fumarato de polietileno glicol neutro oligo

PAC: Potencial de Ação Composto (PAC)

PLA: Polilactina

PCLF: Poli fumarato de caprolactona

PLGA: Políácido láctico-co-ácido glicólico

PGA: Poliglicólico

PHB: Polifosfoésteres

S1: Sacral 1

S2: Sacral 2

S3: Sacral 3

SIL: Silicone

SNC: Sistema nervoso central

SNP: Sistema nervoso periférico

SF: Soro Fisiológico

UNICAMP: Universidade Estadual de Campinas

μl : microlitros

μm : micrômetros

α : Alfa

β : Beta

ω : Omega

100X: Cem vezes

400X: Quatrocentas vezes

SUMÁRIO

1 Introdução	49
2 Revisão da Literatura	55
2.1 Aspectos anatômicos e histofisiológicos do Sistema Nervoso Periférico.....	57
2.2 Lesões em nervos periféricos	61
2.2.1 Fisiopatologia das lesões.....	62
2.3 Procedimentos reparadores das Lesões dos nervos periféricos.....	66
2.3.1 Breves apontamentos históricos	66
2.3.2 Tratamento das lesões dos nervos periféricos na atualidade	66
2.3.3 Aplicação da medicina hiperbárica no tratamento de feridas.	73
3 Material e Métodos.....	79
3.1 Distribuição dos animais em grupos	81
3.1.1 Grupo Controle Inicial (GCI).....	81
3.1.2 Grupo Controle Final (GCF).....	81
3.1.3 Grupo Controle Desnervado (GCD).....	82
3.1.4 Grupo Experimental Enxerto de Polietileno sem Preenchimento (GEEP -sp).....	83
3.1.5 Grupo Experimental Enxerto de Polietileno com Preenchimento (GEEPCG – 150)	83
3.2 Características morfológicas dos tubos de polietileno poroso	86
3.3 Aspectos cirúrgicos e respectiva coleta das amostras.....	88
3.4 Protocolo de Imersão na câmara Hiperbárica.....	89
3.5 Análise funcional – <i>Catwalk</i>	91
3.5.1 Características do equipamento – <i>Catwalk</i>	93
3.5.2 Análise avançada da marcha.....	93

4 Resultados.....	95
4.1 Avaliação Macroscópica	95
4.2 Coleta das amostras	95
4.3 Avaliações Histológicas	97
4.4 Avaliação morfométrica dos nervos	98
4.5 Avaliações funcionais	104
4.6 Câmara Hiperbárica	108
5 Discussão.....	109
6 Conclusões.....	119
Referências Bibliográficas	123
Anexos	131

1 - Introdução

As lesões de nervos periféricos situam-se entre as mais incapacitantes que acometem indivíduos em idade produtiva, em face dos múltiplos aspectos concernentes às sequelas deste tipo de afecção (LUNDBORG ; ROSÉN , 2001; BRUYNS; JAQUET; SCHREUDERS; *et al.*,2003; IJKEMA-PAASSEN ; JASEN ; GRAMSBERGEN, 2004)

Os tipos de trauma que promovem lesões de nervos periféricos incluem transecção, estiramento, avulsão de raiz nervosa, acarretando lesões importantes desde os receptores na pele ou músculo, incluindo o gânglio da raiz dorsal na medula, até alterações, na porção cortical do sistema nervoso central (SNC). Estas alterações podem ser transitórias ou permanentes cursando com danos irreversíveis (MILLES, 1988; MILLER; WEBSTER; *et al.*, 2003; JOHNSON, SKORNIA, STABENFELDT; *et al.*,2008).

As lesões nervosas periféricas foram classificadas, inicialmente (SEDDON, 1943) em neuropraxia — lesão leve com recuperação em semanas a meses; Axonotmese — lesões causadas comumente por esmagamento ou estiramento ocorre perda de continuidade axonal, subsequente degeneração Walleriana do segmento distal; 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 consequente interrupção do crescimento axonal. A recuperação espontânea é pobre, não regenera sem intervenção cirúrgica. Tal classificação, posteriormente foi detalhada por Sunderland em 1978.

Dentre todas as técnicas disponíveis para a reparação neural a rafia primária, ou término-terminal, destaca-se como a de melhores resultados histológicos e funcionais, trata-se de realizar uma simples sutura epineural com fio ultrafino, sem, contudo realizar tração dos cotos lesionados (BRUNELLI; VIGASIO; BRUNELLI, 1994). Tal procedimento, para união dos cotos, também tem sido testada com cola de fibrina, por meio da avaliação da velocidade de condução, com resultados promissores (SANDRINI; PEREIRA JUNIOR; GAY-ESCODA, 2007).

Quando a simples rafia não é possível pela perda de estrutura, com a formação de um *gap*, têm-se a técnica de auto enxertia, que consiste na utilização de um nervo do próprio paciente de outra parte do corpo (TERZIS;

FAIBISOFF; WILLIAMS, 1975), esta técnica é capaz de guiar o crescimento axonal e unir as extremidades do coto distal e proximal, reduzindo a tensão na linha de sutura, fator este que inibiria a reparação neural (SPECTOR; LEE; DERBY; *et al.*, 1993). Entretanto, a aplicação desta terapêutica implica em algumas desvantagens, tais como a necessidade de abordagem de outro sítio cirúrgico, perda de sensibilidade definitiva (anestesia) da área doadora, possibilidade de formação de neuroma de amputação na região que recebeu o enxerto, dentre outras.

Para evitar essas inconveniências pesquisadores decidiram lançar mão de outros artifícios, como enxertos de veias autólogas, tubos sintéticos absorvíveis ou não. Para o primeiro grupo, estudiosos decidiram comparar a eficácia da utilização da veia invertida comparada aos enxertos de nervos. O enxerto de veia invertida é um tubo de veia puxado através de si mesmo para inverter a orientação normal e colocar a camada adventícia no interior do lúmen, de modo a simular o que um nervo encontra em seu meio natural. Em 10 ratos, a veia jugular direita foi colhida, virado ao avesso, e utilizado para preencher um defeito 10 milímetros criado no nervo isquiático direito. O segmento de nervo de 10 mm da direita foi então utilizado como um padrão de enxerto de nervo no espaço da lesão de 10 milímetros criado no nervo ciático esquerdo. Os ratos foram sacrificados aos 8 e 12 semanas. A Regeneração do enxerto de veia invertida apresentou resultados funcionais superiores (velocidades de condução mais rápida) e melhoria dos resultados histológicos (maior número de axônios) em comparação com o lado do nervo enxertado. Concluiu-se que, possivelmente, a adventícia da parede da veia promoveu a melhor regeneração do nervo, proporcionando um ambiente rico em colágeno, a laminina, e células de Schwann e o aumento da sua vascularização (WANG; COSTAS; BRYAN; *et al.*, 1995; FERRARI; RODRIGUES; MALVEZZI; *et al.*, 1999).

Avaliou-se também a possibilidade da utilização da artéria invertida para servir de conduto entre os cotos lesionados. Apesar de veias e artérias apresentarem estruturas de parede semelhantes, existem diferenças que podem ser relevantes na reconstrução de nervos periféricos. Enxertos venosos invertidos têm sido satisfatoriamente usados para reparar tanto nervos motores e sensitivos. No entanto, o enxerto de artéria invertidas é uma técnica nova e não

totalmente investigada. Neste trabalho, apresentaram-se dados morfológicos comparativos sobre a regeneração do nervo isquiáticos em ratos. Veias jugulares e artérias aorta foram colhidas de animais doadores para preencher uma lacuna de 10 mm. Foram sacrificados com 10 semanas para avaliar a regeneração do nervo. Ambas as técnicas apresentaram grande variabilidade no tecido nervoso. Os resultados apresentaram semelhanças morfométricas (BARCELOS; RODRIGUES; SILVA, *et al.*, 2003).

As técnicas de tubulização apresentam resultados satisfatórios, entretanto, exibem o grande inconveniente da necessidade de abordar, cirurgicamente, outra região do próprio organismo. E este, invariavelmente já se encontra mutilado por outra injúria. Pensando nisso que pesquisadores do mundo todo passaram a desenvolver caminhos diferentes. Tais como, a utilização de tubos sintéticos que fariam a mesma função dos enxertos autólogos (TOLEDO, 2011).

Após gerar uma lesão de 10 mm no nervo isquiático dos ratos, utilizou-se de um tubo de polietileno poroso, sendo que tais orifícios foram confeccionados para permitirem invasão de capilares sanguíneos. Os animais foram aleatoriamente divididos em dois grupos experimentais e três controles, sendo que os primeiros no qual foram adaptados os tubos, um com preenchimento de gordura autóloga e o outro sem preenchimento. Nos controles houve a subdivisão em inicial, desnervado e final. Próximo da data do sacrifício, 150 dias de pós-operatório, os animais foram submetidos a análise funcional por meio do *footprint*, que demonstrou que o grupo controle sem preenchimento apresentou melhores resultados quando comparados ao grupo com gordura. E, curiosamente, por avaliação morfométrica notou-se superioridade naquele com tecido adiposo. Concluiu-se, dentre outras, que melhores estudos deverão ser realizados para responder essa celeuma (TOLEDO, 2011).

Outro grande desafio, além do tipo de tubo ou conduíte, é o que vai dentro dele, seja vazio ou com algum componente neurogênico, e substrato de celeuma no mundo científico (TOLEDO, 2011).

Baseado nos estudos desenvolvidos com tubo de colágeno semeado com células-tronco derivadas de pele autólogas (CTDPAs) para preencher lacunas em defeitos de nervo isquiáticos de ratos, apresentou-se um relato de

caso descrevendo um uso deste enxerto para a reparação de nervos sensoriais da parte superior do braço de um paciente. No tratamento do paciente, funções motoras e sensoriais do nervo mediano demonstraram recuperação pós-implantação em curso durante o período de acompanhamento. Os resultados indicam que enxerto artificial de tubo de colágeno poderia ser usado para correção cirúrgica de defeitos maiores em grandes lesões de nervos periféricos, aumentando a qualidade de vida dos pacientes (GRIMOLDI; COLLEONI; TIBERIO; *et al.*, 2013).

Já é sabido da eficácia no uso da câmara hiperbárica no tratamento das feridas, e neste sentido, pesquisadores decidiram testar sua ação sobre lesões de nervos periféricos. Foi estudado o efeito da oxigenoterapia hiperbárica (HBO) na recuperação de nervo periférico. O nervo isquiático dos ratos seccionados e reparados pela sutura epineural simples, usando técnica microcirúrgica. Após os reparos, os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos: 1) controle - nenhum HBO (n = 20); 2) tratamento HBO - duas vezes por dia durante uma semana (1,75 h de duração do mergulho , 100 por cento de O₂ , 2,5 ATA) (n = 16) . Recuperação do nervo foi avaliada semanalmente (total de 10 semanas) por análise de uma *walking-track* , a partir do qual o índice de função isquiática (FIC) foi calculada para cada animal. Assim sendo, FIC melhorou no grupo HBO - tratamento em relação aos controles , tornando-se estatisticamente significativa nas semanas 7 e 10. Estes resultados sugerem que a recuperação funcional em nervos seccionados, desvascularizadas, podem ser melhorados através de 1 semana de tratamento a seguir à reparação HBO microcirúrgica (ZAMBONI; BROWN; ROTH; *et al.*, 1995).

Diante de tantos questionamentos ainda sem respostas definitivas a presente Tese de Doutorado teve como proposta avaliar a eficácia da utilização da câmara hiperbárica em animais submetidos a procedimento para colocação de tubos de polietileno poroso com e sem inserção de gordura autóloga, por meio de um estudo Randomizado controlado. Tal aferição foi realizada por meio de morfometria e avaliação funcional pelo *Catwalk*.

2 = Revisão da Literatura

2- REVISÃO DE LITERATURA

2.1 – Aspectos anatômicos e histofisiológicos do Sistema Nervoso Periférico

O sistema nervoso é didaticamente 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 (GARTNER, 2006). 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.

Os nervos do sistema nervoso periférico são formados por axônios, células não neuronais e componentes da matriz extracelular (MEC). O axônio 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 (Figs.: 1 & 2) são envoltos por uma estrutura tubular com múltiplas camadas (bainha de mielina) originadas pelas células de Schwann (CS). Os axônios amielínicos, embora a bainha de mielina esteja ausente, também estão associados às CS (LANDON, 1976). 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 (PETERS; PALAY; WEBSTER, 1976) 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 (Fig. 2). Essa estrutura é rica em canais de íons de sódio (Na^+), que dão origem à condução saltatória característica dos axônios

mielinizados. A bainha de mielina é formada pela diferenciação da membrana plasmática da própria CS; 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 (LUNDBORG, 1993). Os axônios amielínicos estabelecem ligações com as CS por meio de projeções citoplasmáticas que os envolvem total ou parcialmente, sendo agrupados em números que variam de 5 a 25 axônios (SEIM, 2002).

Fonte: <http://diariodebiologia.com/files/2011/06/001ca.jpg>

Fig.1: Fibras nervosas mielinizadas (650 X). Em roxo nota-se a bainha de mielina. Nos axônios de maior diâmetro, a célula envoltória forma dobras em torno do axônio.

Após uma lesão nervosa, as CS adquirem características proliferativas e fagocíticas, tornando-se vitais no processo de degeneração dos axônios (degeneração Walleriana). Em nervos desnervados, 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.

Fonte: <http://www.sobiologia.com.br/figuras/Fisiologiaanimal/nervoso8.jpg>

Fig.2: Imagem esquemática demonstrando um neurônio mielínico. As setas demonstram o sentido do impulso.

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 (SHORES, 1996; THOMAS, 1996). 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 α , possuem maior diâmetro (12 - 22 μ 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 β) também possuem grande diâmetro (6 - 18 μ m), velocidade de condução rápida (35 - 108 m/s) e fortemente mielinizada. 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 δ , com diâmetro menor (3 - 7 μ m), velocidade de condução moderada (3 - 30 m/s) e fracamente mielinizadas, estão associadas à nocicepção, termocepção e quimiorrecepção. E as fibras que pertencem ao grupo IV – tipo C – são amielínicas, apresentam menor diâmetro (0,25 - 1,35 μ 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,

termoceptivas e quimioceptivas. Nas fibras amielínicas o potencial de ação é mais lento, pois o estímulo é transmitido de forma contínua ao longo da fibra. (LUNN, BROWN, PERRY, 1990; IDE, 1996; ZOCHODNE, 2000; TALOR, 2006).

Fibras nervosas são circundadas por três camadas de tecido conjuntivo. A camada mais externa, formada por tecido conjuntivo colagenoso denso não modelado, é denominada como epineuro e possui vasos, fibroblastos e fibras de colágeno tipo I. A camada média – perineuro - apresenta células pavimentosas dispostas em 24 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 (RUTKOWSKIL, TUIE, LINCOLN, *et al.*, 1999; KIEFER; KIESEIER; STOLL; *et al.*, 2001; GARTNER; HIATT, 2006).

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 (PETERS; PALAY; WEBSTER, 1976). Dentre os nervos periféricos, o nervo isquiático que se destaca por seu grande diâmetro e patologias comuns associadas a ele. Constituído por fibras provenientes dos segmentos medulares da L4, L5, S1, S2 e S3, atravessam o grande forame 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 (ERHART, 1965). Lesão nessa localização acomete os músculos bíceps femoral, semitendinoso e semimembranoso, levando a perda da sensibilidade na região lateral abaixo do joelho (KASRA; ROWSHAN; JONES, *et al.*, 2004).

2.2 Lesões em nervos periféricos

Os mais diversos traumas e afecções de variados gêneros levam a lesões dos nervos periféricos que se situam entre as mais incapacitantes, acometendo indivíduos em idade produtiva, face dos múltiplos aspectos concernentes às sequelas deste tipo de problema (BRUYNS; JAQUET; SCHREUDERS; *et al.*, 2003; LUNDBORG ; ROSÉN , 2001; IJKEMA-PAASSEN ; JASEN ; GRAMSBERGEN, 2004).

São os tipos de trauma que geram as lesões dos nervos periféricos englobam estiramento, avulsão de raiz nervosa, transecção, acarretando lesões importantes desde os receptores na pele ou músculo, incluindo o gânglio da raiz dorsal na medula, até alterações, em região cortical no sistema nervoso central (SNC). Tais alterações podem ser transitórias ou permanentes cursando com sequelas irreversíveis (MILLES, 1988; THAPA; MILLER; WEBSTER; *et al.*, 2003; JOHNSON, SKORNIA, STABENFELDT; *et al.*, 2008). Estudos demonstraram que, na Suécia, a frequência de acometimento dos membros, especialmente das mãos, em acidentes de trabalho ou fora deles foi de 13,9 casos/100.000 pessoas/ano (THAPA; WEBSTER; HABERSTROH, 2003). Além disso, estudos naquele país demonstraram ainda que as lesões de mãos sem comprometimento de nervos periféricos acarretam custo anual de 15.600 euros relativos a cada paciente. Este valor é acrescido de 63% aos custos com cifras de 27.000 euros, anuais, quando ocorrem lesões de nervos periféricos associados a lesões de tendões (OLIVEIRA, 2003).

Após avaliação de 134 pacientes demonstrou-se, que o custo per capita de lesões corto - contuso em mãos alcançou cifras da ordem de 30.754 dólares, com uma perda média de 64 dias de trabalho. O custo total deste grupo de pacientes avaliados, considerando as perdas funcionais resultantes, alcançou valores de mais de 4 milhões de dólares (GAO; NIKLASON ; LANGER, 1998).

Em estudo retrospectivo de 3 anos, nos EUA, entendeu-se que as lesões graves de membros superiores ocorrem em uma escala progressiva de perdas socioeconômicas e emocionais relacionados à gravidade do trauma ocorrido (AZIZI; MOHAMMADI; AMINI, 2012).

2.2.1 - Fisiopatologia das lesões

As lesões nervosas periféricas foram classificadas, inicialmente (SEDDON, 1943) 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 em ter continuidade anatômica. Ocorre a desorganização do axônio causada por uma fibrose tecidual com consequente interrupção do crescimento axonal. A recuperação espontânea é pobre, não regenera sem intervenção cirúrgica.

A padronização dos tipos de lesões de nervos periféricos levou Sunderland (1978) a detalhar os mecanismos de lesão nervosa (quadro 1), já realizada por Seddon, que ocorrem em escala crescente de envolvimento dos diversos componentes do nervo periférico (SUNDERLAND, 1978; GARTNER; HIATT, 2006; LI; WANG; WEI; *et al.*, 2010)

São eles:

Grau I - ocorre lesão da bainha de mielina, com bloqueio temporário da condução nervosa, mantendo a integridade da estrutura nervosa;

Grau II - lesão axonal parcial, degeneração walleriana, porém com integridade da membrana basal;

Grau III - lesão axonal parcial e fragmentação da lâmina basal;

Grau IV - lesão de endoneuro, perineuro e lâmina basal;

Grau V - lesão axonal completa do tronco nervoso.

As lesões de nervos periféricos envolvem uma série de eventos complexos referentes ao tecido lesado, incluindo sinalização axonal, alteração funcional no corpo celular neuronal, ativação de células da glia, e inflamação sistêmica caracterizada por edema e infiltração celular (LANDON; HALL, 1976).

Quadro 1: Comparação das duas classificações de Seddon e Sunderland, das lesões dos nervos periféricos

SEDDON (1943)	SUNDERLAND (1951)
Neuropraxia	Grau 1 – Desmielinização local
Axonotmese	Grau 2 – Interrupção da continuidade axonal
Neurotmese	Grau 3 – Destruição do endoneuro Grau 4 – Destruição do perineuro Grau 5 – Interrupção da continuidade de todas as estruturas nervosas

Os neurônios lesados precisam mobilizar mecanismos intrínsecos e extrínsecos de reparação, promovendo importante alteração na função do corpo neuronal (LUNDBORG, 1973; PETERS; PALAY; WEBSTER, 1976). Quando um axônio é seccionado o aumento do transporte axonal retrógrado em direção ao corpo celular. Concomitantemente, ocorre diminuição na liberação de fatores neurotróficos, comprometendo o núcleo celular e o decréscimo de transporte anterógrado, com agravamento da lesão distal do nervo, e consequente lesão em receptores de pele, músculos e órgãos-alvo (THOMAS, 1964; JESSEN, MIRSKY, 1996; IDE, 1996; SHORES, 1996; SEIM, 2002). Axônios motores preferencialmente reinervam alvos motores, e a junção neuromuscular, da placa

mioneural, desempenha papel preponderante na transmissão de mensagens do sistema nervoso central para o músculo (PERRY, 1990; ZOCHODNE, 2000; KIEFER; KIESEIER; STOLL, *et al.*, 2001; LUNN; BROWN; TALOR, 2006). É fundamental a presença da lâmina basal, como arcabouço de regeneração das células de Schwann no fenômeno de regeneração dos nervos periféricos (ERHART, 1965; RUTKOWSKI; TUIE; LINCOLN, *et al.*, 1999).

Quando ocorre a neurotmeze, ou seja, secção total do nervo com a total ruptura dos fascículos nervosos, ocorre a necessidade de realinhamento fascicular cirúrgico adequado, pois os cotos nervosos tendem a retrair e a sutura primária só é possível se não houver tensão no sítio de coaptação (MILLES, 1988; KASRA; JONES; GUPTA, *et al.*, 2004; GARTNER; HIATT, 2006).

O crescimento de axônios após a transecção é um fenômeno delicado. De cada axônio primário, numerosos brotamentos, em geral ao redor de 5 por axônio são formados, e em cada brotamento há um cone de crescimento. Nova membrana basal da célula de Schwann é transportada do corpo celular e incorporada na superfície da membrana do cone de crescimento, aumentando a área de abrangência dos axônios em regeneração, que por sua vez são precedidos pelas células de Schwann migratórias. Este microambiente pode ser atrativo ou repulsivo dependendo da liberação de fatores neurotróficos (SEDDON, 1943; SUNDERLAND, 1978; HUDSON; EVANS; SCHMIDT, 2000).

Estudos realizados em modelo primata demonstraram que após a neurotmeze do mediano, no nível do SNC existe uma deaferentação (dor neuropática causada por falta de impulsos do sistema nervoso central ou periférico) seletiva do córtex neural somatosensitivo. Além disso, demonstrou-se que o nervo acometido tem a sua área de representação córtico-motora diminuída, e as áreas deaferentadas são invadidas pelas áreas somatosensitivas vizinhas, até que a reconexão neural (TALOR, 2006) substituta seja restabelecida. A transecção nervosa de nervos medianos, em primatas foi acompanhada por mapeamento cerebral cortical nas áreas motoras de Broadmann demonstrada por potenciais evocados somatosensitivos corticais, e eletroencefalogramas (EEG) seriados. Além disso, após 9 meses as áreas previamente inervadas pelo nervo mediano foram inervadas pelos nervos ulnar e

radial. Após a correção cirúrgica tardia houve regressão aos padrões eletrofisiológicos basais, porém com intensidade muito diminuída.

Estudos experimentais e em seres humanos utilizando-se análises histoquímicas não revelaram recuperação efetiva funcional dos nervos periféricos quando seccionados (FARRAG; LEHAR; VERHAEGEN; *et al.*, 2007; TREMP; SCHWABEDISSEN; KAPPOS; *et al.*, 2013; LICHTENFELS; COLOMÉ; SEBBEN; *et al.*, 2013). Os testes de eletroneuromiografia não demonstram confiabilidade, bem como as velocidades de condução e as latências proximais e distais também não refletem efetivo aporte neuronal funcional (SARIGUNEY; YAVUZER; ELMAS; *et al.*, 2008; YAO; WANG; CUI; *et al.*, 2009; DING; LUO; ZHENG; *et al.*, 2010; MADDURI; FELDMAN; TERVOORT; *et al.*, 2010). Além disso, não existe correlação entre nervos periféricos, após reconstrução, mesmo na presença de fibras mielinizadas em grande quantidade e com efetiva demonstração de regeneração observada sob microscopia eletrônica (LANDON; HALL, 1976; GARTNER; HIATT, 2006; KALBERMATTEN; ERBA; MAHAY; *et al.*, 2008).

Progressos importantes têm sido obtidos no estudo da regeneração pós-traumática de nervos periféricos. Além disso, a compreensão dos mecanismos imunes e neurobiológicos envolvidos neste processo pode promover avanços importantes no entendimento destas lesões (MIRSKY; JESSEN, 2001; GARTNER; HIATT, 2006; JOHNSON; SKORNIA; STABENFELDT; *et al.*, 2008; KALBERMATTEN; PETTERSSON; KINGHAM; *et al.*, 2009).

Os modelos animais que são utilizados para a demonstração de regeneração nervosa são variados e cada espécie apresenta suas peculiaridades (PETERS; PALAY; WEBSTER, 1976; BRAGA-SILVA, 1999; SCHMIDT; LEACH, 2003; LEE; YU; LOWE; *et al.*, 2003; KASRA; JONES; GUPTA, 2004; KALBERMATTEN; ERBA; MAHAY, 2008; ICHIHARA; INADA; NAKAMURA, 2008). O rato Wistar possui similaridade com a estrutura e a disposição anatômica dos nervos periféricos quando comparado aos seres humanos.

2.3 – Procedimentos reparadores das lesões dos nervos periféricos

2.3.1 – Breves apontamentos históricos:

A primeira referência a despeito de procedimentos cirúrgicos em nervos data do ano 1393, no qual Chauliac faz menção a bons resultados na recuperação dessas estruturas. Entretanto, apenas em 1850, um pesquisador de nome Augustus Waller apresenta seu importante trabalho sobre a degeneração nervosa após lesão. Ao estudar os nervos hipoglosso e glossofaríngeo de sapos demonstrou não apenas a degeneração do coto distal, mas também o processo de regeneração do mesmo. Os resultados de suas análises desencadeou a teoria da degeneração Walleriana.

Outros estudos importantes que originaram conceitos utilizados até hoje foram, por exemplo, os realizados por *Ramon y Cajal*, no qual demonstraram que a regeneração nervosa parte do coto proximal e não da autorregeneração do distal, como era crível anteriormente.

No século XX, Tinel, em 1915 publica seu trabalho sobre a regeneração, descrevendo a dor como sinal de irritação e mal prognóstico; Seddon, em 1948 classifica diversos tipos de lesões, como já anteriormente mencionado. Sunderland, em 1945 corrobora e reitera os estudos de Seddon dando a base dos conhecimentos desdobrados até hoje.

2.3.2 – Tratamento das lesões dos nervos periféricos:

Dentre todas as técnicas disponíveis para a reparação neural a rafia primária, ou término-terminal, destaca-se como a de melhores resultados histológicos e funcionais, trata-se de realizar uma simples sutura epineural com fio ultrafino, sem, contudo tracionar dos cotos lesionados (BRUNELLI; VIGASIO; BRUNELLI, 1994). Tal procedimento, para união dos cotos, também tem sido testada com cola de fibrina, por meio da avaliação da velocidade de condução, com resultados promissores (SANDRINI; PEREIRA JUNIOR; GAY-ESCODA, 2007; BUCHAIM; ANDREO; BARRAVIERA, 2015).

Quando a simples rafia não é possível pela perda de estrutura, com a formação de um *gap*, têm-se a técnica de auto enxertia, que consiste na utilização de um nervo do próprio paciente de outra parte do corpo (TERZIS; FAIBISOFF; WILLIAMS, 1975), esta técnica é capaz de guiar o crescimento axonal e unir as extremidades do coto distal e proximal, reduzindo a tensão na linha de sutura, fator este que inibiria a reparação neural (SPECTOR; LEE; DERBY; *et al.*, 1993). Entretanto, a aplicação desta terapêutica implica em algumas desvantagens, tais como a necessidade de abordagem de outro sitio cirúrgico, perda de sensibilidade definitiva (anestesia) da área doadora, possibilidade de formação de neuroma de amputação na região que recebeu o enxerto, dentre outras.

Para evitar essas inconveniências pesquisadores decidiram lançar mão de outros artifícios, como enxertos de veias autólogas, tubos sintéticos absorvíveis ou não. Para o primeiro grupo, estudiosos decidiram comparar a eficácia da utilização da veia invertida comparada aos enxertos de nervos. O enxerto de veia invertida é um tubo de veia puxado através de si mesmo para inverter a orientação normal e colocar a camada adventícia no interior do lúmen, de modo a simular o que um nervo encontra em seu meio natural. Em 10 ratos, a veia jugular direita foi colhida, virado ao avesso, e utilizada para preencher um defeito 10 milímetros criado no nervo isquiático direito. O segmento de nervo de 10 mm da direita foi então utilizado como um padrão de enxerto de nervo no espaço da lesão de 10 milímetros criado no nervo isquiático esquerdo. Os ratos foram sacrificados 8 e 12 semanas pós-cirurgia. A Regeneração do enxerto de veia invertida apresentou resultados funcionais superiores (velocidades de condução mais rápida) e melhoria dos resultados histológicos (maior número de axônios) em comparação com o lado do nervo enxertado. Concluiu-se que, possivelmente, a adventícia da parede da veia promoveu a melhor regeneração do nervo, proporcionando um ambiente rico em colágeno, laminina, e células de Schwann e o aumento da sua vascularização (WANG; COSTAS; BRYAN; *et al.*, 1995).

Avaliou-se também a possibilidade da utilização da artéria invertida para servir de conduto entre os cotos lesionados. Apesar de veias e artérias apresentarem estruturas de parede semelhantes, existem diferenças que podem

ser relevantes na reconstrução de nervos periféricos. Enxertos venosos invertidos têm sido satisfatoriamente usados para reparar tanto nervos motores e sensíveis. No entanto, o enxerto de artéria invertidas é uma técnica nova e não totalmente investigada. Neste trabalho, apresentaram-se dados morfológicos comparativos sobre a regeneração do nervo isquiáticos em ratos. Veias jugulares e artérias aorta foram colhidas de animais doadores para preencher uma lacuna de 10 mm. Foram sacrificados com 10 semanas para avaliar a regeneração do nervo. Ambas as técnicas apresentaram grande variabilidade no tecido nervoso. Os resultados apresentaram semelhanças morfométricas (BARCELOS; RODRIGUES; SILVA, *et al.*, 2003).

Seguindo o mesmo raciocínio da utilização da veia invertida, outra pesquisa foi realizada, porém com uma importante modificação, a inserção de gordura autóloga na luz da veia. Este pequeno detalhe parece ter apresentado diferenças morfológicas nos axônios quando comparado ao grupo que não se utilizou do artifício (ROSA-JUNIOR, 2010).

Além da gordura outras substâncias já foram testadas no interior das veias, como é o caso da administração tópica FK506, um imunossupressor aprovado pela FDA (*Food and Drug Administration*) utilizado principalmente para a prevenção da rejeição do enxerto após transplante. Recentemente, estudos têm se concentrado em seu papel como um neuroprotetor e neurotrófico. Um defeito de 10 mm foi gerado no nervo isquiático e nele foi inserido enxerto de veia invertida preenchida com 10 µl de uma diluição de droga - transportador (10 ng / ml de FK506). As fibras regeneradas foram estudados 4,8, e 12 semanas após a cirurgia. Houve diferença estatisticamente significativa entre as proporções de peso médio do músculo gastrocnêmio dos grupos de controle IOVG / FK506 e IOVG ($p < 0,05$). Índices morfométricos de fibras regeneradas mostraram que o número e diâmetro das fibras mielinizadas foram significativamente maiores no grupo / FK506 EVI do que no grupo de controle EVI . A análise Imunohistoquímica revelou imunorreatividade mais positivo para a proteína S100 no grupo EVI / FK506 do que no grupo de controle EVI (AZIZI ; MOHAMMADI; AMINI; *et al.*, 2012).

As técnicas de tubulização, como visto, apresentam resultados satisfatórios, entretanto, exibem o grande inconveniente da necessidade de

abordar, cirurgicamente, outra região do próprio organismo. E este, invariavelmente já se encontra mutilado por outra injúria. Pensando nisso que pesquisadores do mundo todo passaram a desenvolver alternativas diferentes. Tais como, a utilização de tubos sintéticos que fariam a mesma função dos enxertos autólogos (TOLEDO, 2011).

Como alternativa para auto enxertos de nervos desenvolveu-se um tubo de 12 milímetros de comprimento de poli (2-hidroxietil metacrilato-co-metacrilato de metila) porosos e estudou-se a sua capacidade de regeneração para *gaps* criados cirurgicamente de 10 milímetros no nervo isquiático. Comparou-se sua eficácia *in vivo* com o padrão-ouro, o autoenxerto de nervo. Os tubos foram avaliados por sua capacidade de permitir a regeneração nervosa em 4, 8 e 16 semanas pós-implantação. A regeneração axonal no interior dos tubos foi observado 8 semanas pós-cirurgia, com parâmetros de resultados comparáveis aos auto enxertos . Esta observação foi posteriormente confirmada pelos resultados eletrofisiológicos e histomorfométricos. O grupo tubo de 16 semanas tiveram uma resposta bimodal, com 60% dos tubos que têm uma resposta semelhante à auto enxertos e os outros 40 % têm significativamente menor ($P < 0,05$) (BELKAS; MUNRO; SHOICHET ; *et al.*, 2005).

Após gerar uma lesão de 10 mm no nervo isquiático dos ratos, utilizou-se de um tubo de polietileno poroso, sendo que tais orifícios foram confeccionados para permitirem invasão de capilares sanguíneos. Os animais forma aleatoriamente divididos em dois grupos experimentais e três controles, sendo que os primeiros no qual foram adaptados os tubos, um com preenchimento de gordura autóloga e o outro sem preenchimento. Nos controles houve a subdivisão em inicial, desnervado e final. Próximo da data do sacrifício, 150 dias de pós-operatório, os animais foram submetidos a análise funcional por meio do footprint, que demonstrou que o grupo controle sem preenchimento apresentou melhores resultados quando comparados ao grupo com gordura. E, curiosamente, por avaliação morfométrica notou-se superioridade naquele com tecido adiposo. Concluiu-se, dentre outras, que melhores estudos deverão ser realizados para responder essa celeuma (TOLEDO, 2011).

Apesar de inúmeros estudos sobre a utilização tubos artificiais para regeneração de nervos periféricos, o transplante autólogo de nervos permanece

o mais eficaz para a reparação deste tipo tecidual. Para melhorar a técnica da tubulização sintética, os autores examinaram tubos que contêm hidrogel de gelatina como um transportador que permita a liberação prolongada do fator de crescimento de fibroblastos básico (FFb) . Um segmento de 15 mm do nervo isquiático foi ressecado e reparado com nervo autólogo (grupo 1) , um tubo com hidrogel de gelatina e bFGF (grupo 2) , um tubo com FFb sozinho (grupo 3) , ou apenas um tubo (grupo 4) . As análises histológicas e funcionais foram realizados durante 16 semanas após a cirurgia. Quatro semanas após a cirurgia, um número significativamente maior de axônios em regeneração foram detectados no grupo 2 do que nos grupos 3 e 4 , mas a densidade axonal no grupo 2 foi menor do que no grupo 1. De igual modo, os animais do grupo 2 mostraram um desempenho significativamente melhor do que aqueles do motor em os grupos 3 e 4 , mas pior do que aqueles do grupo 1. Os animais dos grupos 1 e 2 apresentaram significativamente melhor recuperação sensorial do que os grupos 3 e 4. O tubo hidrogel de gelatina – com FFb promoveu a regeneração axonal após a lesão do nervo periférico , mas não tão bem como transplantes autólogos (TAKAGI; KIMURA ; SHIBATA; *et al.*, 2012).

Quatro tubos de biomateriais, poliácido láctico-co-ácido glicólico (PLGA), poli fumarato de caprolactona (PCLF) , fumarato de polietileno glicol neutro oligo (OPF) hidrogel ou um oligo carregada positivamente [(polietileno glicol) fumarato] (OPF (+)) hidrogel com PCLF, já foram apontados por ter benefícios para a reparação de nervos. No entanto, nenhuma comparação direta para identificar o melhor material dentre eles foi realizado. Neste estudo os tubos foram implantados no nervo isquiático de ratos, que por sua vez foram quantificadas e comparadas . Usando métodos estatísticos padrões, observou-se que não há diferenças significativas entre os grupos apesar PCLF mostrar uma tendência de melhor desempenho do que os outros. Ficou claro que o tubo PCLF facilitou a regeneração dos nervos em comparação com os outros três. Ao se utilizar este método de comparação, espera-se que outros biomateriais também sejam submetidos a esse mesmo crivo (DALY; KNIGHT; WANG; *et al.*, 2013).

Neste estudo avaliou-se a capacidade de regeneração dos nervos isquiáticos em tubos de quitosana, um polissacarídeo catiônico produzido

através da deacetilação da quitina, encontrado no exoesqueleto de crustáceos, utilizado como cicatrizante, para preencher espaços (15 mm de comprimento) em comparação com tubos de silicone (SIL) e auto enxertos nervosos (AEN). Um total de 28 ratos Wistar Hannover foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos ($n = 7$ cada), em que o nervo foi reparado por tubo SIL, guias de quitosana de baixo ($\sim 2\%$) e médio ($\sim 5\%$) grau de acetilação. Ambos os grupos com tubos de quitosana mostraram grau semelhantes de recuperação funcional, e igual número de fibras nervosas após 4 meses de implantação. Os resultados com tubos de quitosano foram significativamente melhores em comparação com os tubos SIL ($P < 0,01$), mas menor do que com AEN ($P < 0,01$). Em contraste com a AEN em que todos os ratos tiveram efetiva regeneração, tubos de quitosana alcançado 43 e 57% de sucesso, respectivamente, enquanto a regeneração falhou em todos os animais reparados com tubos SIL. Este estudo sugere que os guias de quitosana são promissores condutos para o reparo de nervos periféricos (GONZALEZ-PEREZ; COBIANCHI; GEUNA; *et al.*, 2014).

Outro grande desafio, além do tipo de tubo ou conduíte, é o que vai dentro dele, seja vazio ou com algum componente neurogênico, é motivo de celeuma no mundo científico (TOLEDO, 2011).

Baseado nos estudos desenvolvidos com tubo de colágeno semeado com células-tronco derivadas de pele autólogas (CTDPAs) para preencher lacunas em defeitos de nervo isquiáticos de ratos, apresentou-se um relato de caso descrevendo um uso deste enxerto para a reparação de nervos sensoriais da parte superior do braço de um paciente. No tratamento do paciente, funções motoras e sensoriais do nervo mediano demonstraram recuperação pós-implantação em curso durante o período de acompanhamento. Os resultados indicam que enxerto artificial de tubo de colágeno poderia ser usado para correção cirúrgica de defeitos maiores em grandes lesões de nervos periféricos, aumentando a qualidade de vida dos pacientes (GRIMOLDI; COLLEONI; TIBERIO; *et al.*, 2013).

As células-tronco derivadas de tecido adiposo foram isoladas a partir de ratos e diferenciadas para um tipo célula de Schwann fenótipo *in vitro*. As células diferenciadas (CTDTA) foram submetidos a auto alinhamento em um gel de colágeno de tipo 1 atado, seguido por estabilização para a gerar tecido neural. O

fenótipo pró-regenerativo de dADSCs foi melhorado por este processo, e as colunas de dADSCs alinhados na matriz de colágeno. Folhas EngNT-dADSC foram enroladas para formar construções para reparação de nervos periféricos que foram implantados dentro de conduítes *NeuraWrap* para preencher uma lacuna de 15 mm de nervo isquiático de rato. Após 8 semanas de regeneração foi avaliada por meio de imagens de imunofluorescência e microscopia eletrônica de transmissão e em comparação com conduíte e controles vazios. A proporção de axônios detectados no coto distal foi 3,5 vezes maior em construções contendo EngNT-dADSC do que os controles de tubos vazios. A combinação de tecnologias que podem organizar células terapêuticas autólogas dentro de uma construção de tecido artificiais proporcionam um novo e promissor biomaterial para reparação de nervos periféricos (GEORGIU; GOLDING; LOUGHLIN; et al., 2015).

Células-tronco derivadas de tecido adiposo (CTDTA) é uma fonte acessível de células-tronco adultas que têm gerado considerável interesse como candidatos a transplante autólogo de células e estão atualmente sendo utilizados em ensaios clínicos para uma ampla gama de indicações. Células tronco e células progenitoras geralmente constituem menos do que 5% da população total de células no tecido adiposo, mas este é de 2500 vezes mais do que a frequência destas células na medula óssea (FRASER; WULUR; ALFONSO; et al., 2006; TOLEDO, 2011). A abundância de CTDTA e a capacidade de recolher grandes quantidades de tecido adiposo através lipoaspiração elimina a necessidade de expansão celular. Eles são facilmente acessíveis em grandes quantidades, com pouca morbidade do sítio doador ou o desconforto do paciente. Os estudos experimentais utilizando CTDTA ratos demonstraram que estas células têm a capacidade de se diferenciar ao longo da linhagem de células gliais, o que os torna bons candidatos para utilização como uma alternativa para as células de Schwann de reparação do nervo periférico (KOLAR; KINGHAM, 2014). As propriedades regenerativas destas células têm sido atribuídas à sua secreção de fatores neurotróficos, a sua capacidade para recrutar células de Schwann do hospedeiro para auxiliar o processo de regeneração, a sua possível contribuição direta para formação de mielina e sua

capacidade para aumentar a sobrevivência de neurónios sensoriais e motoras (TOMITA; MADURA; SAKAI, 2013).

2.3.3 – Aplicação da medicina hiperbárica no tratamento de feridas

A Medicina Hiperbárica envolve o tratamento de patologias num meio ambiente com pressão superior à atmosférica. De uma forma mais abrangente, trata-se da área médica que se dedica ao estudo das adaptações fisiológicas, atividades recreativas (mergulho) e profissionais em meios hiperbáricos (em partilha com a Medicina Subaquática); e que estuda, coordena e prescreve a aplicação terapêutica do oxigênio em meio hiperbárico – Oxigenoterapia Hiperbárica (FERNANDES, 2009).

A OTH consiste na administração de uma fração inspirada de oxigênio próxima de 1 (oxigênio puro ou a 100%) num ambiente com uma pressão superior (geralmente duas a três vezes) à pressão atmosférica ao nível do mar. Este aumento de pressão irá resultar num aumento da pressão arterial e tecidual de oxigênio muito significativos (perto de 2000 mmHg e 400 mmHg respectivamente) o que estará na base da maioria dos efeitos fisiológicos e terapêuticos do oxigênio hiperbárico (TIBBELS; EDELSBERG, 1996). Um dos obstáculos à compreensão da OTH tem sido a visão de que se trata de um meio tecnicamente complexo e exigente com o objetivo único de melhorar o transporte de oxigênio. Novos estudos revelam, contudo, que este é apenas um dos aspectos da sua ação, já que está agora bem estabelecido o papel do oxigênio no aumento da expressão de enzimas antioxidativas bem como na modulação da expressão de fatores de crescimento e citosinas.

Segundo a lei de Boyle-Mariotte a pressão e o volume variam em proporção inversa (em temperatura constante). As variações de pressão que se conseguem dentro de uma câmara hiperbárica fazem com que os volumes de todas as cavidades orgânicas aéreas que sejam ou possam estar fechadas (tubo digestório, ouvido, seios perinasais) variem de forma inversa. Todos os objetos ocos sofrerão as mesmas variações de volume. Efeitos sobre a solubilidade em consequência da lei de Henry, ao respirar oxigênio puro em meio hiperbárico

verifica-se um aumento da pressão arterial de oxigênio que pode superar os 2000 mmHg a um valor ambiental de três atmosferas absolutas (ATA). O volume de oxigênio dissolvido e transportado pelo plasma, que é mínimo à pressão atmosférica, aumenta mais de 22 vezes (FERNANDES, 2009). Assim, se calcularmos o conteúdo plasmático de oxigênio (oxigênio dissolvido no plasma), verificamos que, ao nível do mar, a quantidade de oxigênio que o plasma transporta é cerca de 0,3 ml/dl enquanto a 3 ATA, o oxigênio dissolvido é aproximadamente 6 ml/dl. Este último valor é suficiente para os consumos celulares em repouso sem necessidade de qualquer contribuição do oxigênio ligado à hemoglobina.

Quadro 2: Demonstração do conteúdo de oxigênio no sangue com as alterações da pressão atmosférica.

Pressão ATA	1	1	2	3
PaO ₂ (mmHg)	104	673	1433	2193
O ₂ – Oxihemoglobina (ml/100ml)	19,7	20,1	20,1	20,1
O ₂ – Plasma (ml/100ml)	0,3	1,88	3,8	6

Fonte: www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19909659

A despeito dos efeitos bioquímicos e celulares sabe-se que a hipóxia predispõe os tecidos à infecção porque a capacidade fagocítica dos polimorfonucleares neutrófilos num meio hipóxico está diminuída. A OTH, ao reverter a hipóxia tecidual e celular, restaura esta defesa orgânica e aumenta inclusive a capacidade fagocítica sobre algumas bactérias. O oxigênio hiperbárico é ele próprio, bactericida para alguns anaeróbios como o *Clostridium perfringens*, e bacteriostático para algumas espécies de *Escherichia* e *Pseudomonas*. Tem ainda um importante efeito de suprimir a produção clostridial de alfa-toxina. Nos tecidos lesionados hipóxicos a OTH, ao contribuir para a reversão desta hipóxia, estimula também a formação da matriz de colágeno, essencial para a angiogênese e cicatrização. Sabe-se também, que a alternância hiperóxia/normóxia constitui um estímulo angiogênico significativo (HUNT, 1988).

Outro dos efeitos já bem estabelecidos da OTH é o da melhoria da perfusão microvascular. Este efeito estará provavelmente relacionado com um estímulo da síntese de Óxido Nítrico (NO) pelo oxigênio hiperbárico (THOM; FISHER; ZHANG; *et al.*, 2003) Nos tecidos submetidos a isquemia aguda a OTH também demonstrou benefício. De fato, estudos em animais usando modelos de lesão de reperfusão e de enxertos cutâneos registram que a OTH inibe a adesão dos neutrófilos e a vasoconstrição pós-isquêmica.

Com o objetivo de avaliar o efeito da Oxigênio terapia hiperbárica (HBO) na regeneração do nervo em ratos, os nervos isquiáticos desses foram esmagados com alicates. Em seguida, os animais foram divididos em dois grupos nos quais, apenas um deles foi tratado por meio de uma série de exposições de 45 min. a 100 % de O₂ e 3,3 atm de pressão absoluta, durante 0, 4 e 8 horas após a cirurgia e em seguida cada 8 h . A regeneração foi avaliada usando o teste de *Pinch-Reflex* em 3, 4 ou 5 dias após a cirurgia . Os parâmetros avaliados demonstraram que em animais expostos a um tratamento de oxigênio hiperbárica tiveram melhores resultados do que àqueles excluídos da terapia. Outro dado interessante foi que o grupo submetido a pequenos períodos de exposição obtiveram resultados semelhantes aos de tratamento mais longo. Concluiu-se que o tratamento HBO estimula crescimento axonal após uma lesão por esmagamento do nervo (HAAPANIEMI; NYLANDER ;KANJE , *et al.*, 1998).

O oxigênio hiperbárico exerce efeitos comprovadamente benéficos no tratamento de lesões isquêmicas agudas de partes moles e em feridas de difícil cicatrização. Nas lesões neurais por esmagamento, os mecanismos fisiopatológicos assemelham-se aos efeitos dependentes da isquemia tissular. Portanto, a terapia com oxigênio hiperbárico teria participação nos processos de reparação neural, que constitui um dos pontos críticos para a recuperação funcional após as lesões por esmagamento de nervos periféricos. Neste estudo, foram realizadas lesões por esmagamento em nervo isquiáticos de ratos, submetidos à terapia com oxigênio hiperbárico no pós-operatório. Os resultados foram quantificados através de avaliação funcional pelo método de "*walking-track analysis*". Os índices de recuperação funcional observados não diferiram, do ponto de vista estatístico, dos observados no grupo controle. Portanto, verificou-

se que a terapia com oxigênio hiperbárico, no esquema proposto, não teve influência na recuperação funcional após lesões neurais por esmagamento (TUMA; D'AGOSTINO; ARRUNÁTEGUI, *et al.*, 1999).

Quadro 3: Demonstração cartesiana comparativa da recuperação funcional do animal controle e experimental.

Fonte: www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10668277

Estudou-se os efeitos do tratamento com oxigênio hiperbárico no crescimento axonal em nervos isquiáticos de 40 ratos. O nervo isquiático foi seccionado causando um *gap* de 10 mm de comprimento. Em seguida um segmento do lado oposto no mesmo comprimento foi removido servindo de enxerto autólogo e foi imediatamente suturada. No pós-operatório 17 animais foram tratados com 100% de oxigênio a 3,2 atmosferas de pressão absoluta durante 45 minutos e o tratamento foi repetido em quatro e oito horas após a operação e, em seguida, a cada oito horas até a avaliação. Aos sete dias, o crescimento axonal foi avaliado pela coloração imuno-histoquímica de neurofilaments nos enxertos de nervo. O crescimento axonal foi significativamente maior nos animais tratados com oxigênio hiperbárico. Pode-se concluir que a oxigenoterapia hiperbárica pode melhorar a regeneração nervosa em enxertos de nervo isquiático em ratos (HAAPANIEMI; NISHIURA; DAHLIN, 2001).

O tratamento com oxigênio hiperbárico têm sido utilizado clinicamente para tratar uma variedade de doenças, incluindo queimaduras graves e envenenamento por monóxido de carbono, e em ambientes de pesquisa tem produzido resultados promissores. No entanto, estudos examinando modelos de

dor ou lesão do nervo neuropática têm sido limitados às avaliações. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de HBO em dois modelos comuns de dor neuropática, da ligação L5 e lesão por constrição crônica (CCI) do nervo isquiático. Na sequência de manipulações cirúrgicas, os animais que demonstraram hiperalgesia mecânica foram aleatoriamente designados para tratamento HBO, após o qual a sensibilidade mecânica foi avaliada em 15min e pós 6h. Sessões diárias HBO, com avaliações 15 min. pós-tratamento, continuou durante duas semanas. Os resultados indicaram que ambos os modelos, ligação L5 e lesão por constrição crônica (CCI) do nervo isquiático, demonstraram uma melhora significativa na resposta ao tratamento ao longo do período de duas semanas, com os animais recuperando mais rapidamente CCI e mantendo esta durante todo o período de recuperação pós-tratamento. Tratamento com oxigênio hiperbárico parece ser bem-sucedido no alívio da dor neuropática por um período prolongado de tempo, e pesquisas futuras devem ser destinadas a investigar os mecanismos precisos subjacentes a este efeito positivo (THOMPSON; UHELSKI ; WILSON, *et al.*, 2009).

O oxigênio hiperbárico pode aumentar a oxigenação dos tecidos e, portanto, diminuir os efeitos da lesão. Investigou-se se o tratamento com oxigênio hiperbárico afeta a cura do nervo periférico quando os nervos reparados estão sobtensão. Foram utilizados dezesseis ratos Wistar albino. Os nervos isquiáticos dos animais foram seccionados e uma parte 3 milímetros de cada nervo foi excisado. Os animais foram distribuídos em dois grupos: 1) O grupo HBO2 (n = 8), que recebeu a reparação cirúrgica e terapia HBO2; e 2) o grupo controle (n = 8), que recebeu apenas o reparo cirúrgico. A cura do nervo isquiático foi avaliada por estudo histopatológico e estudo eletrofisiológico. Foram utilizados os testes de rastreio de Pillai e Mann -Whitney U- teste para análise estatística. Como resultados no estudo eletrofisiológico não houve diferença entre os grupos. No estudo histopatológico, o número de axônios grupo HBO2 foram significativamente maiores do que no grupo controle (p: 0,008) (OROGLU; TURKER; AKTAS; *et al.*, 2011).

3 – Material e Métodos

3- MATERIAL E MÉTODOS

Para este estudo Randomizado controlado foram utilizados 45 animais (*Rattus Norvergicus*) da linhagem *Wistar*, jovens, machos com 80 dias de idade pesando, aproximadamente 300g, provenientes do Biotério da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo (FOB-USP).

Os animais foram acondicionados em caixas apropriadas recebendo ração e água “*ad libitum*”, sem restrições de movimentos, respeitaram-se os ciclos de 12 horas de luz, além de temperatura constante média de 24°C. A utilização desse tipo de animal, em especial o macho, se deve ao fato da frequência do espécime para estudo da regeneração de nervos periféricos, a exemplo do isquiático.

3.1 – Distribuição dos animais em grupos:

Os 45 animais foram distribuídos em 5 grupos, dos quais três deles controle e dois experimentais. Todos os grupos foram submetidos à imersão em câmara hiperbárica.

3.1.1 – Grupo Controle Inicial (GCI):

Representado por 7 animais, este grupo foi sacrificado aos 80 dias de vida. No procedimento, retirou-se cerca de 10 mm do nervo isquiático para posterior realização da morfometria. Com a avaliação da área, diâmetro das fibras e espessura da bainha de mielina. Estabeleceu-se a partir desse grupo um padrão de comparação inicial.

3.1.2 – Grupo Controle Final (GCF):

Com 7 animais, este grupo foi sacrificado com 150 dias após o início do procedimento (230 dias de vida). Antes da eutanásia houve imersão dos mesmos em câmara hiperbárica. No procedimento, retirou-se cerca de 10 mm do nervo isquiático para posterior realização da morfometria. Com a avaliação da

área, diâmetro das fibras e espessura da bainha de mielina. Estabeleceu-se a partir desse grupo um padrão de comparação final.

3.1.3 – Grupo Controle Desnervado (GCD):

Constituído de 7 animais. Diferentemente dos outros grupos a técnica cirúrgica foi modificada. Aos 80 dias de vida, realizou-se a tricotomia da região do dorsolateral da coxa direita (Fig.4), uma incisão unilateral posterior de aproximadamente 20 mm (Fig.5), divulsionou-se a musculatura para a exposição (Fig.6) e posterior secção do nervo isquiático (Fig.7). Feito isto, a extremidade proximal (Fig. 1) foi suturada na musculatura adjacente, enquanto a distal foi fixada no tecido subcutâneo. Após 150 dias, nova cirurgia foi realizada com incisão similar, entretanto não se localizou qualquer evidencia de regeneração.

Fig. 3: A extremidade proximal (A) foi suturada na musculatura adjacente, enquanto a distal (B) foi fixada no tecido subcutâneo.

3.1.4 – Grupo Experimental Enxerto de Polietileno Poroso sem Preenchimento (GEEP-sp) :

Com 12 animais, este grupo foi operado aos 80 dias de vida com exposição do nervo isquiático do lado direito. Para tanto, utilizou-se microscópio cirúrgico estereoscópio (DF Vasconcelos), removido aproximadamente 10 mm do nervo (Fig.6), o defeito foi preenchido com tubo de polietileno poroso (Fig.7 e 8) sem preenchimento estabelecendo solução de continuidade entre o coto distal e proximal. Após 150 dias do primeiro procedimento, ou seja, com 230 dias de vida, os animais foram novamente operados o tubo foi exposto e seccionado e o cabo de regeneração de seu interior foi removido para avaliação histológica.

3.1.5 – Grupo Experimental Enxerto de Polietileno Poroso com preenchimento (GEEP – cp):

Constituído de 12 animais, similar ao grupo anterior, este se diferenciou apenas pelo fato de ter recebido (Fig.10,11 e 12) preenchimento com gordura autóloga retirada da área adjacente ao nervo (Fig.9). Ademais, todos os procedimentos foram idênticos.

Fig. 4: Tricotomia da região dorsolateral da coxa direita.

Fig.5: incisão unilateral posterior de aproximadamente 20 mm.

Fig.6: Exposição do n. isquiático.

Fig.7: Secção do nervo isquiático.

Fig.8: Removido aproximadamente 10 mm do nervo.

Fig.9: O defeito foi preenchido com tubo de polietileno poroso.

Fig.10: O defeito foi preenchido com tubo de polietileno poroso.

Fig.11: Gordura autóloga retirada da área adjacente ao nervo.

Fig.12: Tubo recebendo a gordura autóloga.

Fig.13: Acomodação da gordura autóloga na parede lateral do tubo de polietileno.

Fig.14: Aspecto final da instalação do tubo com preenchimento.

3.2 – Aspectos morfológicos do Tubo de Polietileno Poroso:

Baseado em experimentos realizados pelo mundo, além da experiência vivenciada em pesquisa anterior, o tubo foi confeccionado com objetivo de auxiliar a penetração de capilares sanguíneos, daí os poros, para não tencionar os cotos nervosos o que estaria indo contra a orientação de não exercer tensões nos cabos de regeneração, o mesmo foi confeccionado com 12 mm de comprimento (Fig. 13, 14 e 15). O tubo desenvolvido pela ENGIMPLAN (Engenharia de Implantes) teve obedecido aos princípios estabelecidos pelas características demonstradas na figura esquemática a seguir:

Fig.15: Demonstração esquemática do tubo de polietileno poroso.

Fig.16: Demonstração esquemática do tubo de polietileno poroso sob outro aspecto.

Fig.17: Aspecto comparativo do tubo de polietileno poroso à lâmina de bisturi número 15.

3.3 – Aspectos cirúrgicos e respectiva coleta das amostras:

Após pesados, os animais foram submetidos à anestesia geral através de injeção intramuscular de Cloridrato de Tiletamina, associado com Cloridrato de Zolazepam (50 mg / Kg) coxa esquerda. Seguiu-se com tricotomia da face dorsolateral do membro pélvico direito (Fig.2), em todos os grupos acompanhados por cuidados antissepsia da pele. Utilizou-se de instrumental para microcirurgia, devidamente esterilizado e auxiliado de microscópio cirúrgico estereoscópio (DF Vasconcelos).

O operador, devidamente treinado, foi o mesmo para todas as cirurgias. Para os grupos controles (GCI e GCD) manteve-se os animais em decúbito ventral, suas patas foram fixadas no leito de cortiça com auxílio de fitas adesivas, a incisão estendeu-se longitudinalmente na face lateral e dorsal da coxa direita, em comprimento de, aproximadamente 2 cm (Fig.3). Após a divulsão dos planos musculares, localizou-se o nervo isquiático (Fig.4). Retirou-se um fragmento (GCI) fixando-o em Karnovsky, para posterior avaliação microscópica. Já em outro (GCD), não houve coleta, conforme descrição já

anteriormente realizada. É necessário compreender que o GCF não foi manipulado nesse primeiro ato operatório.

Já os grupos experimentais (GEEPsg e GEEPcg) obedeceram a mesma sequência operatória, diferenciando apenas pelo fato de que após o momento da exposição e lesão cirurgicamente provocada (neurotmese) tiveram a colocação de tubo de polietileno poroso sem preenchimento (GEEPsg) para um e colocação de gordura autóloga (GEEPcg) para outro. Tal material foi cuidadosamente suturado em suas extremidades ao perineuro do nervo com fio Nylon 10.0.

Por ultimo o GCF teve atenção cirúrgica ao final do experimento, como descreveremos adiante.

3.4 – Protocolo de Imersão na câmara Hiperbárica:

Todos os animais, exceção feita ao primeiro grupo (GCI) foram inseridos em um protocolo de imersão em câmara hiperbárica (Fig. 15 e 16). O mesmo respeitou as condutas estabelecidas pelos responsáveis do aparelho. Os ratos foram acondicionados em caixas (Fig. 17) previamente adaptadas para o procedimento. Entre suas principais e importantes características foram que um orifício de entrada, para colocação da cânula de oxigênio puro e na outra extremidade um outro orifício de saída. Para este, em especial, confeccionou-se um diafragma dificultando a livre dispersão dos gases ali condicionados, de modo a simular o que seria uma máscara de oxigênio convencional. As caixas tinham maravalha e durante a pesquisa a câmara ficou escura e silenciosa.

As sessões de imersão foram num total de 10 consecutivas, cada uma num tempo de 1h 15 min. cada. Notou-se após as imersões que as caixas apresentavam as tampas molhadas. Os animais aparentemente calmos sem quaisquer alterações dignas de nota.

Fig.18: Profissional responsável gerenciando painel de controle da câmara hiperbárica.

Fig.19: Porta principal da câmara hiperbárica, pela qual há entrada dos pacientes para as sessões.

Fig.20: Caixas com os animais depositadas no chão. Notar as mangueiras pelas quais passa o oxigênio.

3.5 – Análise funcional - Catwalk:

Uma semana antes da coleta das amostras (sacrifício) os animais foram submetidos a teste funcional no Departamento de Ciências Biológicas, Disciplina de Anatomia da Faculdade de Medicina da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), por meio do *Catwalk*. Quatro animais de cada grupo experimental (GEEPsg e GEEPcg) e três animais de cada grupo controle (GCF e GCD) foram aleatoriamente selecionados para o exame num total de 12 animais avaliados. Colocados em uma passarela (Fig. 18, 19 e 20)

especialmente desenvolvida, puderam ser aferidas intensidades das pegadas, qualidade das passadas e compará-las ao grupo controle final normal.

Fig.21: Avaliação da marcha dos animais (*Catwalk*).

Fig.22: Imagem aproximada da passarela de vidro por onde foram coletadas as imagens e processadas as informações das passadas

Fig.23: Animal aleatoriamente selecionado durante o exame.

3.5.1 - Características do equipamento - Catwalk:

A passarela XT ou *CATWALK XT* é uma ferramenta completa para análise de marcha automática de roedores. O sistema possui um corredor que direciona e limita a liberdade de movimento, para uma linha reta (Fig.20). Feita de vidro temperado com tecnologia que permite a iluminação das pegadas, graças às cores feitas sobre o teto (luz vermelha) e sobre o chão (verde). Apresenta uma câmera filmadora e fotográfica fixada a 56 cm abaixo da plataforma de vidro e um software XT para a gravação e análise automática da capacidade locomotora dos roedores.

3.5.2 – Análise avançada da marcha:

Devido à resolução e tecnologia *Footprints*, o *software XT Catwalk* pode identificar mudanças sutis nas dimensões, posição e tempo de cada pegada. Numerosos parâmetros são calculados para análise qualitativa e quantitativa de passos individuais e da marcha. Tais como: área de impressão, de freio, duração da fase de propulsão, ciclo de trabalho, intensidade, distâncias entre pegadas, base de apoio, o comprimento do passo, a distância entre as impressões ipsilaterais, cadência, velocidade, entre outros.

Passarela XT pode ser utilizada para avaliar qualquer tipo de modelo ou procedimento experimental que tem um efeito sobre a capacidade locomotora dos roedores. Não importa se a marcha é afetada devido à genética, química ou de danos físicos para o sistema nervoso central, sistema nervoso periférico, ou funcionamento esquelético ou músculo.

A corrida dos animais deve demorar entre 0,5 a 8,0 segundos cada e deve-se realizar 4 delas, isto para que o equipamento consiga registrar os dados da pegada.

4 - Resultados

4 – RESULTADOS

4.1 – Avaliação Macroscópica

Nos grupos experimentais (GEEPsg e GEEPcg) e no controle (GCD) notou-se paralisia da pata direita, dos membros que sofreram as intervenções. Lesão semelhante à denominada “*Waiter’s tip hand*” ou mãos de garçom. Observou-se, inclusive, autofagia (Fig.21) em alguns animais. Outro fato curioso foi que uma semana após a realização do protocolo de imersão na câmara hiperbárica, verificou-se a presença do crescimento acentuado de pêlos na região da tricotomia na face dorsolateral da coxa direita.

Finalmente, em nenhum dos grupos estudados, tanto controles quanto os experimentais, ocorreu exposição do tubo, deiscência de sutura, sinais flogísticos ou quaisquer anormalidades.

4.2 – Coleta das amostras:

Para a coleta das amostras seguimos o mesmo protocolo das cirurgias anteriores, diferenciando apenas no comprimento da incisão para retirada do material, que passou a ser praticamente o dobro da inicial.

Na maioria dos procedimentos de coleta, durante a exposição do tubo de polietileno visualizou-se a presença de tecido fibroso cicatricial (Fig.22 e 23) a envolvê-los. Foram cuidadosamente removidos preservando a integridade da amostra. Macroscopicamente, não houve diferença no comprimento dos nervos do grupo experimental quando comparado ao controle, todavia essa diferença foi evidente ao analisar a musculatura na região perna dos animais, que no grupo experimental aparentava sinais evidentes de atrofia.

Por tratar-se de material não reabsorvível houve necessidade de remoção cautelosa sem ferir o cabo de regeneração no interior de sua luz, o que foi feito sem qualquer intercorrência. Ao se retirar as amostras dos tubos verificou-se a invasão capilares nos poros dos tubos além de tecido conjuntivo. A comprovação da primeira assertiva se deve ao fato de que ao se seccionar o tubo para coleta do cabo de regeneração notamos discreta hemorragia.

Outro fato importante durante a coleta das amostras é que nenhum dos tubos apresentou-se colabado, deslocado do seu sitio de instalação ou com algum sinal de danificação.

Fig.24: Autofagia no dedo da pata direita do grupo controle desnervado (GCD)

Fig.25: Demonstração da presença de tecido fibroso cicatricial.

Fig.26: Tubo de polietileno contendo cabo de regeneração. Note os pontos com fio 10.0 fixando os cotos no interior do mesmo.

4.3 – Avaliações Histológicas:

Associado aos nervos regenerados notou-se grande quantidade de tecido conjuntivo denso na periferia dos fascículos nervosos. Quanto ao aspecto morfológico das fibras notamos heterogeneidade no diâmetro das mesmas. A coloração com azul de toluidina mostrou-se eficaz para impregnar as fibras, notou-se coloração homogênea em todo corte (fig.: 24).

Fig. 27: Corte histológico do nervo isquiático do GEEP-CP, em aumento de 100x, demonstrando a homogeneidade da coloração.

Fig.28: Corte histológico do nervo isquiático do GCF, em aumento de 400X nota-se as fibras mielínicas evidentemente coradas pelo azul de toluidina. Seta demonstrando região paranodal.

4.4 – Avaliação morfométrica dos nervos:

Utilizou-se para o estudo da morfometria dos nervos o *Teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov* e para comparação entre os quatro grupos aplicou-se a *Análise de Variância* e *Teste de Tukey*. Para a comparação dos quatro grupos, sendo dois controles e dois experimentais, adotou-se o nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

Foram mensurados, por apenas um operador devidamente gabaritado e treinado, o Diâmetro da Fibra (DF), Diâmetro do Axônio (DA), Área da Fibra (AF), Área do Axônio (AA), e da subtração dos dois primeiros obteve-se o Espessura da Bainha (EB), e da subtração dos outros dois (Quadros 1 e 2) obteve-se a Área da Bainha (AB).

Quadro 4 : Esquema ilustrativo demonstrando a metodologia adotada para execução da análise morfológica

Fig. 29: Representação gráfica das médias e desvios padrão dos diâmetros das fibras nervosas (n=220).

No que diz respeito ao **diâmetro das fibras do nervo Isquiático** representados na figura 29, nota-se que os grupos experimentais não apresentaram resultados estatisticamente significantes quando confrontados ao entre si.

Quanto ao **diâmetro dos axônios do nervo isquiático** detalhados na figura 30, observa-se que houve diferença estatisticamente significante dos grupos experimentais comparados ao grupo controle final, contudo não se vê diferenças entre os grupos experimentais e o grupo controle inicial.

O resultado da morfometria referente à variável **áreas das fibras nervosas do nervo Isquiático** notado na figura 31 demonstrou que entre os grupos experimentais não houve diferença estatisticamente significante, contudo, o mesmo não se pode dizer quando confrontamos com o grupo controle final. Mas o grupo controle inicial não apresentou diferenças significantes quando analisadas frente aos experimentais.

No que tange a avaliação das **áreas dos axônios do nervo Isquiático**, observado na figura 32, pondera-se que nenhum dos grupos experimentais obteve valor estatisticamente significativo entre si e quando analisados ao grupo controle inicial. Mas é significativa ao grupo controle final.

Fig.30: Representação gráfica das médias e dos desvios padrão dos diâmetros dos axônios (n=220).

apresentou, do mesmo modo diferença estatisticamente significantes entre os grupos experimentais e grupo controle final, mas não se encontrou este dado entre os grupos não controle e o controle inicial.

A **área da bainha de mielina**, resultado da subtração da área da fibra e do axônio, representados na figura 34, mostrou resultados idênticos aos já avaliados.

Fig. 31: Representação gráfica das médias e desvios padrão das áreas das fibras (n=220).

Fig. 32: Representação gráfica das médias e desvios padrão das áreas dos axônios (n=220).

Fig.33: Representação gráfica das médias e desvios padrão das espessuras das bainhas (n=220).

Fig. 34: Representação gráfica das médias e desvios padrão das áreas das bainhas (n=220).

4.5 – Avaliações funcionais:

A avaliação funcional, o *Catwalk* foi realizado na Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), no Departamento de Ciências Biológicas, Disciplina de Anatomia, Laboratório de Neurociência.

Para a avaliação da marcha, os animais foram colocados para andar ao longo de uma passarela com um assoalho de vidro (100 cm comprimento x 15 cm largura x 0.6 cm espessura) localizado em uma sala escura. Uma lâmpada fluorescente destacou somente a pressão das patas dos animais em contato com o assoalho de vidro (Fig.:24). O assoalho desse corredor é monitorado por uma câmera equipada com uma objetiva grande angular capaz de detectar a média de intensidade em pixels. A intensidade do sinal variou de acordo com a pressão aplicada pela pata do animal. Quanto maior a pressão exercida pela pata do animal, maior o contato e intensidade em pixels (fig.28). Esses sinais foram digitalizados pelo programa *CatWalk* (Noldus Inc., Holanda).

Inicialmente foram verificados os animais do grupo controle final normal (GCF), estabelecendo-se parâmetros para avaliação dos grupos experimentais.

Para o experimento, aferiram-se as seguintes variáveis: contato máximo, comprimento de impressão, largura de impressão, impressão de área, máxima intensidade, mínima intensidade, intensidade média, entre outras.

Quando comparados ao grupo controle final (GCF) os grupos experimentais apresentaram diferenças estatisticamente significantes. Não foram estatisticamente significantes as diferenças encontradas entre os grupos experimentais com preenchimento e sem preenchimento de gordura autóloga, *especialmente no quesito mínima intensidade*.

Fig.35: Animal do grupo controle final durante exame no *Catwalk XT*. Os destaques em verde são a pata anterior (mão) e posteriores (pés). Notar a extensão normal dos dedos da pata posterior direita, aqui denominada de RH.

Fig.36: Imagem da pegada da pata direita do grupo controle final. Importante observar as impressões dos dedos, com distribuição homogênea da energia da pegada.

Fig.37: Animal do grupo experimental com tubo de polietileno poroso associado com gordura autóloga (GEEPcg). Diferentemente do que ocorreu no grupo controle, observamos o estreitamento da pegada com manutenção da intensidade.

Fig.38: Imagem da pegada da pata direita do grupo experimental enxerto polietileno poroso com preenchimento(GEEPcg), mostrando intensidade da pegada mas não é nítida a distribuição das digitais.

Fonte: <http://www.noldus.com/CatWalk-XT/specifications&prev=search>

Fig.39: Tela demonstrando a captura dos dados da pegada pelo software XT Catwalk.

Fonte: <http://www.noldus.com/CatWalk-XT/specifications&prev=search>

Fig.40: Avaliação das digitais da pegada pelo software XT Catwalk.

4.6 – Câmara Hiperbárica

Além do curioso evento, já referido, do crescimento de pêlos já na primeira semana da utilização da câmara hiperbárica, observou-se rápido processo cicatricial quando confrontado a outros experimentos realizados, sem o uso deste dispositivo.

Ao fim das sessões era comum notar a presença significativa de gotas com características semelhantes a água nas tampas que ocluíam as caixas, além do que a maioria dos animais apresentavam os pêlos relativamente úmidos, resultado de provável sudorese. Numa das imersões, na qual se acompanhou no interior da câmara, junto aos animais, pode-se constatar que os mesmos intercalavam reações de maior e menor agitação, provavelmente associado as pressões atmosféricas variáveis e comuns ao procedimento.

Apesar de ter ocorrido, a autofagia foi notadamente menos significativa para os animais submetidos ao oxigenoterapia do que outros experimentos sua aplicação.

Discussão Discussão **DISCUSSÃO** Discussão *Discussão* Discussão Discussão **Discussão**
Discussão Discussão **DISCUSSÃO** Discussão *Discussão* Discussão Discussão **Discussão**
Discussão Discussão **DISCUSSÃO** Discussão *Discussão* Discussão Discussão **Discussão**
Discussão Discussão **DISCUSSÃO** Discussão *Discussão* Discussão Discussão **Discussão**
Discussão Discussão **DISCUSSÃO** Discussão *Discussão* Discussão Discussão **Discussão**
Discussão Discussão **DISCUSSÃO** Discussão *Discussão* Discussão Discussão **Discussão**
Discussão Discussão **DISCUSSÃO** Discussão *Discussão* Discussão Discussão **Discussão**

5 - Discussão

5 - DISCUSSÃO

Para obter resultados mais confiáveis, algumas variáveis durante o delineamento do projeto mereceram atenção especial, pois são fundamentais para a padronização dos procedimentos. Os processamentos de todas as amostras seguiram protocolos específicos de acordo com a finalidade do material. Para o processamento dos nervos com finalidades morfométricas, seguiu-se o protocolo do laboratório de Patologia da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FOB-USP). Além disso, as experiências prévias obtidas de trabalhos anteriormente desenvolvidos, bem como a infraestrutura do biotério e dos laboratórios onde foram realizadas as técnicas empregadas, contribuíram para obtenção de resultados mais confiáveis.

O SNP estabelece uma via de comunicação entre o SNC e os órgãos (GARTNER, 2006) e exatamente por apresentar esta característica única é que o tema foi merecedor de atenção neste presente trabalho bem como o é de tantos pesquisadores espalhados por todo o mundo.

Os modelos animais que são utilizados para a demonstração de regeneração nervosa são variados e cada espécie apresenta suas peculiaridades (PETERS; PALAY; WEBSTER, 1976; BRAGA-SILVA, 1999; SCHMIDT; LEACH, 2003; LEE; YU; LOWE; *et al.*, 2003; KASRA; JONES; GUPTA, 2004; KALBERMATTEN; ERBA; MAHAY; 2008; ICHIHARA; INADA; NAKAMURA; 2008). O rato *Wistar* possui similaridade com a estrutura e a disposição anatômica dos nervos periféricos quando comparado aos seres humanos e exatamente por esta razão, optou-se por tal modelo animal concordando com a maioria dos artigos consultados.

Os sacrifícios foram realizados aos 180 dias pós-operatório, uma vez que as maiores respostas funcionais e histomorfométricas acontecem até tal período. Após isso, não são encontradas alterações significantes que justifiquem um período superior a este (BARCELOS; RODRIGUES; SILVA, *et al.*, 2003), estando coerente com aos trabalhos encontrados por esta pesquisa.

As células de Schwann, um dos principais constituintes do SNP, são originadas na crista neural, possuem morfologia achatada e núcleo alongado. Sua principal função é a mielinização dos axônios, sendo inclusive

responsável pela classificação das fibras nervosas em tipos I,II,III e IV (ERHART, 1965; LANDON, 1976; PETERS; PALAY; WEBSTER, 1976; LUNN, BROWN, PERRY, 1990; LUNDBORG, 1993; SHORES, 1996; THOMAS, 1996; IDE, 1996; ZOCHODNE, 2000; SEIM, 2002; KASRA; ROWSHAN; JONES, *et al.*, 2004; TALOR, 2006). Sua importância é tamanha que pautou as atenções do presente trabalho em buscar a espessura da bainha de mielina, obtendo resultados sobre o índice de mielinização, que comparando os grupos experimentais e grupo controle inicial, não apresentaram diferenças significantes do ponto de vista estatístico.

Nervos são circundados por três camadas de tecido conjuntivo. A camada mais externa, formada por tecido conjuntivo colagenoso denso é denominada como epineuro e possui vasos, fibroblastos e fibras de colágeno tipo I (RUTKOWSKIL; TUITTE; LINCOLN, *et al.*, 1999; KIEFER; KIESEIER; STOLL; *et al.*, 2001; GARTNER; HIATT, 2006). É nesta porção que se realiza a rafia para fixação de enxertos autólogos (WANG; COSTAS; BRYAN; *et al.*, 1995; BARCELOS; RODRIGUES; SILVA, *et al.*, 2003) e aloplásticos como tubos de polietileno (TOLEDO, 2011), e no caso da pesquisa em questão corroborando com a literatura consultada, foi a região de eleição para a fixação do enxerto de tubo de polietileno poroso, até porque, ao obedecer tais princípios, evita-se impedimentos ao brotamento axonal, bem como formação de neuromas.

As lesões de nervos periféricos estão entre as mais incapacitantes que acometem indivíduos em idade produtiva, em face dos múltiplos aspectos concernentes às sequelas deste tipo de afecção, podendo ser da mais simples como uma neurapraxia a mais complexa como a neurotmeose com perda de substância (SEDDON, 1943; SUNDERLAND, 1978; MILLESI, 1988; GAO; NIKLASON; LANGER, 1998; FERRARI; RODRIGUES; MALVEZZI; *et al.*, 1999; THAPA; MILLER; WEBSTER; *et al.*, 2003; BRUYNS; JAQUET; SCHREUDERS; *et al.*, 2003; OLIVEIRA, 2003; IJKEEMA-PAASSEN ; JASEN ; GRAMSBERGEN, 2004; GARTNER; HIATT, 2006; JOHNSON, SKORNIA, STABENFELDT; *et al.*, 2008; LI; WANG; WEI; *et al.*, 2010; AZIZI; MOHAMMADI; AMINI, 2012). Tendo como objetivo mimetizar situações

parecidas, em termos mais graves, o trauma gerado foi a neurotmele no presente estudo.

A coleta das amostras do nervo ou cabo de regeneração na região do enxerto se deu no terço médio, estando em conformidade com a literatura (RODRIGUES e SILVA, 2001; BARCELOS, 2003).

Quando um axônio é seccionado há um aumento do transporte axonal retrógrado em direção ao corpo celular. Concomitantemente, ocorre diminuição na liberação de fatores neurotróficos, comprometendo o núcleo celular e o decréscimo de transporte anterógrado, com agravamento da lesão distal do nervo, e consequente lesão em receptores de pele, músculos e órgãos-alvo (THOMAS, 1964; PETERS; PALAY; WEBSTER, 1976; LUNDBORG, 1973; SHORES, 1996; MIRSKY; JESSEN, 1996; IDE, 1996; SEIM, 2002). Axônios motores preferencialmente reinervam alvos motores, e a junção neuromuscular, da placa motora, desempenha papel preponderante na transmissão de mensagens do sistema nervoso central para o músculo (ERHART, 1965; MILLESI, 1988; LUNN; BROWN; PERRY, 1990; LINCOLN, *et al.*, 1999; ZOCHODNE, 2000; KIEFER; KIESEIER; STOLL, *et al.*, 2001; KASRA; JONES; GUPTA, *et al.*, 2004; TALOR, 2006; GARTNER; HIATT, 2006). Essas informações estão em acordo com as verificações clínicas da presente tese visto que verificou-se atrofia na musculatura assistida pelo nervo isquiático em todos os grupos experimentais com enxerto de tubo de polietileno poroso, com ou sem colocação de gordura autóloga, bem como no grupo controle desnervado.

Testes de eletroneuromiografia não demonstram confiabilidade, bem como as velocidades de condução e as latências proximais e distais também não refletem efetivo aporte neuronal funcional (SARIGUNEY; YAVUZER; ELMAS; *et al.*, 2008; YAO; WANG; CUI; *et al.*, 2009; DING; LUO; ZHENG; *et al.*, 2010; MADDURI; FELDMAN; TERVOORT; *et al.*, 2010). Além disso, não existe correlação entre nervos periféricos, após reconstrução, mesmo na presença de fibras mielinizadas em grande quantidade e com efetiva demonstração de regeneração observada sob microscopia eletrônica (LANDON; HALL, 1976; GARTNER; HIATT, 2006; FARRAG; LEHAR; VERHAEGEN; *et al.*, 2007; KALBERMATTEN; ERBA; MAHAY; *et al.*, 2008;

TREMP; SCHWABEDISSEN; KAPPOS; *et al.*, 2013; LICHTENFELS; COLOMÉ; SEBBEN; *et al.*, 2013). O presente trabalho, embora tenha dispensado a eletromiografia, aceita a assertiva sobre a aparente falta de correlação dos bons resultados histológicos quando confrontados com as avaliações funcionais, daí a razão de sua observância por meio do *Catwalk*, demonstrando que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais.

É importante perceber que pouco a pouco cientistas do mundo todo estão se preocupando em buscar resultados mais satisfatórios na avaliação clínica da deambulação, a exemplo de afecções do nervo isquiático. Para que sua aferição se torne mais efetiva, afastando a possibilidade de resultados empíricos ou distantes da realidade, esforços em criar técnicas de aferição estão cada vez mais sofisticados. Para o presente estudo, utilizou-se o *Catwalk*, disponível na Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), no departamento de Ciências Biológicas, Disciplina de Anatomia, laboratório de neurociências, ferramenta altamente precisa e confiável para avaliação da passadas dos animais utilizados.

É sabido que a técnica mais indicada para a recuperação nervosa em casos de neurotmele é a técnica de neurorrafia término-terminal (BRUNELLI; VIGASIO; BRUNELLI, 1994; SANDRINI; PEREIRA JUNIOR; GAY-ESCODA, 2007; BUCHAIM; ANDREO; BARRAVIERA; *et al.*, 2015). No entanto por vezes a simples rafia não é possível pela perda de estrutura, com a formação de um *gap*, têm-se a técnica de enxertia autóloga (TERZIS; FAIBISOFF; WILLIAMS, 1975). Esta técnica é capaz de guiar o crescimento axonal e unir as extremidades do coto distal e proximal (SPECTOR; LEE; DERBY; *et al.*, 1993). Entretanto, a aplicação desta terapêutica implica em algumas desvantagens, tais como a necessidade de abordagem de outro sítio cirúrgico, perda de sensibilidade definitiva (anestesia) ou parcial (parestesia) da área doadora, possibilidade de formação de neuroma de amputação na região que recebeu o enxerto, dentre outras. Para evitar essas inconveniências pesquisadores decidiram lançar mão de outros artifícios, como enxertos de veias autólogas (BARCELOS; RODRIGUES; SILVA, *et al.*, 2003; ROSA-JUNIOR, 2010), tubos sintéticos absorvíveis como polietileno, quitosana, tubos

de colágeno, PLGA (BELKAS; MUNRO; SHOICHET; *et al.*, 2005; TOLEDO, 2011; GRIMOLDI; COLLEONI; TIBERIO; *et al.*, 2013; GONZALEZ-PEREZ; COBIANCHI; GEUNA; *et al.*, 2014). Utilizou-se para a pesquisa presente tubo de polietileno poroso, sendo destarte material sintético.

A utilização de tubos sintéticos parece formar uma armação primária para orientar a migração de fibroblastos, células de Schwann e eventualmente processo axonal (BELKAS; MUNRO; SHOICHET ; *et al.*, 2005; TOLEDO, 2011; GRIMOLDI; COLLEONI; TIBERIO; *et al.*, 2013; GONZALEZ-PEREZ; COBIANCHI; GEUNA; *et al.*, 2014). De modo que em nossa pesquisa não verificamos a presença de axônios externamente aos limites dos tubos de polietileno poroso.

Várias técnicas de enxertia para recuperação de nervos periféricos tem se preocupado com a aplicação de fatores neurotróficos no interior dos condutos ou tubos, autólogos ou sintéticos (AZIZI ; MOHAMMADI; AMINI; *et al.*, 2012). Aplicou-se células-tronco derivadas de pele autóloga com resultados dignos de nota (GRIMOLDI; COLLEONI; TIBERIO; *et al.*, 2013). É sabido que o hidrogel de gelatina como um transportador, permite a liberação prolongada do fator de crescimento de fibroblastos básico (bFGF) (TAKAGI; KIMURA ; SHIBATA; *et al.*, 2012; DALY; KNIGHT; WANG; *et al.*, 2013; GONZALEZ-PEREZ; COBIANCHI; GEUNA; *et al.*, 2014). A gordura é uma fonte acessível de células-tronco adultas que têm gerado considerável interesse como candidata a transplante autólogo de células e está atualmente sendo utilizada em ensaios clínicos para uma ampla gama de indicações, ricamente encontrada no sítio cirúrgico (BARCELOS; RODRIGUES; SILVA, *et al.*, 2003; FRASER; WULUR; ALFONSO; *et al.*, 2006; ROSA-JUNIOR, 2010; TOLEDO, 2011; TOMITA; MADURA; SAKAI, 2013; KOLAR; KINGHAM, 2014; GEORGIU; GOLDING; LOUGHLIN; *et al.*, 2015). No presente estudo aplicou-se o uso de tubo de polietileno poroso com preenchimento de gordura corroborando com os últimos autores citados, integrado a utilização de câmara hiperbárica, contrapondo os estudos mencionados no início deste parágrafo. Lançou-se mão também de poros nos tubos facilitando ainda mais a invasão de capilares sanguíneos. Fato este comprovado clinicamente visto que no momento da sua retirada, houve extravasamento de sangue pelos poros.

A neovascularização nos enxertos nervosos é fundamental no processo regenerativo (FERRARI et al., 1999; RODRIGUES e SILVA, 2001). Os vasos no interior dos tubos demonstraram trazer benefícios, sendo potencialmente úteis para a reparação de nervos periféricos em humanos (KAKINOKI et al., 1997). Por estarem de acordo com estas assertivas, nos tubos de polietileno foram realizados poros e estabelecido protocolo de imersão em câmara hiperbárica.

O oxigênio hiperbárico pode aumentar a oxigenação dos tecidos e, portanto, diminuir os efeitos da lesão (OROGLU; TURKER; AKTAS; *et al.*, 2011), melhoria da perfusão microvascular e a utilização da Oxigênio Terapia Hiperbárica (OTH) inibe a adesão dos neutrófilos e a vasoconstrição pós-isquêmica (THOM; FISHER; ZHANG; *et al.*, 2003). Investigou-se se o tratamento com oxigênio hiperbárico afeta a cura do nervo periférico quando os nervos reparados estão sob tensão (THOM; FISHER; ZHANG; *et al.*, 2003). Nos tecidos submetidos à isquemia aguda a OTH também demonstrou benefício (HAAPANIEMI; NYLANDER ; KANJE, *et al.*, 1998; THOMPSON; UHELSKI ; WILSON, *et al.*, 2009). A presente tese, com o objetivo de investigar a colaboração da câmara hiperbárica na regeneração de nervos periféricos, em especial o nervo isquiático de ratos, aplicou a OTH no pós-operatório imediato dos grupos controle final e desnervado, além do seu uso nos grupos experimentais com enxerto de tubo de polietileno poroso com e sem preenchimento. Obtiveram-se resultados satisfatórios do ponto de vista histológico, uma vez que os grupos experimentais não apresentaram diferença estatisticamente significativa com o grupo controle inicial. Já do ponto de vista funcional, verificado por meio do *Catwalk*, observou-se que entre os grupos experimentais não houve diferença estatisticamente significativa. Um fato interessante observado foi o crescimento de pêlos no sítio cirúrgico, com aparente influência da oxigenoterapia.

Realizou-se lesões por esmagamento em nervo isquiáticos de ratos, submetidos à terapia com oxigênio hiperbárico no pós-operatório. Os resultados foram quantificados através de avaliação funcional pelo método de "*walking-track analysis*". Os índices de recuperação funcional observados não diferiram, do ponto de vista estatístico, dos observados no grupo controle.

Portanto, verificou-se que a terapia com oxigênio hiperbárico, no esquema proposto, não teve influência na recuperação funcional após lesões neurais por esmagamento (TUMA; D'AGOSTINO; ARRUNÁTEGUI, *et al.*, 1999). Este trabalho discorda do modelo que foi proposto, visto que demonstrou resultados positivos da utilização da OTH, muito embora ter se apoiado em um tipo diferente de trauma, a neurotmease, que trata-se de lesão aparentemente mais grave do que a do estudo mencionado.

Nas observações histológicas do terço médio dos enxertos e do coto distal, de todos os grupos, constatou-se a presença de fibras nervosas mielínicas heterogêneas, a neoformação de perineuro e a organização intraneural de fascículos com tamanhos e números variados concordando com os autores consultados (BARCELOS; RODRIGUES; SILVA, *et al.*, 2003).

Neste experimento, notou-se axônios em regeneração, em todos os animais de todos os grupos experimentais. Certamente os axônios cresceram do coto proximal do nervo isquiático, atravessaram o espaço intersegmentar e atingiram o coto distal deste nervo, pois, em todas as variáveis analisadas foram maiores os parâmetros no terço médio do enxerto do que na região do coto distal.

Levando em conta a análise funcional dos nervos estudados, verificou-se que não houve diferença estatisticamente relevante entre os grupos GEEPsg e GEEPcg, fato não encontrado em outra pesquisa (TOLEDO, 2011) que teve o grupo com enxerto de polietileno poroso sem preenchimento valores mais significativos ao com enxerto de gordura autóloga. Duas possíveis hipóteses são sugeridas para explicar tal contradição. A primeira trata-se do mecanismo de avaliação funcional que no primeiro foi o *footprint*, que apesar de possuir qualidades é método defasado e impreciso; o segundo aspecto pode ser considerado a grande contribuição dada pela câmara hiperbárica que fez que os resultados dos grupos experimentais aproximassem seus valores que tornaram a avaliação funcional, no quesito mínima intensidade, estatisticamente não relevantes.

Na morfometria quando comparamos as variáveis do nervo Isquiático, nota-se que não houve diferença estatisticamente relevante entre os grupos experimentais e estes quando comparados ao grupo controle inicial,

diferentemente do que ocorreu com o grupo controle final concordando com a maioria dos outros experimentos avaliados quanto ao distanciamento do grupo controle final (BARCELOS; RODRIGUES; SILVA, *et al.*, 2003; FRASER; WULUR; ALFONSO; *et al.*, 2006; ROSA-JUNIOR, 2010; TOLEDO, 2011; TOMITA; MADURA; SAKAI, 2013; KOLAR; KINGHAM, 2014; GEORGIU; GOLDING; LOUGHLIN; *et al.*, 2015).

Certamente, existem mais perguntas que respostas para a avaliação da regeneração de nervos periféricos, e é exatamente atrás desses questionamentos que a maioria dos pesquisadores vem se debruçando. Entretanto, atenção especial deve ser dada a utilização de células tronco na regeneração dos tecidos e a aplicação da oxigenoterapia, que parece influenciar positivamente os resultados. A utilização de tubos não biológicos mostrou-se promissora, haja vista que minimiza os traumas cirúrgicos, uma vez que reduz uma abordagem cirúrgica.

6 - Conclusões

A partir dos resultados da presente pesquisa desenvolvido pelo Departamento de Ciências Biológicas, disciplina de Anatomia, podemos concluir que:

- 1) Os resultados morfométricos demonstraram que, os grupos experimentais com e sem preenchimento de gordura tiveram resultados, do ponto de vista morfométrico e funcional sem diferenças estatisticamente significantes, contudo, quando estes foram confrontados ao grupo controle final, apresentaram diferenças estatisticamente significantes;
- 2) Relevando a avaliação funcional, por meio do *Catwalk*, constatou-se que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais, mas teve diferença ao comparar com o grupo controle final;
- 3) Diante das evidências encontradas e apoiados na literatura pode-se concluir que a câmara hiperbárica trouxe resultados positivos verificados pela aproximação dos resultados dos grupos experimentais tanto morfométrica como funcionalmente.

Referências Bibliográficas *Referências Bibliográficas* Referências Bibliográficas Referências
Referências Bibliográficas *Referências Bibliográficas* Referências Bibliográficas Referências
Referências Bibliográficas *Referências Bibliográficas* Referências Bibliográficas Referências
Referências Bibliográfica *Referências Bibliográficas* Referências Bibliográficas Referências
Referências Bibliográficas *Referências Bibliográficas* Referências Bibliográficas Referências
Referências Bibliográficas *Referências Bibliográficas* Referências Bibliográficas Referências
Referências Bibliográficas *Referências Bibliográficas* Referências Bibliográficas Referências

Referências Bibliográficas

REFERÊNCIAS

(Formato Vancouver)

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):71/82.

Barcelos AS, Rodrigues AC, Silva MD, Padovani CR. Inside-out vein graft and inside-out artery graft in rat sciatic nerve repair. *Microsurgery*. 2003;23(1):66-71.

Belkas JS, Munro CA, Shoichet MS, Midha R. Peripheral nerve regeneration through a synthetic hydrogel nerve tube. *Restor Neurol Neurosci*. 2005;23(1):19-29.

Boerema I, Meyne NG, Brummelkamp WK. Life without blood: a study of the influence of high atmospheric pressure and hypothermia on dilution of the blood. *J Cardiovasc Surg* 1960;1:133-146.

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.

Brunelli GA, Vigasio A, Brunelli GR. Different conduits in peripheral nerve surgery. *Microsurgery*. 1994; 15:176-8.

Bruyns CNP, Jaquet J-B, Schreuders AR, Kalmjin S, Kuypers PDL, Hovius SER. Predictors for return to work in patients with median and ulnar nerve injuries. *J Hand Surg* 2003;28:28-34.

Buchaim RL, Andreo JC, Barraviera B, Junior RSF, Buchaim DV, Junior GMR, Oliveira ALR, Rodrigues AC. Effect of low-level laser therapy (LLLT) on peripheral nerve regeneration using fibrin glue derived from snake venom. *Injury*. 2015; 1:16-22.

Chen R, Cohen GL, Hallet M. Nervous system reorganization following injury. *Neuroscience* 2002;111:761-73.

Desola J, Muth CM, Rademacher P, Cuzzocrea S. Bases y Fundamento terapêutico da Oxigenoterapia Hiperbarica. *JANO/Medicina*. 1998; 12 (60), 5-11.

Daly WT, Knight AM, Wang H, Boer R, Giusti G, Dadsetan M, Spinner RJ, Yaszemski MJ, Windebank AJ. Comparison and characterization of multiple biomaterial conduits for peripheral nerve repair. *Biomaterials*. 2013 ;34(34):8630-9.

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.

Eguiluz-Ordoñez R, Sánchez CE, Venegas A, Figueroa-Granados V, Hernández-Pando R. Effects of hyperbaric oxygen on peripheral nerves. *Plast Reconstr Surg*. 2006;118(2):350-7.

Eguiluz-Ordoñez R, Sánchez CE, Venegas A, Figueroa-Granados V, Hernández-Pando R. Effects of hyperbaric oxygen on peripheral nerves. *Plast Reconstr Surg*. 2006;118(2):350-7.

Erhart EA. *Neuroanatomia*. 3 ed. São Paulo: Atheneu; 1965.

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.

Fernandes TD. Hyperbaric medicine. *Acta Med Port*. 2009;22(4):323-34.

Ferrari F, Rodrigues AC, Malvezzi CK, Dal Pai-Siva M, Padovani CR. Comparative study between standart vein graft to repair a sensory nerve in rats. *The Anatomical Record, Part B: The New Anatomist*. 1999;256(3):227-232.

Fraser JK, Wulur IZ, Alfonso MH, Hedrick. Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology. *Trends Biotechnol*. 2006; 24:150–154.

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.

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

Georgiou M, Golding JP, Loughlin AJ, Kingham PJ, Phillips. Engineered neural tissue with aligned, differentiated adipose-derived stem cells promotes peripheral nerve regeneration across a critical sized defect in rat sciatic nerve. *JB. Biomaterials*. 2015; 37:242-51.

Gonzalez-Perez F, Cobiánchi S, Geuna S, Barwig C, Freier T, Udina E, Navarro X. Tubulization with chitosan guides for the repair of long gap peripheral nerve injury in the rat. *Microsurgery*. 2014;34(1): 222-228.

Grimoldi N, Colleoni F, Tiberio F, Vetrano IG, Cappellari A, Costa A, Belicchi M, Razini P, Giordano R, Spagnoli D, Pluderi M, Gatti S, Morbin M, Gaini SM, Rebullà P, Bresolin N, Torrente Y. Stem Cell Salvage of injured peripheral nerve. *Cell Transplant*. 2013;21-30.

Haapaniemi T, Nishiura Y, Dahlin LB. Effects of Oxygen HYPERBARIC TREATMENT IN axonal growth in sciatic nerve grafts from rats. *J Plast Surg Hand surg.* 2001;35(1):7-11.

Haapaniemi T, Nylander G, Kanje M, Dahlin L. Hyperbaric oxygen treatment enhances regeneration of the rat sciatic nerve. *Exp Neurol.* 1998;149(2):433-8.

Hudson TW, Evans GR, Schmidt CE. Engineering strategies for peripheral nerve repair. *OrthopClin North Am.* 2000;31(3):485-98.

Hunt TK. The physiology of wound healing. *Ann Emerg Med* 1988;17:1265-73.

Ide C. Peripheral nerve regeneration. *Neurosci Res.* 1996;25(2):101-21.

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.

Ijckema-Paassen J, Jasen K, Gramsbergen A, Meek MF. Transection of peripheral nerves, bridging strategies and effect evaluation. *Biomaterials* 2004;25(9):1583-92.

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.

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.

Kasra Rowshan, Jones NF, Gupta R. Current surgical techniques of peripheral nerve repair *Operative Techniques in Orthopaedics.* 2004;14(3):163-70.

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.

Kolar MK, Kingham PJ. Regenerative effects of adipose-tissue-derived stem cells for treatment of peripheral nerve injuries. *Biochem Soc Trans.* 2014; 42: 697–701.

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

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.

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.

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

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

Lundborg G, Rosén B. Sensory relearning after nerve repair. *Lancet* 2001;358:809-10.

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.

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. 86.

Millesi H. Technique of peripheral nerve repair. *The Hand*, R.Tubianaed, Volume III, Philadelphia ,W.B. Saunders Company 1988;557-78.

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.

Oroglu B, Turker T, Aktas S, Olgac V, Alp M. Effect of hyperbaric oxygen therapy on tense repair of the peripheral nerves. *Undersea Hyperb Med.* 2011;38(5):367-73.

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

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.

Rosa-Junior, GM. Enxerto venoso preenchido com gordura autóloga no reparo de nervo periférico: Uma nova proposta. (Dissertação), Bauru (SP): Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo; 2010.

Sandrini FAL, Pereira-Junior ED, Gay-Escoda C. *Rev Bras Otorrinolaringol.* 2007; 24(5):864-875.

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

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

Seddon H. Three types of nerve injury. *Brain*. 1943;66:237–88.

Seim III DVM. Pheripheral nerve surgery. In: *Small Animal Surgery*. 2 ed. St. Louis: Mosby; 2002. p. 1336-50.

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.

Spector JG, Lee P, Derby A, Frierdich GE, Neises G, Roufa DG. Rabbit facial nerve regeneration in ngf-containing silastic tubes. *Laryngoscope*. 1993;103:548-58.

Sunderland S. Nerves and nerve injuries. 2 ed. New York: Churchill Livingstone; 1978. p. 133-8.

Takagi T, Kimura Y, Shibata S, Saito H, Ishii K, Okano HJ, Toyama Y, Okano H, Tabata Y, Nakamura M. Sustained bFGF-release tubes for peripheral nerve regeneration: comparison with autograft. *PlastReconstrSurg*. 2012;130(4):866-76.

Talor SM. Distúrbios neuromusculares. In: *Medicina interna de pequenos animais* 3ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2006. p. 1013-25.

Terzis J, Faibisoff B, Williams HB. The nerve gap: suture under tension vs. graft. *Plast Reconstr Surg*. 1975; 56: 166-70.

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.

Thom SR, Flsher D, Zhang J. Stimulation of perivascular nitric oxide by oxygen. *Am J Physiol* 2003;284:1230-9

Thomas PK. Changes in the endoneurial sheaths of peripheral myelinated nerve fibres during wallerian degeneration. *J Anat*. 1964;98:175-82.

Thompson CD, Uhelski ML , Wilson JR , Fuchs PN. Tratamento com oxigênio hiperbárico diminui a dor em dois modelos de lesão de nervo.. *Neurosci Res*. 2010; 66 (3): 279-83.

Tibbels PM, Edelsberg JS: Hyperbaric-oxygen therapy. *N Engl J Med*.1996;334:1642-8.

TOLEDO GL. Enxerto com tubo de polietileno poroso preenchido com gordura autóloga no reparo de nervo periférico: uma nova proposta [Dissertação]. Bauru (SP): Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo; 2011.

Tomita K, Madura T, Sakai Y, Yano K, Terenghi G, Hosokawa K. Glial differentiation of human adipose-derived stem cells: implications for cell-based transplantation therapy. *Neuroscience*. 2013;236:55–65.

Trempp 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.

Tuma Júnior P, Dias MD, Arrunátegui G, Duarte GG, Wada A, Cunha AS, Ferreira MC. Effect of hyperbaric oxygen on the regeneration of experimental crush injuries of nerves. *Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo*. 1999;54(3):81-4.

Yao L, Wang S, Cui W, Sherlock R, O'Connell C, Damodaran G. Effect of functionalized micropatterned PLGA on guided neurite growth. *Acta Biomater*.2009;5(2):580-8.

Wall JT, Xu J, Wang X. Human brain plasticity: an emerging view of the multiple substrates and mechanisms that cause cortical changes and related sensory dysfunctions after injuries of sensory inputs from the body. *Brain Res Rev* 2002;39:181-215.

Wang KK, Costas PD, Bryan DJ, Eby PL, Seckel BR. Inside-out vein graft repair compared with nerve grafting for nerve regeneration in rats. *Microsurgery*. 1995;16(2):65-70.

Zamboni WA, Brown RE, Roth AC, Mathur A, Stephenson LL. Functional evaluation of peripheral-nerve repair and the effect of hyperbaric oxygen. *J Reconstr Microsurg*. 1995;11(1):27-9.

Zochodne DW. The microenvironment of injured and regenerating peripheral nerves. *Muscle Nerve Suppl*. 2000;9:33-8.

Universidade de São Paulo Faculdade de Odontologia de Bauru

Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

CEEPA-Proc. Nº 021/2013

Bauru, 28 de junho de 2013.

Senhor Professor,

O projeto de pesquisa encaminhado a esta Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais, denominado **Enxerto com tubo de polietileno poroso preenchido com gordura autóloga no reparo de nervo periférico associado com protocolo de imersão em câmara hiperbárica**, de autoria de Gustavo Lopes Toledo, sob sua orientação, foi enviado ao relator para avaliação e considerado **APROVADO COM RECOMENDAÇÃO** em reunião desta Comissão realizada no dia **17 de junho de 2013**.

Análise e parecer do relator:

"... Os procedimentos estão de acordo com as normas éticas na experimentação em animais vigente, no entanto faz-se necessário a modificação das etapas do cronograma da pesquisa, uma vez que seu início está anterior à aprovação desta Comissão."

Diante do exposto, solicitamos as providências necessárias e retorno para nova análise desta Comissão.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Luís Antônio de Assis Taveira,

Vice-Presidente da Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais, em exercício

Prof. Dr. Antonio de Castro Rodrigues

Dócente do Departamento de Ciências Biológicas

Universidade de São Paulo Faculdade de Odontologia de Bauru

Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

CEEPA-Proc. Nº 021/2013

Bauru, 20 de agosto de 2013.

Senhor Professor,

Informamos que após o envio da documentação solicitada, o projeto de pesquisa encaminhado a esta Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais, denominado **Enxerto com tubo de polietileno poroso preenchido com gordura autóloga no reparo de nervo periférico associado com protocolo de imersão em câmara hiperbárica**, de autoria de Gustavo Lopes Toledo, sob sua orientação, foi novamente analisado e considerado **APROVADO**, em reunião realizada no dia **19 de agosto de 2013**.

Solicitamos que qualquer alteração na pesquisa seja comunicada a esta Comissão, e que, ao final seja enviado um Relatório com os resultados obtidos, para análise ética e emissão de parecer final, o qual poderá ser utilizado para fins de publicação científica.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Gustavo Pompermaier Garlet

Presidente da Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

Prof. Dr. Antonio de Castro Rodrigues

Docente do Departamento de Ciências Biológicas