**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU**

CARINA GUIMARÃES DE SOUZA MELO

**Enxerto sintético e biológico, com e sem preenchimento de veia
jugular externa, no reparo de nervo periférico em ratos**

BAURU

2011

CARINA GUIMARÃES DE SOUZA MELO

**Enxerto sintético e biológico, com e sem preenchimento de veia
jugular externa, no reparo de nervo periférico em ratos**

Dissertação apresentada a Faculdade de
Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Mestre em Ciências no
Programa de Ciências Odontológicas Aplicadas, na
área de concentração de Estomatologia e Biologia
Oral

Orientador: Prof. Dr. Antonio de Castro Rodrigues

BAURU

2011

M491e Melo, Carina Guimarães de Souza
 Enxerto sintético e biológico, com e sem
 preenchimento de veia jugular externa, no reparo de
 nervo periférico em ratos/ Carina Guimarães de Souza
 Melo – Bauru, 2011.
 161 p. : il. ; 31 cm.

 Dissertação (Mestrado) – Faculdade de
 Odontologia de Bauru. Universidade de São Paulo

 Orientador: Prof. Dr. Antonio de Castro Rodrigues

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

Assinatura:

Comissão de Ética no Ensino e
Pesquisa em Animais da FOB-USP

Protocolo n°: 020/2009

DEDICATÓRIA

A DEUS

Por estar presente em minha vida, por me guardar todos os dias, por ter guiado os meus passos, por toda a provisão e por permitir que eu chegasse até aqui.

Ao Meu Marido, Renato

Que sempre foi incansável. Por todo amor, dedicação e apoio em todos os momentos, sem o qual seria impossível essa conquista.

Aos Meus Pais, Dario e Maria Lúcia

Por uma vida inteira juntos. Que sempre lutaram por mim, com muito amor e respeito, e que me deram apoio em todos os momentos.

Aos meus irmãos, Ulisses e Caio

Por todo apoio e por muitos momentos felizes juntos.

À minha cunhada, Fernanda

Pelo seu amor, amizade, ajuda e apoio em tantos momentos.

Ao meu sobrinho, João Pedro

Por ter me proporcionado muitos momentos de alegria.

A todos meus amigos e familiares

Pela ajuda não somente na execução deste trabalho, mas também pelo amor, carinho e atenção.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao meu Orientador, **Prof. Dr. Antonio de Castro Rodrigues**, por compartilhar seus conhecimentos, pelo aprendizado recebido a respeito da prática do ensino, mas, especialmente, pelos anos de atenção e amizade em que pude aprender não somente sobre a linha de pesquisa, mas sobre valores que transcendem o profissionalismo, e que sobremaneira carregarei sempre comigo. Para agradecer por tudo, me faltam palavras. Fica o meu reconhecimento e eterna admiração.

Ao amigo **André Luis Shinohara**, não somente pela ajuda na parte prática desse mestrado, mas também pela amizade e companheirismo em tantos projetos e nas intermináveis viagens para Maringá.

À minha querida amiga **Maira Cristina Couto**, técnica do laboratório de Histologia da Universidade do Sagrado Coração, pela atenção, amizade e pelos bons momentos juntas enquanto preparávamos as intermináveis lâminas histológicas, sem a qual teria sido impossível concluir esse trabalho.

À minha querida amiga e orientadora do curso de Especialização em Anatomia da UEM, **Profa. Msc. Juliana Vanessa C. Martins Perles**, pela amizade, companheirismo, atenção e por todos bons momentos em que estivemos juntas, durante a especialização e em outros trabalhos.

Aos meus queridos amigos, **Bruna, Carol, Otávio, Thaís, Élcia, Maria Cecília, Josilene e Sandra** pela amizade, atenção e apoio em todos os momentos.

*Aos meus queridos amigos de Maringá, **Lilian, Pedro e Lia**, pela recepção, amizade, atenção e pelos bons momentos juntos.*

*Ao **Prof. Dr. Jesus Carlos Andreo** e ao **Prof. Dr. João Lopes de Toledo Filho**, por me permitir utilizar as dependências e os equipamentos da Disciplina de Anatomia.*

*À **Profª. Drª. Marília Afonso Rabelo Buzalaf**, pela generosidade, amizade, convivência e por me permitir utilizar o laboratório da Disciplina de Bioquímica.*

*À **Profª. Drª. Mariza Akemi Matsumoto**, pela generosidade, amizade, convivência e por me permitir utilizar o laboratório da Disciplina de Histologia da Universidade do Sagrado Coração.*

*À **Lourdes Maria Araújo Quaresma de Camargo (Zizi)**, da empresa **BAUMER®** por toda a atenção, delicadeza e disponibilidade em me atender.*

*A todos os **Professores do Departamento de Ciências Biológicas** pelo aprendizado e convivência durante o curso.*

*A todos meus irmãos em Cristo da **Igreja Cristã Renovada**, que oraram por mim em tantos momentos.*

*A todos os professores do Curso **RHEMA – BRASIL**, pelos ensinamentos da Palavra de Deus, que tenho aplicado em todos os momentos da vida.*

AGRADECIMENTOS

*Inicialmente agradeço à **CAPES**, por ter me concedido a Bolsa de Estudos que viabilizou a minha dedicação total ao Mestrado.*

*À **Faculdade de Odontologia de Bauru**, pela oportunidade de concluir minha pós-graduação e pela estrutura oferecida durante todo o curso.*

*À Empresa **BAUMER®**, por ter cedido generosamente os materiais que viabilizaram a realização deste trabalho.*

*Aos colegas de pós-graduação **Bruna, Bruno, Ricardo, Carlos Eduardo, Elington, Camila e Elizandra**, pela atenção e amizade.*

*Aos funcionários da Disciplina de Anatomia, **Cisira** (in memorian), **Creusa, Lourisvalda** (Lô), **Orivaldo e Romário**, pela ajuda, carinho e amizade.*

*Às funcionárias da Disciplina de Histologia, **Daniela e Tânia**, pela ajuda e disponibilidade.*

*Às funcionárias da Disciplina de Bioquímica, **Aline, Thelma e Larissa**, pela ajuda e disponibilidade.*

*Ao funcionário da Disciplina de Endodontia, **Edimauro de Andrade**, pela ajuda, amizade e disponibilidade.*

*À secretária **Vera Lúcia**, secretária do Departamento de Ciências Biológicas, pela atenção, ajuda e disponibilidade.*

*Aos funcionários da Biblioteca **Maristela Petenuci Ferrari** e **José Roberto Plácido Amadei**, pela atenção, disponibilidade e ajuda na formatação dessa dissertação.*

Aos funcionários da secretaria de Pós-graduação, do Biotério Central e da Biblioteca pela atenção e disponibilidade.

“Ainda que eu tenha o dom de profetizar e conheça todos os mistérios e toda a ciência; ainda que eu tenha tamanha fé, a ponto de transportar montes, se não tiver amor, nada serei.”

1 Coríntios 13.2

RESUMO

Apesar do desenvolvimento da tecnologia envolvendo o campo da regeneração em nervos periféricos, ainda não existe uma técnica para recuperação do tecido nervoso que apresente resultados totalmente satisfatórios, fato que desperta o interesse de vários pesquisadores em todo mundo e representa um desafio para os cirurgiões que realizam procedimentos reconstrutivos e estéticos. Embora o enxerto autólogo de nervo seja a melhor alternativa para a recuperação de nervos periféricos lesados, as técnicas que envolvem o reparo tubular têm alcançado excelentes resultados através da utilização de materiais sintéticos e biológicos, sob a forma de tubos, no reparo de extensos segmentos nervosos. Hoje, através dos avanços da engenharia tecidual, novos materiais estão em desenvolvimento, com o objetivo de aliar características microscópicas às técnicas cirúrgicas existentes. O colágeno, que é sabidamente um elemento promotor da proliferação celular e do reparo tecidual, tem sido amplamente utilizado em estudos de regeneração nervosa. Da mesma maneira, o ácido poli-láctico-poli-glicólico (PLGA), um copolímero sintético, tem apresentado algumas características favoráveis ao processo de regeneração, como biocompatibilidade e propriedades mecânicas adequadas. Com o propósito de facilitar a regeneração nervosa quando ocorre perda tecidual, uma técnica já difundida pode ser destacada: o enxerto de veia invertida, em que a veia jugular externa é utilizada ao avesso, funcionando como um tubo, criando um microambiente para a regeneração nervosa, através da exposição de elementos fundamentais da camada mais externa do vaso (túnica adventícia). Neste trabalho, agregamos como diferencial a utilização de dois tipos de membranas, especialmente desenvolvidas para fins odontológicos, que visam neoformação óssea, em um estudo que visa à regeneração de um nervo periférico misto, o nervo isquiático. As membranas de colágeno e PLGA foram colocadas na região do enxerto, sob a forma de tubo, com o objetivo de recuperar um segmento de 10 mm do nervo referido. E, por fim, aliamos a utilização de um segmento de 5 mm da veia jugular externa como tecido de preenchimento dos tubos feitos com as membranas, na tentativa de verificar a eficácia das moléculas biológicas presentes neste vaso, porém agora sendo utilizadas diretamente dentro do enxerto. Após um período de 6 semanas, o grupo que apresentou o melhor resultado foi aquele em que foi utilizada a membrana de colágeno, na forma de tubo, preenchida com a veia

jugular externa. Nesse grupo, o diâmetro médio das fibras mielínicas apresentou um valor médio de 5,8 μm e espessura média da bainha de mielina de 1,65 μm . Para o período de 12 semanas, entre os grupos analisados, o maior valor médio encontrado para o diâmetro foi de 5,64 μm e 1,31 μm para a espessura, sendo que este resultado foi apresentado pelo grupo em que se utilizou a membrana de PLGA sem preenchimento com a veia jugular. Embora os valores não sejam muito inferiores, nos dois períodos, ficaram abaixo dos valores encontrados nos grupos controle normais. Em suma, acreditamos que as membranas de colágeno e PLGA, associadas à técnica de tubulização, apresentam grande potencial para serem utilizadas na regeneração de nervos periféricos.

Palavras-chave: Nervo periférico. Regeneração. Membranas. Colágeno. PLGA. Tubulização.

ABSTRACT

Syntetic and Biological graft, filled with the external jugular vein in the repair of peripheral nerve in rats

Despite the development of technology involved in peripheral nerve regeneration, there is no technique that presents a recovery of the nervous tissue with completely satisfactory results. This fact arouses interest of several researchers around the world. Although the autologous nerve grafting is the current gold standard for the repair of large nerve gaps, over the past decades the development of artificial nerve conduits has therefore been of great interest due to the excellent results achieved. Through the advances in tissue engineering, new materials, synthetic and biological, have been used for construct nerve guides. The collagen is one of the oldest natural polymers used as a biomaterial, and it is known as a promoter of cell proliferation and of tissue repair. In the same way, the synthetic copolymer, poly lactic-co-glycolic acid (PLGA), have been used for nerve regeneration, and it have shown some favorable characteristics to nerve repair such as stability, biocompatibility, and mechanical properties. With the purpose of facilitating the regeneration in large nerve gaps, the inside-out vein graft is a widespread technique, where the vein works as a conduit, and it provides a good microenvironment for axon regeneration through the exposition of some primordial elements of its adventitial layer. In this work, we join as a differential the use of two materials, specially developed for dental purposes, which are normally used to facilitate the osteogenesis, in a nerve regeneration study. We performed the surgical procedures in the sciatic nerve, with two types of membranes (PLGA and collagen), which were used as tubes, in order to promote the regeneration of this nerve. The collagen and PLGA membranes were used with the objective of a recovery in a 10-mm sciatic nerve gap model. These tubular implants were filled with a 5 mm segment of the jugular vein in order to verify the effectiveness of some biological molecules of the adventitia layer in the nerve regeneration. After 6 and 12 weeks the graft and the distal stump were observed under light microscopy. In each studied period, the diameters of the myelin fibers, and the thickness of the myelin sheaths of the regenerated axons were measured. After 6 weeks, the group which presented the best result was the group with the collagen membrane tube filled with the external jugular vein. In this group the diameter of the myelin fibers presented an average

value of 5.8 μm and an average value of the thickness of the myelin sheaths of 1.65 μm . After 12 weeks, between all the groups, the best results were found in the group where the PLGA membrane unfilled with the external jugular vein was used as a nerve guide, which presented the average diameter of 5.64 μm , and the average thickness of 1.31 μm . Although the average values weren't much lower than the values found in the controls, they were beneath than the normal groups. These results proved that the collagen and the PLGA membranes have a great potential to be used as artificial nerve conduits for promoting peripheral nerve regeneration.

Key words: Peripheral Nerve. Regeneration. Membranes. Collagen. PLGA. Tubulization.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

ANEXOS

ANEXO A –	Sutura epineural em dois pontos distintos do nervo isquiático	109
ANEXO B –	Remoção de um segmento de nervo de 10 mm entre as suturas epineurais	111
ANEXO C –	Distância de 10 mm entre os cotos proximal e distal	113
ANEXO D –	Membranas de colágeno passadas por baixo do fio 10.0 e enroladas para se formar um tubo	115
ANEXO E –	Realização de três amarrações, com fio de sutura Vycril® 4.0	117
ANEXO F –	Segmento de veia colocado próximo ao coto proximal	119
ANEXO G –	Paralisia da pata posterior direita do animal	121
ANEXO H –	Corte histológico do nervo isquiático de animal do grupo GCNI	123
ANEXO I –	Corte histológico do terço médio do enxerto de animal do grupo GI	125
ANEXO J –	Corte histológico do terço médio do enxerto de animal do grupo GII	127
ANEXO K –	Corte histológico do terço médio do enxerto de animal do grupo GIII	129
ANEXO L –	Corte histológico do terço médio do enxerto de animal do grupo GIV	131
ANEXO M –	Corte histológico do terço médio do enxerto de animal do grupo GIV	133
ANEXO N –	Corte histológico da região operada do animal do grupo GCOI	135
ANEXO O –	Corte histológico da região operada do animal do grupo GCOII	137

ANEXO P –	Corte histológico do terço médio do enxerto retirado de animal do grupo GIII	139
ANEXO Q –	Corte histológico do nervo isquiático de animal do grupo GCNII	141
ANEXO R –	Corte histológico do terço médio do enxerto de animal do grupo GV	143
ANEXO S –	Corte histológico do terço médio do enxerto de animal do Grupo GVI	145
ANEXO T –	Corte histológico do terço médio do enxerto de animal do grupo GVII	147
ANEXO U –	Corte histológico do terço médio do enxerto de animal do grupo GVIII	149
ANEXO V –	Corte histológico do terço médio do enxerto de animal do grupo GII	151
ANEXO W –	Elétron-micrografia de varredura da superfície da Membrana de PLGA	153
ANEXO X –	Elétron-micrografia de varredura da superfície da Membrana de PLGA	155
ANEXO Y –	Elétron-micrografia de varredura da superfície da Membrana de Colágeno	157

GRÁFICOS

- GRÁFICO 1- Representação gráfica do valor do diâmetro médio das fibras nervosas em regeneração, encontradas tanto no terço médio (TM) do enxerto, quanto no coto distal (CD) dos enxertos realizados em todos os grupos. 69
- GRÁFICO 2 - Representação gráfica do valor da espessura média das bainhas de mielina das fibras nervosas em regeneração, encontradas tanto no terço médio (TM) do enxerto, quanto no coto distal (CD) dos enxertos realizados em todos os grupos. 70

LISTA DE TABELAS

- TABELA 1 - Dados morfométricos referentes às fibras mielínicas encontradas no terço médio (TM) dos enxertos e nos grupos controle normais. D = Diâmetro da fibra, E = Espessura da bainha de mielina. 68
- TABELA 2 - Dados morfométricos referentes às fibras mielínicas encontradas no coto distal (CD) do nervo isquiático dos animais dos grupos experimentais e dos grupos controle normais. D = Diâmetro da fibra, E = Espessura da bainha de mielina. 68

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	REVISÃO DE LITERATURA	27
2.1	NERVOS PERIFÉRICOS E REGENERAÇÃO	29
2.2	REPARO TUBULAR OU TUBULIZAÇÃO	34
2.3	USO DO COLÁGENO EM REGENERAÇÃO NERVOSA	39
2.4	USO DO PLGA EM REGENERAÇÃO NERVOSA	41
2.5	TÉCNICA DE ENXERTO DE VEIA	43
3	PROPOSIÇÃO	47
3.1	OBJETIVO GERAL	49
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	49
4	MATERIAL E MÉTODOS	51
4.1	TÉCNICA CIRÚRGICA	60
4.2	PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS DE NERVO	60
4.3	ANÁLISE MORFOMÉTRICA	61
4.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA	61
4.5	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA	61
5	RESULTADOS	63
5.1	OBSERVAÇÕES MICROSCÓPICAS	65
5.2	DEGRADAÇÃO DOS MATERIAIS	65
5.3	ANÁLISE DE MATERIAL HISTOLÓGICO	66
5.4	ANÁLISE DE FIBRAS NERVOSAS MIELÍNICAS	67
5.5	ANÁLISE DA MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA	70
6	DISCUSSÃO	71

7	CONCLUSÃO	87
	REFERÊNCIAS	91
	ANEXOS	107
	APÊNDICE	159

1 Introdução

1 INTRODUÇÃO

Nervos periféricos freqüentemente são alvos de lesões traumáticas (MILLES, 2000). Segundo dados de um estudo realizado nos EUA, 50 mil indivíduos sofrem lesões traumáticas em nervos periféricos a cada ano (EVANS, 2001). A gravidade do dano nervoso pode variar muito em relação às dimensões do evento traumático (LUNDBORG, 2000). Dessa forma, as lesões causadas aos nervos são usualmente classificadas em cinco categorias por SUNDERLAND (1978), desde uma simples compressão até mesmo a transecção total do nervo, sendo esta considerada a mais grave.

Pacientes com trauma em nervos periféricos estão na maioria das vezes no auge de sua produtividade profissional, portanto, a perda de uma ou várias funções, em decorrência de uma lesão nervosa, pode ser devastadora. Dessa maneira, qualquer tratamento que permita a recuperação funcional de nervos periféricos, após um trauma, é de grande valor a toda sociedade (WHITLOCK et al., 2009).

De especial interesse para a odontologia são os traumas ocorridos nos nervos periféricos responsáveis pela inervação da face, os quais podem gerar perda da sensibilidade geral e especial, assim como desencadear quadros graves de paralisia que podem comprometer a função dos músculos da expressão facial e da mastigação, afetando tanto a própria mastigação, quanto a deglutição e a motricidade oral.

Na prática clínica, por exemplo, são comuns os relatos de lesão iatrogênica causada ao nervo alveolar inferior, ramo do nervo mandibular (3ª divisão do nervo trigêmeo), levando à perda da sensibilidade da polpa dos dentes inferiores, das papilas interdentais, periodonto e tecido ósseo vizinho aos dentes do hemi-arco innervado (OLIVEIRA et al., 2006). Da mesma maneira, podem ocorrer lesões no nervo lingual, caracterizando, neste caso, a perda da sensibilidade geral dos dois terços anteriores da língua, gerando grave desconforto ao paciente (DAMIANI e CÉSPEDES, 2007).

Com o objetivo de recuperar as fibras nervosas lesadas, as técnicas cirúrgicas se tornaram o maior trunfo dos pesquisadores e, para tanto, têm apresentado avanços significativos nos últimos 25 anos (LUNDBORG, 2000;

MILLES, 2000; STRAUCH, 2000; MEEK e COERT, 2002; DVALI e MACKINNON, 2003; BARCELOS et al., 2003). Assim, a regeneração nervosa é um fato fundamentado e, por esta razão, muitas pesquisas são realizadas com o objetivo de detalhar os fatores, mecanismos e técnicas designadas à restauração destas estruturas (CRISCI e FERREIRA, 2002). Em vista disso, além do reparo anatômico, o restabelecimento da inervação sensorial ou motora para uma boa recuperação funcional é um dos objetivos fundamentais das cirurgias reconstrutivas (ACAR et al., 2008).

Apesar de muitos avanços neste campo de investigação, a recuperação raramente é completa (AZZE e MATTAR, 2000) e nem sempre satisfatória (LUNDBORG, 2000). De fato, existe um considerável progresso nas técnicas de microcirurgia, porém o tratamento de longos defeitos nervosos ainda permanece como um desafio para o cirurgião (SINIS et al., 2006).

A medicina regenerativa dos nervos periféricos tem buscado outros meios de melhorar a regeneração nervosa sem a utilização dos enxertos autólogos de nervo (LOHMEYER e MACHENS, 2009), definidos como a técnica com os melhores resultados. Essa técnica consiste na remoção de um segmento de nervo sensitivo de uma região do corpo, em que a perda da sensibilidade não ocasione tanto desconforto, como, por exemplo, nos calcanhares, e enxertia desse segmento no nervo lesado.

Esse procedimento, embora muito eficaz, apresenta algumas desvantagens, uma vez que inúmeros problemas são relatados como decorrentes desse tipo de enxerto, como a morbidade da área doadora e a formação de neuromas, os quais podem levar a quadros de dor intensa. Este fato tem motivado aos pesquisadores da linha de regeneração em nervos periféricos a desenvolver técnicas ligadas à área da engenharia tecidual, que viabilizem a utilização de outros materiais, tanto biológicos quanto sintéticos, com a finalidade de reconstruir nervos lesados (SINIS et al., 2007).

Embora, no processo de regeneração nervosa periférica seja conhecida uma influência do coto distal (extremidade do nervo lesado conectada à região motora ou sensitiva) no sentido de orientar a regeneração das fibras nervosas a partir do coto proximal (extremidade do nervo lesado ligada aos corpos celulares de seus neurônios) (CHIU et al., 2004), normalmente o auto-reparo do nervo

desconectado não é possível. Esse fato se deve, principalmente, à retração dos cotos proximal e distal após a lesão, assim como também pela invasão da área lesada por tecido fibroso cicatricial (WANG et al., 2009). Portanto, mesmo sendo considerado de grande importância, o fato do coto distal ser uma fonte de fatores neurotróficos, necessários para o sucesso da regeneração a partir do coto proximal (YOSHII et al., 2003), muitas vezes os resultados são insatisfatórios.

Partindo-se da necessidade da criação de novas técnicas cirúrgicas e também da possibilidade da implementação de novos materiais, que ampliassem os resultados obtidos nos procedimentos que viabilizam a regeneração de nervos periféricos, vários pesquisadores desenvolveram a técnica de reparo tubular, ou também denominada tubulização. Essa técnica visa o crescimento das fibras nervosas lesadas através de um tubo interposto entre os segmentos do nervo que sofreu o dano, sendo, hoje, sua utilização bastante difundida.

Acredita-se, que o reparo tubular apresenta inúmeras vantagens em relação a outras técnicas, particularmente no que se refere à proteção da área lesada, impedindo a ocorrência de fibrose em torno do segmento em regeneração, que é um dos fatores limitantes do crescimento axonal.

Esses tubos ou próteses tubulares atuam, portanto, no confinamento das extremidades do nervo lesado (coto distal e proximal) e de substâncias neurotróficas que ajudam na orientação do crescimento dos axônios a partir do coto proximal em direção ao coto distal (POLITIS et al., 1982).

Muitos materiais sintéticos e biológicos têm sido utilizados como tubo, na tentativa de viabilizar a regeneração nervosa (SINIS et al., 2006), em especial aqueles que são reabsorvíveis, tem se apresentado como uma excelente alternativa.

Na Odontologia, o uso de membranas, ou também denominadas barreiras biológicas, é extensamente conhecido, sobretudo nas técnicas cirúrgicas que envolvem a regeneração tecidual guiada, a qual tem sido amplamente utilizada em diversas situações clínicas para facilitar o reparo de defeitos ósseos (TEIXEIRA, 2009). Dessa forma, as membranas auxiliam a neoformação óssea em defeitos na cavidade bucal (LEKOVIC et al., 2001; TAKEISHI et al., 2001), impedindo a invaginação de tecidos moles dentro do sítio de regeneração da ferida cirúrgica, sendo materiais amplamente reconhecidos na literatura pela sua biocompatibilidade (YAMATOIGI et al., 2005; TEIXEIRA, 2009).

Aliando-se os princípios da técnica de reparo tubular com a utilização de materiais conhecidos na área da Odontologia, decidimos, neste estudo, utilizar duas membranas reabsorvíveis, uma sintética e outra biológica, sob a forma de tubo, na tentativa de permitir o processo de regeneração nervosa e também de avaliar a possibilidade da extensão do uso desses materiais, desenvolvidos especialmente para permitir a neoformação óssea, em estudos que possam viabilizar a sua utilização nas técnicas de regeneração nervosa.

A membrana de origem biológica utilizada neste trabalho foi a membrana de colágeno (cortical óssea desmineralizada bovina - GenDerm, Baumer S.A., Divisão Genius), enquanto a sintética foi a membrana de ácido poli-láctico-poli-glicólico, também denominado PLGA (material em desenvolvimento a ser denominado – GenDerm PLGA, Baumer S.A., Divisão Genius), sendo ambas reabsorvíveis. Tanto o colágeno quanto o PLGA são materiais que agregam características importantes necessárias aos processos de regeneração, como a biocompatibilidade e a biodegradação, sendo aprovados pelo FDA para inúmeras aplicações clínicas (LI et al., 2010).

Dentro das técnicas de reparo tubular, a utilização de tecidos autólogos, sob a forma de tubos, também se encontra amplamente difundida, pois esses tecidos conferem grande biocompatibilidade ao enxerto, uma vez que são formados por muitas moléculas também presentes no próprio tecido nervoso (WANG et al., 1995). Dessa forma, muitos tipos de enxertos podem ser produzidos a partir de estruturas presentes no próprio organismo do animal, como aqueles utilizando artérias e veias para reabilitar um nervo lesado (ULKUR et al., 2008; KARAGOZ et al., 2009).

As veias apresentam em suas camadas adventícia (externa) e média, duas substâncias importantes, a laminina e o colágeno, as quais já comprovadamente apresentaram efeito benéfico sobre fibras nervosas em regeneração, acelerando esse processo e aumentando o número de axônios regenerados (OLIVEIRA et al., 2005). Em especial, a laminina é conhecida por oferecer substrato ao crescimento rápido e profuso dos neuritos, que são as fibras nervosas em regeneração (LANDER et al., 1985; LI et al., 1992).

Assim, a presença de um tecido rico em fatores tróficos, como as veias, associado a outros materiais desenvolvidos pelas técnicas de engenharia tecidual,

as membranas, poderia melhorar sobremaneira os resultados obtidos com o reparo tubular. Partindo desse princípio, aliado ao uso das duas membranas, de colágeno e de PLGA, sob a forma de tubos, decidimos utilizar uma veia como tecido de preenchimento dessas próteses tubulares.

Neste trabalho, agregamos então como diferencial, a utilização de materiais especialmente desenvolvidos para fins odontológicos, para uso na cavidade bucal, em um estudo que visa à regeneração de um nervo periférico misto, o nervo isquiático. Verificamos se estes materiais podem agregar melhorias ao processo de regeneração nervosa, seja funcionando como simples barreiras à invasão de tecido fibroso, melhorando a qualidade do enxerto, ou se podem impedir esse processo por não serem desenvolvidos para esta finalidade. E, por fim, aliamos a utilização de um segmento da veia jugular externa, como tecido de preenchimento dos tubos feitos com as membranas, na tentativa de verificar a eficácia das moléculas biológicas presentes neste vaso, porém, agora sendo utilizadas de uma maneira diferente da que já foi apresentada na literatura.

Em suma, este trabalho foi um desafio, uma vez que essas membranas foram utilizadas de uma maneira completamente diversa daquela para a qual foram criadas, ou seja, regeneração nervosa ao invés de neoformação óssea; e a veia jugular externa, agora, foi apresentada como um tecido de preenchimento e não como um conduto.

2 Revisão de Literatura

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 NERVOS PERIFÉRICOS E REGENERAÇÃO

Dentro da complexa fisiologia do corpo humano, o Sistema Nervoso destaca-se como o responsável pela maioria das funções de controle do organismo, coordenando e regulando as inúmeras atividades corporais. Apresenta também um papel vital na orientação do corpo, coordenação dos movimentos corporais, assimilação da experiência e da expressão dos comportamentos dirigidos pelo instinto. Didaticamente, apresenta-se dividido em duas partes principais: o Sistema Nervoso Central (SNC) e o Sistema Nervoso Periférico (SNP). O SNC é o centro que controla todo o sistema e é constituído pela medula espinal e pelo encéfalo. Todo o estímulo, externo ou interno, que mereça uma resposta, deve ser conduzido ao SNC. Já o conjunto de fibras nervosas que conecta o encéfalo e a medula espinal a receptores e efetadores, constitui o SNP (RIZZOLO e MADEIRA, 2006). Portanto, a comunicação entre o SNC e o corpo depende do SNP para a transmissão dos seus dados.

Da mesma maneira, o SNP também determina a comunicação do SNC e o ambiente (FAWCETT e KEYNES, 1990), consistindo, portanto, no tecido nervoso localizado fora do SNC, o que inclui nervos acompanhados dos seus respectivos gânglios, receptores sensoriais e plexos nervosos. A principal responsabilidade do SNP é transmitir dados associados do corpo ao SNC, simplesmente transportando uma série de estímulos para o cérebro e medula espinal e a partir dessas estruturas. Fazem parte do SNP os nervos cranianos, os nervos espinhais e os gânglios (GARDNER, 2008), que se diferenciam pela localização de sua origem, ou seja, os nervos cranianos têm sua origem no encéfalo, os nervos espinhais se originam na medula espinal, apresentando-se amplamente distribuídos pelo corpo.

As primeiras descrições do SNP foram feitas por Hipócrates próximo ao século IV A.C., e por Herófilo no século III A.C., os quais identificaram os nervos como tal, os distinguindo dos tendões, traçando o caminho dos nervos até a medula espinal e os separando em componentes motores e sensitivos. A escola tradicional da época determinada por Hipócrates, entretanto, duvidou que ocorresse a cura em nervos. Através dos séculos seguintes, vários artigos foram publicados a respeito do

SNP, mas sem o conhecimento suficiente de sua anatomia, fisiologia e alta capacidade regenerativa, por onde se explica a frustração que os cirurgiões devem ter sofrido ao lidar com as lesões em nervos sem observar seu subsequente reparo. Isto é, provavelmente, a razão pela qual o reparo nervoso foi raramente estudado até pouco antes do século XIX. A pleora dos estudos no SNP e sobre sua regeneração tem sido relatada pelos últimos 150 anos e nos tem fornecido o conhecimento atual (TERZIS et al., 1997).

Os nervos periféricos freqüentemente são alvos de lesões traumáticas (MILLESI, 2000). Segundo dados de um estudo realizado nos EUA, 50 mil indivíduos sofrem lesões traumáticas em nervos periféricos a cada ano (EVANS, 2001), enquanto na Europa esse número fica acima de 300.000 (WIBERG e TERENCEHI, 2003).

Essas lesões são consideradas um problema de longa data, tendo sido descrito, até mesmo na bíblia, por exemplo, uma lesão aguda de nervo periférico ocorrida há aproximadamente 3500 anos atrás, em que o patriarca Jacó descreve ter sofrido de uma lesão do nervo isquiático, com um deslocamento traumático do quadril durante sua batalha com o anjo, sendo este relato encontrado no livro de Gênesis (Capítulo 32: 25-33). Esse fato sugere que Jacó teria sofrido de uma neuropraxia do nervo isquiático (NGEOW, 2010).

As lesões em nervos periféricos se apresentam como uma significativa causa de morbidade e incapacidade em todo o mundo, representando aproximadamente 3% de todas as lesões traumáticas (MACKINNON e DELLON, 1988). Os indivíduos com trauma em nervos periféricos estão, na maioria das vezes, no auge de sua produtividade profissional, portanto, qualquer perda de função é particularmente devastadora. Dessa maneira, os tratamentos que permitem a recuperação funcional após um trauma em nervo periférico, são de grande valor a toda sociedade (WHITLOCK et al., 2009).

Os nervos periféricos podem ser lesados devido a inúmeros processos patológicos (BELKAS et al., 2004), acidentes de trânsito (HASHIMOTO et al., 2005) ou, até mesmo, em eventos ocorridos em períodos de guerra (NGEOW, 2010). Também podem ser atingidos em procedimentos cirúrgicos, iatrogenicamente, como, por exemplo, durante a ressecção de um tumor maligno ou em cirurgias menores, como a exodontia de um terceiro molar (DAMIANI e CÉSPEDES, 2007). Esses

diferentes tipos de lesões podem levar a alterações ou mesmo perda da função motora, sensitiva e/ou autonômica dessas fibras nervosas (HASHIMOTO et al., 2005) e a relevância clínica da lesão irá predizer o resultado funcional, ou seja, quanto maior a extensão do dano, mais difícil a recuperação da função (KINGHAM e TERENGHI, 2006).

A gravidade do dano nervoso pode variar muito em relação às dimensões do evento traumático (LUNDBORG, 2000). As lesões causadas no nervo são usualmente classificadas em cinco categorias (SUNDERLAND, 1978), desde uma simples compressão até mesmo a sua transecção total. Assim sendo, o tipo de lesão sofrida por um nervo tem fundamental importância no processo de regeneração e na conduta a ser tomada.

Sunderland (1978) classificou a lesão do nervo, com base nos achados histológicos, em: primeiro grau, estrutura do nervo intacta (neuropraxia); segundo grau, axônio rompido com células de Schwann íntegras (axoniotmese); terceiro grau, lesão do endoneuro; quarto grau, lesão do perineuro; e quinto grau, rotura completa do nervo (neurotmese). Nos dois primeiros graus de lesão, geralmente ocorre recuperação completa do nervo e de sua capacidade funcional (FARIA et al., 2006).

A neuropraxia caracteriza-se por pequeno dano aos axônios de um nervo, resultando em um bloqueio da passagem do estímulo nervoso, por um pequeno período de tempo, sendo que a sua recuperação ocorre após alguns dias ou semanas. No caso da axoniotmese os axônios são gravemente atingidos e a condução nervosa é perdida, desencadeando uma série de complexas reações na tentativa de regenerar o nervo. A neurotmese envolve danos aos axônios e a bainha de mielina, como, por exemplo, em uma transecção total de nervo, sendo neste caso o processo regenerativo mais desorganizado, com um crescimento de axônios com uma qualidade pobre e com a função limitada (KINGHAM e TERENGHI, 2006).

De uma maneira geral, as duas principais respostas do nervo periférico às lesões baseiam-se no alvo da agressão: a célula de Schwann ou o axônio. As doenças que afetam principalmente as células de Schwann acarretam perda da mielina, referida como desmielinização segmentar. Em contraste, o comprometimento primário do neurônio e seu axônio pode levar à degeneração axonal. Em algumas doenças e lesões, a degeneração axonal pode ser seguida por regeneração axonal e reinervação do órgão efector (LIGA DE NEUROCIRURGIA).

Diferentemente dos elementos do SNC, os nervos periféricos podem se regenerar quando lesados. Em um nervo no seu estado normal, as células de Schwann parecem estar quiescentes, entretanto, após a lesão nervosa essas células no coto distal passam por extensas mudanças concomitantemente com a degeneração axonal (CHALFOUN et al., 2006), participando, portanto, ativamente no processo de regeneração.

Quando ocorre uma lesão, após um curto período de latência, os axônios do coto proximal se regeneram em um ritmo uniforme em direção ao coto distal do nervo lesado (porção conectada aos órgãos receptores ou efetadores), sendo esse crescimento facilitado pelas células de Schwann e túbulos de endoneuro intactos, permitindo o crescimento do axônio e a reinervação dos órgãos-alvo.

Portanto, nesse processo, após a axotomia, verifica-se que o segmento axonal distal gradualmente se degenera, e eventualmente é fagocitado por macrófagos, sendo este fenômeno conhecido como Degeneração Walleriana, recebendo este nome por ser primeiramente descrito por Waller em 1850. Em seguida, as células de Schwann perdem contato com os axônios, e se proliferam transitoriamente, formando vertentes celulares chamadas de colunas de células de Schwann ou Bandas de Bungner.

Os axônios em regeneração emergem dos nodos de Ranvier do coto proximal da lesão e se estendem em direção aos órgãos-alvo. Subsequentemente, as bandas de Bungner formadas servem como vias para os axônios em regeneração crescerem, através das quais atingirão os órgãos-alvo, constituindo, portanto, um ambiente favorável ao crescimento axonal (THANOS et al., 1998). Se os axônios não crescem dentro deste ambiente, mas em direção ao tecido conjuntivo, eles param o processo de regeneração e não atingem o seu alvo (RADTKE e VOGT, 2009).

Embora no processo de regeneração de nervos periféricos seja conhecida esta influência do coto distal no sentido de orientar a regeneração das fibras nervosas (CHIU et al., 2004), normalmente, o auto-reparo do nervo desconectado não é possível, devido à retração dos cotos proximal e distal e a invasão por tecido conjuntivo fibroso (WANG et al., 2009).

Axônios de neurônios do SNP regeneram prontamente em nervos lesados quando os cotos destes são adequadamente posicionados. Esta capacidade se

deve a propriedades intrínsecas dos neurônios periféricos, bem como ao meio permissivo para o crescimento das fibras nervosas. O ambiente da lesão dos axônios do SNC difere muito daquele do SNP. Ao contrário dos nervos periféricos, os axônios no SNC não são estruturalmente separados por bainhas perineurais, que são as estruturas que fornecem um substrato anatômico para o crescimento da fibra lesada (GUZEN et al., 2009) e, ainda, acredita-se que as células de suporte do SNC, os astrócitos, parecem inibir o crescimento axonal para regeneração de fibras, diferentemente das células de Schwann existentes no SNP (CHALFOUN et al., 2006).

Embora exista no SNP essa capacidade intrínseca de se regenerar, no caso das fibras nervosas motoras para os músculos, a reinervação fica frequentemente abaixo dos níveis normais e essa recuperação limitada da função (KINGHAM e TERENCE, 2006) resulta em paralisia efetiva do membro inteiro ou das suas porções distais (MADISON et al., 2007).

O maior determinante da recuperação funcional após lesões no SNP é a regeneração precisa dos axônios em direção aos seus órgãos-alvo. Infelizmente, axônios motores em regeneração são frequentemente desviados para órgãos sensoriais, enquanto que os axônios de fibras sensitivas são, muitas vezes, desviados para a pele ou para algum outro músculo, gerando uma regeneração imprecisa (MADISON et al., 2007).

Nos últimos 25 anos, as técnicas cirúrgicas para a recuperação de nervos e músculos tiveram avanços significativos (RODRIGUES e SCHMALBRUCH, 1995; LUNDBORG, 2000; MILLESI, 2000; STRAUCH, 2000; MEEK e COERT, 2002; DVALI e MACKINNON, 2003). Assim, a regeneração nervosa é um fato fundamentado e, por esta razão, pesquisas são realizadas objetivando detalhar os fatores, mecanismos e técnicas designadas à restauração destas estruturas (CRISCI e FERREIRA, 2002).

Além do reparo anatômico, o restabelecimento da inervação sensorial e motora visando à recuperação funcional é um dos objetivos fundamentais nas cirurgias reconstrutoras (ACAR et al., 2008). Porém, apesar de muitos avanços neste campo de investigação, a recuperação raramente é completa (AZZE e MATTAR, 2000) e nem sempre satisfatória (LUNDBORG, 2000).

Embora o reparo nervoso seja possível, existem vários fatores que o

impedem de forma ideal, especialmente no tratamento de longos defeitos nervosos, os quais ainda permanecem como um desafio para o cirurgião (SINIS et al., 2006).

Da mesma maneira, a recuperação funcional é variável e frequentemente imprevisível, por inúmeros fatores que incluem o nível de morte celular, a formação de tecido cicatricial-fibroso e de neuromas no local da lesão. Por estas razões, as técnicas terapêuticas utilizadas para os indivíduos com lesão em um nervo periférico mudam continuamente.

Sofisticados avanços em tecnologia, neurobiologia molecular e celular, e microscopia eletrônica irão, sem dúvida, otimizar as estratégias reconstrutivas no tratamento das lesões em nervos periféricos. Uma maior consciência e compreensão da ultraestrutura dos nervos, assim como dos mecanismos que delineiam o processo de regeneração e outros fatores prejudiciais a regeneração nervosa irão ajudar no sucesso do reparo de nervos lesados (TERZIS et al., 1997).

2.2 REPARO TUBULAR OU TUBULIZAÇÃO

As técnicas de microcirurgia que são utilizadas para reconstruir “gaps” (espaços vazios/falhas) de nervo incluem a sutura direta dos cotos (neurorrafia término-terminal), o enxerto de nervo, a neurotização (transferência de inervação), a neurorrafia término-lateral e as técnicas que utilizam engenharia tecidual (JOHNSON e SOUCACOS, 2008).

Dentre esses tratamentos destacam-se com os melhores resultados as neurorrafias término-terminais e o enxerto autólogo de nervo (STANG et al., 2005). A neurorrafia término-terminal apresenta-se como a técnica de eleição no caso de nervos periféricos que foram transeccionados, ou seja, em que ocorreu uma desconexão das fibras (sem perda de tecido); ou no caso de curtos “gaps” de até 5 mm (JOHNSON e SOUCACOS, 2008). Nesse caso, é realizada no nervo lesado a coaptação cirúrgica direta dos cotos nervosos, através de uma sutura, livre de tensão, que constitui a melhor chance de uma boa recuperação (BENMERAH et al., 2009).

Da mesma maneira, os enxertos autólogos de nervo são amplamente utilizados, constituindo uma técnica com padrão de excelência (WHITLOCK et al.,

2009), uma vez que o tecido nervoso é a fonte primária de fatores neurotróficos e também minimiza as reações de corpo estranho (NIJHUIS et al., 2010), sendo este o método mais utilizado pelos cirurgiões para reparar extensos defeitos nervosos ou de grande perda tecidual (ALLET et al., 2003). Esta técnica consiste na remoção de um segmento de nervo sensitivo, de uma outra área, na qual a perda da sensibilidade não gera comprometimento de funções essenciais ao indivíduo, sendo geralmente utilizado o nervo sural, nervo sensitivo removido da região inferior da perna (HAJOSCH et al., 2010).

Este procedimento, porém, apresenta várias limitações, pois conduz a um dano irreversível, em consequência da perda da função sensorial da área doadora; devido à necessidade de abertura de duas feridas cirúrgicas (uma doadora e outra receptora), existe um aumento do risco de infecções e também do custo para o paciente; e também podem levar a formação de neuromas na região doadora, desencadeando quadros intensos de dor (HANNA e DEMPSEY, 2010). De uma maneira geral, o enxerto autólogo de nervo está intimamente associado com o aumento da morbidade da área doadora (JOHNSON et al., 2005).

Outro fator limitante que já foi demonstrado em modelos animais, está no fato de que enxertos autólogos feitos a partir de nervos sensitivos não viabilizam a regeneração motora tão bem quanto aqueles feitos a partir de enxertos de nervos motores ou mistos. Além disso, o comprimento e calibre dos nervos disponíveis para os enxertos são limitados, o que se torna um problema em situações em que uma reconstrução extensa é necessária (WHITLOCK et al., 2009).

Em decorrência dos inúmeros inconvenientes das técnicas cirúrgicas e dos resultados funcionais muitas vezes insatisfatórios dos enxertos de nervo (DE BOER et al., 2010), muitos pesquisadores partiram em direção ao desenvolvimento de condutos, feitos dos mais diversos materiais, que pudessem auxiliar o processo de regeneração.

Esses condutos funcionariam como uma ponte artificial em forma de um tubo, com a função de guiar os axônios a partir do coto proximal em direção ao coto distal (BENMERAH et al., 2009), pois o reparo de um nervo periférico não somente depende da vitalidade do nervo lesado, mas também da correta orientação das fibras nervosas (sejam elas motoras, sensitivas ou autonômicas) em direção aos seus órgãos-alvo (FAWCETT e KEYNES, 1990; LUNDBORG, 2003).

Outros métodos alternativos, utilizam o princípio do reparo tubular, como os enxertos utilizando artérias, veias e tubos artificiais preenchidos com fatores de crescimento (KARAGOZ et al., 2009). Atualmente, existem inúmeros tipos de condutos feitos a partir de materiais sintéticos (PATEL et al., 2006), como o ácido poliglicólico (WAITAYAWINYU et al., 2007), e feitos a partir de biomateriais como o colágeno tipo I (WHITLOCK et al., 2009), os quais têm sido desenvolvidos no sentido de oferecer um padrão de excelência em regeneração nervosa, como alternativa ao enxerto autólogo de nervo.

A maioria das pesquisas contemporâneas envolvendo nervos periféricos têm sido realizadas com os mais diversos tipos de tubos (VAREJÃO et al., 2003), com o objetivo de produzir um conduto ideal que possa restabelecer as funções sensoriais e motoras.

Como características, o tubo ideal deveria ser feito de material de baixo custo; inerte biologicamente, portanto, biocompatível; fino e flexível; translúcido; reabsorvível; inibidor dos processos inflamatórios como fibrose, glioma, neuroma, edema e isquemia; e ser facilitador dos processos que contribuem para a regeneração, permitindo o acúmulo dos fatores que promovem o crescimento das fibras nervosas lesadas (ALLET et al., 2003).

Outras características como diâmetro e espessura da parede do tubo adequados, ser de fácil implantação através de técnicas de microcirurgia, esterilizáveis e biodegradáveis, são destacadas como necessárias (CHALFOUN et al., 2006). Também, de uma maneira geral, devem necessitar de mínimo esforço para sua implantação e resistir ao colapso durante a cirurgia e o período de recuperação (TARAS et al., 2005).

No caso de materiais reabsorvíveis, outras características como porosidade adequada, taxa de degradação e resistência mecânica apropriada também devem ser observadas (WANG et al., 2009). Em contra partida, os não-reabsorvíveis, devem manter o seu formato durante o processo de regeneração para não comprimir a área em recuperação (TARAS et al., 2005).

Os tubos sintéticos foram primeiramente feitos de silicone devido a sua flexibilidade e biocompatibilidade; e porque já existiam em várias dimensões para uso na área médica (PFISTER et al., 2007). Porém, embora comercialmente disponíveis, esses tubos de silicone são sabidamente usados para reparar, na

maioria das vezes, pequenos defeitos em nervos que vão de 1 cm a 3 cm (PATEL et al., 2006). Sua rigidez e o fato de não serem reabsorvíveis, também são fatores conhecidos por gerarem complicações na área do enxerto a longo prazo (PFISTER et al., 2007).

Dessa forma, hoje, os tubos são preferencialmente feitos de materiais biodegradáveis como os poliésteres e poliuretanos (PFISTER et al., 2007). Sendo, de uma maneira geral, o emprego desses tipos de tubos eficaz em perdas de substância de nervos de até 30 mm em seres humanos (MACKINNON e DELLON, 1990) e 10 mm a 15 mm em ratos (WALTON et al., 1989, CHIU e STRAUCH, 1990).

Alguns autores destacam a existência de algumas limitações quanto ao uso de tubos de materiais reabsorvíveis no reparo de nervos com grande diâmetro (MOORE et al., 2009) e acreditam ainda que a inclusão de materiais não-biológicos poderia não ser eficaz em promover a regeneração nervosa pois estes materiais poderiam introduzir complicações sob a forma de infecções, assim como aumentar as reações de corpo estranho e os quadros de fibrose na região do enxerto (MERLE et al., 1989).

Com os recentes avanços na área da engenharia tecidual, a utilização de tubos artificiais para regeneração nervosa tem se tornado uma excelente alternativa, pois muitos materiais sintéticos têm capacidade de fornecer um micro-ambiente favorável para o crescimento nervoso e para guiar os axônios em direção aos órgãos-alvos (WANG et al., 2009).

Os tubos permitem a regeneração dos nervos por favorecer o alinhamento linear das suas fibras; a concentração da matriz celular para a migração de axônios e células de Schwann (CHIU et al., 1983); por proporcionar melhor confinamento das fibras em regeneração; reduzir a reação inflamatória e a formação de tecido cicatricial no local de reparo (COSTA et al., 2006). Da mesma maneira o tubo isola o processo de regeneração internamente, permitindo a comunicação de concentrados de fatores tróficos entre os cotos proximal e distal e a redução da infiltração de tecido cicatricial-fibroso, que se torna danosa ao processo de regeneração (KINGHAM e TERENCEHI, 2006).

A engenharia tecidual no reparo de nervos periféricos terá nos próximos anos um aumento da sua aplicabilidade clínica, mas ainda permanece a questão se

será possível desenvolver e utilizar um material realmente funcional para a reconstrução nervosa (CHALFOUN et al., 2006).

Basicamente, no início do século XX, o biólogo espanhol Ramón y Cajal postulou o conceito de neurotrofismo: a idéia de que substâncias químicas liberadas da porção distal da lesão poderiam atrair os axônios em regeneração da porção proximal. Anos depois, em 1944, o conceito de neurotrofismo foi avaliado por Weiss em uma série de experimentos, utilizando artérias como tubos para regeneração nervosa. Weiss, então, postula que o contato dos axônios em regeneração com um tubo condutor que guiasse o seu crescimento até o coto distal, seria mais importante que os agentes neurotróficos para o processo de regeneração. Somente a partir de 1980 que experimentos mais sofisticados demonstraram que tanto o neurotrofismo quanto a presença de um condutor-guia são importantes na regeneração nervosa (LUNDBORG et al., 1986).

Portanto, nos últimos anos, materiais sintéticos e biológicos têm sido usados, na forma de tubos, para guiar o crescimento nervoso, especialmente novos materiais biodegradáveis que fornecem suporte tanto mecânico quanto químico ao processo de regeneração (CHEN et al., 2000; CIARDELLI e CHIONO, 2006; LIETZ et al., 2006; MARCHESI et al., 2007). Dentre eles estão os tubos de vários tipos de colágeno; outros feitos de silicone e preenchidos com, por exemplo, células de Schwann, células tronco, laminina, soluções ácidas e básicas contendo vários tipos de fatores de crescimento (NGF, FGF, VEGF), sendo utilizados como uma terapia alternativa aos enxertos autólogos de nervo (PU et al., 1999; CHEN et al., 2000; YANNAS e HILL, 2004; LIETZ et al., 2006; MARCHESI et al., 2007).

Da mesma maneira, enxertos pré-fabricados a partir de estruturas existentes no próprio organismo do animal, utilizando veias (CHIU 1983, 1990; FERRARI et al., 1999; CHOI et al., 2005) e artérias (BARCELOS et al., 2003), têm sido aplicados como forma de evitar a perda da sensibilidade de uma área doadora, gerada com os enxertos nervosos autólogos, pois estes vasos são removidos de regiões que podem ser supridas por outras estruturas. Assim, esse material biológico e conhecido fisiologicamente, pode ser utilizado sob a forma de tubo, viabilizando a regeneração nervosa através do seu lúmen, permitindo dessa maneira o crescimento de um novo segmento nervoso que poderá reabilitar uma região lesada (ULKUR et al., 2008; KARAGOZ et al., 2009).

2.3 USO DO COLÁGENO EM REGENERAÇÃO NERVOSA

Os colágenos constituem uma família de 28 proteínas, que se encontram entre as mais abundantes nos mamíferos, constituindo em torno de 25% do total de proteínas humanas, sendo encontrado, por exemplo, na pele, nas cartilagens, nos ossos e tendões, conferindo resistência a esses tecidos. Entre os tipos de colágeno, o tipo I é o mais expresso no corpo humano, e um dos mais antigos polímeros utilizados como biomaterial (ALLUIN et al., 2009).

Dentre os inúmeros materiais utilizados nas técnicas de reparo tubular, o colágeno apresenta-se como um dos componentes mais citados para a composição de tubos que viabilizem o processo de regeneração. A conveniência de apresentar-se como um material amplamente disponível tem facilitado a sua grande utilização para a reconstrução nervosa (MEEK e COERT, 2002; MOORE et al., 2009).

O colágeno é caracterizado como um material natural, biodegradável, que possui alta biocompatibilidade quando comparado aos inúmeros polímeros sintéticos que são usados nas técnicas de tubulização. Os tubos feitos de colágeno têm sido amplamente utilizados devido ao seu efeito em promover o crescimento dos neuritos (fibras nervosas em regeneração) e, conseqüentemente, em promover a recuperação do nervo lesado (OKAMOTO et al., 2010), preenchendo todos os critérios de um material aplicável em técnicas de regeneração nervosa (STANG et al., 2005). Existem até mesmo relatos, que o colágeno, quando utilizado para tratar uma perda tecidual nervosa após a excisão de um neuroma, alcançou resultados tão eficazes, que pode ser considerado, nesse caso, como uma alternativa ao enxerto autólogo de nervo ou o enxerto de veia (THOMSEN et al., 2010).

Estudos em roedores, utilizando tubos de colágeno, têm mostrado recuperação da função equivalente ao resultado obtido com enxertos autólogos de nervo (LI et al., 1992; ARCHIBALD et al., 2005). A longo prazo, modelos experimentais em primatas, não humanos, também obtiveram resultados similares aos obtidos com anastomoses primárias e enxertos autólogos de nervo (ARCHIBALD et al., 1991).

A maioria dos dados que encontramos na literatura nos remetem a resultados com estudos experimentais, porém existem alguns materiais que são aprovados para uso clínico nos EUA e Europa, e dentre eles se encontram as

próteses tubulares sintéticas reabsorvíveis feitas de colágeno tipo I (WHITLOCK et al., 2009). Também no tratamento de lesões nos nervos digitais, relatos clínicos apontam para bons resultados quando na utilização de tubos de colágeno para o reparo desses nervos, sugerindo a sua utilização como uma opção aos enxertos autólogos de nervo (TARAS et al., 2005; LOHMEYER et al., 2007; BUSHNELL et al., 2008).

O colágeno é uma proteína que aparece em todos tecidos entre as espécies de mamíferos, apresentando um papel importante na formação da matriz do tecido nervoso. Por exemplo, o endoneuro, o qual circunda as unidades formadas pelos axônios e células de Schwann, consiste em colágeno; as bainhas epineurais e perineurais que envolvem os fascículos nervosos e reforçam a estrutura dos nervos, consistem de fibrilas colágenas orientadas longitudinalmente. Portanto, como é o principal componente estrutural dessas estruturas e uma molécula da matriz extracelular, pode apresentar vantagens específicas sobre outros materiais sintéticos ou naturais, possuindo adesividade celular e sinalizando vias críticas para os nervos (YAO et al., 2010), permitindo a proliferação de células fundamentais e também a angiogênese no local da lesão (STANG et al., 2005).

Tubos feitos a partir de materiais impermeáveis como o silicone, por exemplo, limitam a entrada de células, moléculas e fatores tróficos, enquanto tubos, como os de colágeno, permitem o acesso através das suas paredes (KEMPTON et al., 2009).

No reparo de lesões nervosas, sob a forma de tubo, o colágeno também aparece associado à cultura de células de Schwann (LOHMEYER et al., 2007; GOTO et al., 2010) e de células-tronco (GUO e DONG, 2009) com bons resultados. Sob a forma de gel apresenta-se associado ao uso da técnica com enxerto de veia (CHOI et al., 2005), à substâncias como a quitosana (WEI et al., 2003) e aos mais diversos polímeros como o ácido poli-glicólico (YOSHITANI et al., 2007; SUZUKI et al., 2009), o ácido poli-láctico-poli-glicólico (LEE et al., 2006) e o poliuretano (CUI, T. et al., 2009).

Desde Collin e Donoff (1984), que fizeram os primeiros relatos com a utilização de tubos de colágeno em regeneração nervosa, esse material vem sendo utilizado amplamente nessa linha de pesquisa, sendo extraído de diferentes fontes, como, por exemplo, do tendão do calcanhar bovino, dos tendões da cauda do rato

(OLIVEIRA et al., 2005), da pele bovina (YOSHII et al., 2003) e artificialmente (OKAMOTO et al., 2010). No caso deste nosso trabalho, a membrana de colágeno é produzida a partir da cortical óssea desmineralizada bovina. Embora, já tenham sido relatados trabalhos realizados em meados do século XX por alguns autores, em que foi utilizado osso descalcificado como tubo para regeneração nervosa, até aquele momento, pouco havia sido desenvolvido a respeito das técnicas e materiais visando o reparo em nervos, sendo estes estudos pouco conclusivos (IJPMA et al., 2008).

As membranas de colágeno são muito empregadas na área de odontologia com intuito de facilitar a regeneração óssea em defeitos perenes na cavidade bucal (LEKOVIC et al., 2001; TAKEISHI et al., 2001; YAMATOGLI et al., 2005) e neste nosso estudo verificamos o seu efeito em auxiliar o processo de regeneração nervosa.

2.4 USO DO PLGA EM REGENERAÇÃO NERVOSA

Com o desenvolvimento da engenharia tecidual nas últimas duas décadas, novas estratégias voltadas para as técnicas de regeneração nervosa viabilizaram a criação de novos materiais sintéticos que pudessem ser utilizados sob a forma de tubo para guiar o brotamento axonal de fibras lesadas. Dessa forma, foi possível aumentar os resultados com a utilização dos mais diversos tipos de tubos e diminuir as morbidades decorrentes da utilização do enxerto autólogo de nervo, que se apresenta como a técnica de maior sucesso no que diz respeito à recuperação das funções após a reinervação. Esses novos materiais agem como guias para os fatores neurotróficos secretados pelas fibras lesadas, assim como protegem a região do nervo em regeneração da infiltração de tecido conjuntivo fibroso (SHEN et al., 2010).

Existem inúmeros materiais biodegradáveis sintéticos utilizados com a finalidade de reconstruir “gaps” de nervo. Dentre eles estão alguns polímeros sintéticos como o ácido poli-láctico (PLA), ácido poli-glicólico (PGA), ácido poli-láctico-poli-glicólico (PLGA), os quais apresentam algumas características favoráveis ao processo de regeneração, como estabilidade térmica, biocompatibilidade e

propriedades mecânicas adequadas. Estes materiais também são aprovados pelo FDA para inúmeras aplicações clínicas (LI et al., 2010).

O ácido poli-láctico-poli-glicólico ou também denominado poli-ácido láctico-co-ácido glicólico, o PLGA, é formado pela combinação do PLA e do PGA, e pode ser utilizado em associação com diversas substâncias, como células de Schwann (EVANS et al., 2002; HSU et al., 2004), células da medula óssea (HOU et al., 2006), células-tronco (NEWMAN e MCBURNEY, 2004) e até mesmo controlando a liberação de NGF (CAO e SCHOICHET, 1999) e IGF (YUKSEL et al., 2000) em processos de reparo em nervos. Para a realização de estudos de regeneração nervosa o PLGA é especialmente processado sob a forma de tubos porosos (Oh et al., 2008), tendo sido relatado na literatura como um dos materiais utilizados para a reconstrução do nervo facial (SHI et al., 2008), por exemplo.

O PLGA apresenta como característica o processo de degradação por hidrólise, o que gera produtos que são absorvidos facilmente pelo organismo, como o ácido láctico e o ácido glicólico. Dessa forma, o PLGA se apresenta altamente biocompatível e atóxico (MANO et al., 2004). Este copolímero requer um menor tempo para sua completa degradação, implicando menor probabilidade de reações adversas, as quais decorrem, muitas das vezes, de fragmentos cristalinos liberados pelos polímeros, cujo tempo de degradação é excessivamente longo (BERGSMA et al., 1995). O fato de ser reabsorvível também lhe confere menor risco de infecções, tende a provocar uma resposta menor do tecido conjuntivo, impede a compressão do próprio tecido nervoso em regeneração e evita que, se deslocado, cause dano a outra região ou estrutura adjacente (CHALFOUN et al., 2006).

Outras características importantes são relatadas sobre o PLGA quando utilizado como tubo condutor para regeneração nervosa, como o fato de ser um material que permite controlar a troca de nutrientes através da sua superfície devido a sua microporosidade. O fato de ser um material reabsorvível também elimina a necessidade de uma segunda cirurgia para sua remoção (GRIFFITH, 2002).

Este copolímero é conhecido por ser de fácil produção, apresentar uma baixa resposta inflamatória (YUCEL et al., 2010), suportar a sutura cirúrgica e proteger os axônios em regeneração da invasão pelo tecido conjuntivo (HUANG e HUANG, 2006), com resultados superiores aos encontrados em trabalhos utilizando a já fundamentada técnica de enxerto venoso para regeneração nervosa (LEE et al.,

2006). Atualmente, aparece como um dos materiais mais utilizados com a finalidade de promover o “sprouting” (brotamento) axonal (EVANS et al., 2000; BRYAN et al., 2003; BINI et al., 2004).

O PLA degrada lentamente, gerando unidades cristalinas que podem causar uma resposta inflamatória prolongada por parte do tecido. Por outro lado, o PLG degrada tão rapidamente, que se torna inconveniente para a maioria das aplicações. A grande vantagem da utilização do copolímero constituído pelas unidades monoméricas dos dois polímeros (PLA e PLG) é poder variar a proporção entre elas e otimizar o tempo de degradação do material para determinadas aplicações (REZENDE et al., 2005).

Portanto, para a confecção do copolímero PLGA são utilizadas determinadas proporções do ácido poli-láctico (PLA) e do ácido poli-glicólico, de acordo com o tempo de degradação que se pretende obter, sendo encontrados valores como 50:50 (PLA:PLG) (PIQUILLOUD et al., 2007; MADDURI et al., 2010), 75:25 (Oh et al., 2008; HE et al., 2009), 85:15 (HADLOCK et al., 1999; CHANG et al., 2005) e 90:10 (CHANG et al., 2007) em diversos estudos de regeneração nervosa.

2.5 TÉCNICA DE ENXERTO DE VEIA

Embora existam muitos materiais sintéticos, desenvolvidos pelas técnicas de engenharia tecidual, nas últimas décadas, muitos pesquisadores têm colocado um considerável foco no uso de materiais biológicos para a construção de tubos condutores para regeneração nervosa. Vários tecidos autólogos têm demonstrado um aumento na capacidade regenerativa em ratos, como, por exemplo, artérias, bainhas epineurais, tendões, veias e até mesmo a lâmina basal extraída de tecido muscular (SCHMIDT e LEACH, 2003). Esses tecidos apresentam em especial, algumas moléculas biológicas que já demonstraram melhorar o processo de regeneração, como a laminina, a fibronectina e o colágeno (TARAS et al., 2005).

De uma maneira geral, com o uso desses materiais naturais têm-se a vantagem da biocompatibilidade e a diminuição dos possíveis efeitos tóxicos que podem advir do uso de alguns materiais sintéticos (CHALFOUN et al., 2006).

Dessa forma, um enxerto que viabilize a regeneração nervosa, utilizando como tubo condutor uma veia do próprio organismo, tem sido relatado como uma excelente alternativa, sendo que os primeiros trabalhos que demonstram essa técnica datam de meados de 1900 com os autores Formatti e Nageotte que usaram uma veia para construir um tubo de regeneração nervosa em roedores, sendo seguido por Platt em 1920, que realizou o primeiro enxerto venoso, com objetivo de restaurar o nervo facial em humanos (TARAS et al., 2005).

As veias podem ser facilmente obtidas, sem grandes danos, pois são amplamente distribuídas pelo corpo e suas áreas de drenagem podem ser supridas pelas inúmeras anastomoses existentes, gerando, portanto, menor morbidade à área doadora do que os enxertos autólogos de nervo (GRAVVANIS et al., 2004). Em especial, a veia jugular externa apresenta algumas vantagens que viabilizam a sua utilização nas técnicas de enxertia, como um maior diâmetro, permitindo maior qualidade na sutura e recobrimento dos cotos nervosos; ausência de válvulas, que podem se tornar uma barreira ao crescimento axonal; e ainda apresenta comprimento suficiente para as técnicas de tubulização (FERNANDES et al., 2007).

Da mesma forma, as veias se distribuem ao lado dos nervos periféricos por todo o corpo, sendo a superfície externa desses vasos um meio formado por substâncias conhecidas pelas fibras nervosas.

Na camada mais externa da veia, na túnica adventícia, existe uma grande concentração de colágeno, enquanto mais internamente, na túnica média está presente grande quantidade de laminina. Essas duas substâncias, a laminina e o colágeno, já comprovadamente apresentaram efeito benéfico sobre fibras nervosas em regeneração, acelerando esse processo e aumentando o número de axônios regenerados (FERRARI et al., 1999; OLIVEIRA et al., 2005). Em especial, a laminina é conhecida por oferecer substrato ao crescimento rápido e profuso dos neuritos (LANDER et al., 1985; LI et al., 1992).

Outras características das paredes do vaso como anti-imunogenicidade, permeabilidade à substâncias externas ao enxerto, e presença de grande quantidade de fatores tróficos, também contribuíram com o sucesso da técnica. Os enxertos venosos já demonstraram sua eficácia em proteger os axônios em regeneração da invasão de tecido fibroso cicatricial, assim como permitem que

vasos sanguíneos atinjam a zona de reparo através de suas paredes (WANG et al., 1993, 1995).

Além dessas propriedades, as veias também liberam VEGF (vascular endothelial growth factor), que apresenta efeitos neurotróficos sobre o brotamento de axônios em regeneração, tendo sido utilizado o VEGF sob a forma de terapia em lesões de nervos periféricos, pois estimula a produção de novos capilares. Este aumento da vascularização é um fator essencial ao processo de regeneração devido ao aumento da atividade metabólica do neurônio que busca se restabelecer após uma lesão (KARAGOZ et al., 2009).

Em pequenos “gaps”, o enxerto venoso apresenta resultados comparáveis aos obtidos com os enxertos autólogos de nervo, sendo esta última considerada, de uma maneira geral, a técnica com melhores resultados. Já no caso da reconstrução de longos defeitos, o enxerto de veia não se apresenta como uma técnica muito efetiva, pois as finas paredes da veia podem colabar, causando constrição no centro do enxerto impedindo a chegada das fibras do coto proximal em direção ao coto distal (CHOI et al., 2005), sendo para a prática clínica uma técnica pouco recomendada para “gaps” acima de 5 cm.

Devido a esta limitação da técnica de enxerto venoso, passaram então a ser desenvolvidos outros estudos associando o uso do enxerto de veia com o preenchimento de vários tecidos, como de músculo estriado esquelético (GEUNA et al., 2000; RAIMONDO et al., 2005), medula óssea (DEZAWA et al., 2001) e gordura (MOHAMMADI et al., 2010).

Embora o enxerto venoso seja uma técnica bastante difundida, em 1993 Wang et al., introduziram a técnica da veia invertida, uma modificação da técnica padrão com veia, no sentido de se obter reparo em lesões nervosas periféricas. Nessa nova técnica, a veia é coletada de uma região, sendo simplesmente virada ao avesso, colocando a túnica adventícia voltada para o lúmen deste tubo de veia, expondo então os axônios em regeneração, diretamente a esta camada, ou seja, agora as paredes internas do tubo de veia não seriam mais formadas por células endoteliais, que são desconhecidas pelas fibras nervosas e que poderiam gerar perda do enxerto.

Essa técnica visa principalmente o contato dos axônios em regeneração com a túnica adventícia do vaso. Essa camada confere ao enxerto, além de

moléculas importantes, nervos simpáticos e parassimpáticos, os quais também apresentam células de Schwann, o que torna a veia uma facilitadora ainda maior do crescimento axonal, pois oferece um tipo celular fundamental no processo de regeneração nervosa. Outros resultados positivos foram encontrados com estudos utilizando a técnica da veia invertida, demonstrando os benefícios dessa técnica quando comparada com a técnica de enxerto venoso padrão e de enxerto autólogo de nervo, tanto para nervos motores (KELLEHER et al., 2001) quanto sensitivos (FERRARI et al., 1999).

Até mesmo em estudos realizados visando à recuperação de áreas do SNC, a túnica adventícia já demonstrou ser uma fonte potencial de células progenitoras nervosas, sendo utilizada após processos de isquemia (YAMASHIMA et al., 2004).

Dessa forma, conhecendo-se as propriedades benéficas para a regeneração nervosa, tanto das veias, sendo utilizadas totalmente como tubo, quanto dos efeitos positivos de cada camada do vaso, em especial da túnica adventícia no processo de regeneração nervosa, este estudo teve como objetivo, utilizar tubos feitos a partir de duas membranas diferentes, tendo como material de preenchimento a própria veia jugular externa, no sentido de verificar a eficácia desse tecido biológico em associação com os tubos feitos de colágeno e PLGA, sendo estes já reconhecidamente materiais auxiliares do crescimento axonal.

3 Proposição

3 PROPOSIÇÃO

3.1 OBJETIVO GERAL

Este estudo teve como objetivo avaliar a possibilidade da utilização de duas membranas, uma sintética e outra biológica (de origem animal), sob a forma de tubo, no processo de regeneração nervosa do nervo isquiático, após remoção de um segmento de 10 mm do nervo. Além disso, nós propusemos verificar os possíveis efeitos benéficos do preenchimento desses tubos com a veia jugular externa no processo de regeneração de um nervo periférico, através de técnicas de microcirurgia.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o processo de regeneração nervosa do nervo isquiático, em ratos, a partir da utilização de membranas desenvolvidas originalmente para neoformação óssea, sendo uma de colágeno (cortical óssea desmineralizada bovina - GenDerm, Baumer S.A., Divisão Genius), e a outra de PLGA (material em desenvolvimento a ser denominado – GenDerm PLGA, Baumer S.A., Divisão Genius), utilizando a técnica de reparo tubular, ou seja, deixando essas membranas sob a forma de tubo, para verificar se as mesmas poderiam ser utilizadas com um meio condutor para o crescimento axonal de fibras nervosas lesadas.
- Avaliar a capacidade de promover ou aumentar a regeneração nervosa através da presença de um segmento da veia jugular externa como um tecido de preenchimento, internamente aos tubos feitos com as membranas.
- Realização de morfometria das fibras mielínicas dos nervos que se regeneraram, verificando o diâmetro dessas fibras nervosas e a espessura da sua bainha de mielina, uma vez que, quanto mais mielinizada é uma fibra, maior a possibilidade de recuperação funcional.

4 Material e Métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 94 ratos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Wistar, machos, adultos, com 60 dias de idade e peso de aproximadamente 300g. Esta idade foi escolhida com o objetivo de evitar a perda de animais por doenças relacionadas ao envelhecimento, sendo estes considerados animais adultos jovens. Esses animais foram provenientes do Biotério Central da Faculdade de Odontologia de Bauru- FOB/USP/Bauru, sendo este projeto aprovado pela Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais da FOB/USP/Bauru (Apêndice A).

Os animais foram mantidos em caixas de plástico, 5 animais por caixa, com água e comida “*ad libitum*”, com ciclos claro/escuro de 12 h, com temperatura e umidade controladas. Os 94 animais foram divididos em 8 grupos experimentais e 6 grupos controles. Esses grupos foram divididos em dois períodos, com animais sacrificados 6 e 12 semanas após as cirurgias.

GRUPOS CONTROLE

Grupo Controle Normal do 1º período (GCNI).

Neste grupo formado por 5 animais ocorreu o sacrifício dos mesmos após 102 dias de vida, simulando o período total de vida dos animais dos grupos experimentais do 1º período (60 dias no período pré-cirúrgico e 42 dias no período pós-cirúrgico). Nesses animais foi coletado um segmento do nervo isquiático para a realização da morfometria das suas fibras mielínicas e aferição da espessura das suas bainhas de mielina.

Grupo Controle Normal do 2º período (GCNII).

Neste grupo formado por 5 animais foram realizados os mesmos procedimentos do grupo anterior, sendo que ocorreu o sacrifício dos mesmos após 144 dias de vida, simulando o período total de vida dos animais dos grupos experimentais do 2º período (60 dias de vida no período pré-cirúrgico e 84 dias no período pós-cirúrgico). Nesses animais foi coletado um segmento do nervo isquiático

para a realização da morfometria das suas fibras mielínicas e aferição da espessura das suas bainhas de mielina.

Grupo Controle Operado e Suturado com fio 10.0 do 1º período (GCOI).

Neste grupo formado por 5 animais, aos 60 dias de vida foram realizadas as cirurgias. Com o animal em decúbito ventral, foi feita uma incisão de 2 cm na sua coxa direita, seguida da divulsão da musculatura para a exposição do nervo isquiático. Posteriormente, foi feita uma sutura epineural em dois pontos do nervo, preservando uma distância entre os pontos de 10 mm, sem qualquer tensão, utilizando fio de sutura de nylon 10.0 (ANEXO A). Esta sutura foi realizada com o objetivo de manter os cotos proximal e distal posicionados, um de frente para o outro, para facilitar o processo de auto-reparo do nervo.

Em seguida, o segmento de nervo de 10 mm entre as suturas é removido com instrumentais de microcirurgia (ANEXO B). A distância de 10 mm, que simula uma lesão com essa extensão, é medida com sonda periodontal, para sua confirmação (ANEXO C). Para finalizar a cirurgia, foi feita a sutura da pele do animal com fio 5.0. Esses animais foram sacrificados 6 semanas após as cirurgias, sendo que naqueles em que houve regeneração, foi coletado um segmento da porção central do cabo de regeneração para a realização da morfometria das suas fibras mielínicas e aferição da espessura das suas bainhas de mielina. Da mesma maneira foi feito para o coto distal, para verificação tanto da presença de fibras nervosas com padrão de normalidade quanto de fibras degeneradas.

Grupo Controle Operado e Suturado com fio 10.0 do 2º período (GCOII).

Neste grupo formado por 5 animais, aos 60 dias de vida foram realizadas as cirurgias. Nestes animais foram realizados os mesmos procedimentos do grupo anterior, com exceção de que o seu sacrifício ocorreu 12 semanas após as cirurgias.

Grupo Controle Desnervado do 1º período (GCDI).

Neste grupo formado por 5 animais, aos 60 dias de vida foram realizadas as cirurgias. Com o animal em decúbito ventral, foi feita uma incisão de 2 cm na sua coxa direita, seguida da divulsão da musculatura para a exposição do nervo

isquiático e remoção de um segmento de 10 mm do nervo. O coto proximal foi suturado profundamente na musculatura adjacente, enquanto o coto distal foi suturado no tecido subcutâneo, bem isolados um do outro, com o objetivo de impedir o processo de auto-reparo do nervo, ou seja, impedir o crescimento de fibras de regeneração do coto proximal em direção ao coto distal. Após 6 semanas, os animais foram sacrificados e a região operada foi avaliada para verificar se realmente não houve regeneração do nervo. Para comprovar a degeneração do nervo isquiático foi coletado um segmento do seu coto distal para comprovação da ausência de fibras mielínicas, e quando na existência de algumas fibras foi realizada a sua morfometria e aferição da espessura das suas bainhas de mielina.

Grupo Controle Desnervado do 2º período (GCDII).

Neste grupo formado por 5 animais, aos 60 dias de vida foram realizadas as cirurgias. Nestes animais foram realizados os mesmos procedimentos do grupo anterior, com exceção de que o seu sacrifício ocorreu 12 semanas após as cirurgias.

GRUPOS EXPERIMENTAIS DO 1º PERÍODO (6 SEMANAS)

Grupo I (GI): Enxerto com prótese tubular de colágeno do 1º período.

Neste grupo formado por 8 animais, aos 60 dias de vida foram realizadas as cirurgias. Com o animal em decúbito ventral, foi feita uma incisão de 2 cm na sua coxa direita, seguida da divulsão da musculatura para a exposição do nervo isquiático. Posteriormente, foi feita uma sutura epineural em dois pontos distintos do nervo, preservando uma distância entre os pontos de 10 mm, sem qualquer tensão, utilizando fio de sutura de nylon 10.0. Em seguida, o segmento de nervo de 10 mm entre as suturas é removido. Esta sutura é feita com o objetivo de manter os cotos proximal e distal posicionados, um de frente para o outro, para que não saiam de dentro do tubo de colágeno e comprometam a regeneração. As membranas de colágeno (GenDerm, Baumer S.A., Divisão Genius), que apresentavam-se planas, foram passadas por baixo do fio 10.0, sendo então enroladas, para se formar um tubo (ANEXO D). Este tubo apresentou um comprimento de 14 mm e diâmetro da espessura do nervo, que é aproximadamente 1 mm (LEE et al., 2006).

Foram realizadas três amarrações, com fio de sutura Vycril® 4.0, próximas aos cotos proximal e distal, e outra na porção central do enxerto, para manutenção da membrana fechada e do seu formato cilíndrico (ANEXO E). Cada coto nervoso foi inserido 2 mm dentro do tubo e procedeu-se a sutura no epineuro e nas extremidades dos tubos, com fio de nylon 10.0, afim de impedir o deslocamento do tubo. O fato da sutura epineural estar afastada 2 mm das extremidades dos cotos nervosos impede que a linha de sutura avance sobre os neuritos em crescimento, reduzindo a possibilidade da formação de neuromas (WANG et al., 1993).

Após as 6 semanas, foi feita a abertura de ferida cirúrgica e foram coletados fragmentos da porção média do enxerto e do coto distal do nervo, para verificar se as fibras nervosas em regeneração, após passarem pelo centro do enxerto, atingiram o coto distal.

Grupo II (GII): Enxerto com prótese tubular de colágeno com preenchimento de veia jugular externa do 1º período.

Neste grupo formado por 8 animais, aos 60 dias de vida foram realizadas as cirurgias. Com o animal em decúbito dorsal foi realizada uma incisão paramediana no lado direito do pescoço do animal e exposição da veia jugular externa. Em seguida, foi realizado o isolamento e ligadura da veia do animal, para contenção de possível hemorragia, e foi removido um segmento de 5 mm, que teve suas extremidades suturadas, para o isolamento das células endoteliais dentro da veia, uma vez que a exposição desses tipos celulares dentro do enxerto poderia não ser benéfica por não estarem normalmente expostas ao tecido nervoso. Essa pequena porção de veia foi imersa em solução fisiológica. Em seguida, procedeu-se a sutura da pele do pescoço do animal, na região do pescoço, com fio de seda 5.0.

Depois, com o animal em decúbito ventral, foi feita uma incisão de 2 cm na sua coxa direita, seguida da divulsão da musculatura para a exposição do nervo isquiático. Neste momento, é feita uma sutura epineural em dois pontos distintos do nervo, preservando uma distância entre os pontos de 10 mm, sem qualquer tensão, utilizando fio de sutura de nylon 10.0. Em seguida, o segmento de nervo de 10 mm entre as suturas é removido. As membranas de colágeno foram passadas por baixo do fio 10.0 e o segmento de veia foi colocado próximo ao coto proximal, com o

objetivo de que a veia estimule e libere substâncias tróficas sobre as fibras lesadas (ANEXO F).

Em seguida, a membrana é enrolada e forma-se o tubo. Este tubo apresentou um comprimento de 14 mm e diâmetro da espessura do nervo, aproximadamente 1 mm (LEE et al., 2006). Foram realizadas três amarrações, com fio de sutura Vycril® 4.0, próximas aos cotos proximal e distal e, outra na porção central do enxerto, para manutenção da membrana fechada e do seu formato cilíndrico. Cada coto nervoso foi inserido 2 mm dentro do tubo e procedeu-se a sutura no epineuro e nas extremidades dos tubos, com fio de nylon 10.0, afim de impedir o deslocamento do tubo. Após 6 semanas, foi feita a abertura de ferida cirúrgica e foram coletados fragmentos da porção média do enxerto e do coto distal do nervo, para verificar se as fibras nervosas em regeneração, após passarem pelo centro do enxerto atingiram o coto distal.

Grupo III (GIII): Enxerto com prótese tubular de PLGA do 1º período.

Neste grupo formado por 8 animais, aos 60 dias de vida foram realizadas as cirurgias. Com o animal em decúbito ventral, foi feita uma incisão de 2 cm na sua coxa direita, seguida da divulsão da musculatura para a exposição do nervo isquiático. Neste momento, é feita uma sutura epineural em dois pontos distintos do nervo, preservando uma distância entre os pontos de 10 mm, sem qualquer tensão, utilizando fio de sutura de nylon 10.0. Em seguida, o segmento de nervo de 10 mm entre as suturas é removido, da mesma maneira como foi feito para o grupo GI. As membranas de PLGA (material em desenvolvimento a ser denominado GenDerm PLGA, Baumer S.A., Divisão Genius), que apresentavam-se planas, foram passadas por baixo do fio 10.0, sendo então enroladas, para se formar um tubo. Este tubo apresentou um comprimento de 14 mm e diâmetro da espessura do nervo, aproximadamente 1 mm (LEE et al., 2006). Foram realizadas três amarrações, com fio de sutura Vycril® 4.0, próximas aos cotos proximal e distal, e outra na porção central do enxerto, para manutenção da membrana fechada e do seu formato cilíndrico. Cada coto nervoso foi inserido 2 mm dentro do tubo e procedeu-se a sutura no epineuro e nas extremidades dos tubos, com fio de nylon 10.0, afim de impedir o deslocamento do tubo. Após 6 semanas, foi feita a abertura de ferida cirúrgica e

foram coletados fragmentos da porção média do enxerto e do coto distal do nervo, para verificar se as fibras nervosas em regeneração, após passarem pelo centro do enxerto, atingiram o coto distal.

Grupo IV (GIV): Enxerto com prótese tubular de PLGA com preenchimento de veia jugular externa do 1º período.

Neste grupo formado por 8 animais, aos 60 dias de vida foram realizadas as cirurgias. Com o animal em decúbito dorsal foi realizada uma incisão paramediana no lado direito do pescoço do animal e exposição da veia jugular externa. Em seguida, foi realizado o isolamento e ligadura da veia do animal, para contenção de possível hemorragia, foi removido um segmento de 10 mm, que teve suas extremidades suturadas, para o isolamento das células endoteliais dentro da veia, uma vez que a exposição desses tipos celulares dentro do enxerto poderia não ser benéfica, por não estarem normalmente expostas ao tecido nervoso. Essa pequena porção de veia foi imersa em solução fisiológica. Em seguida, procedeu-se a sutura da pele do pescoço do animal com fio 5.0.

Depois, com o animal em decúbito ventral, foi feita uma incisão de 2 cm na sua coxa direita, seguida da divulsão da musculatura para a exposição do nervo isquiático e remoção de um segmento de 10 mm da porção média do nervo. O segmento de veia foi colocado próximo ao coto proximal e, a membrana de PLGA é enrolada e forma-se o tubo. São feitas as três amarras no tubo para manutenção do seu formato cilíndrico. Dentro do tubo, foi colocada a veia jugular externa, próxima à extremidade voltada para o coto proximal. Cada coto nervoso foi inserido 2 mm dentro do tubo e procedeu-se outra sutura no epineuro e nas extremidades dos tubos com fio de nylon 10.0. Após 6 semanas foi feita a abertura de ferida cirúrgica e foram coletados fragmentos da porção média do enxerto e do coto distal, para verificar se as fibras nervosas em regeneração, após passarem pelo centro do enxerto, atingiram o coto distal.

GRUPOS EXPERIMENTAIS DO 2º PERÍODO (12 SEMANAS)

Grupo V (GV): Enxerto com prótese tubular de colágeno do 2º período.

Neste grupo formado por 8 animais, aos 60 dias de vida foram realizadas as cirurgias. Todos os procedimentos realizados neste grupo são iguais aos realizados no grupo GI, com exceção de que neste grupo os animais foram sacrificados após 12 semanas das cirurgias.

Grupo VI (GVI): Enxerto com prótese tubular de colágeno com preenchimento de veia jugular externa do 2º período.

Neste grupo formado por 8 animais, aos 60 dias de vida foram realizadas as cirurgias. Todos os procedimentos realizados neste grupo são iguais aos realizados no grupo GII, com apenas a exceção de que neste grupo os animais foram sacrificados após 12 semanas das cirurgias.

Grupo VII (GVII): Enxerto com prótese tubular de PLGA do 2º período.

Neste grupo formado por 8 animais, aos 60 dias de vida foram realizadas as cirurgias. Todos os procedimentos realizados neste grupo são iguais aos realizados no grupo GIII, com exceção de que neste grupo os animais foram sacrificados após 12 semanas das cirurgias.

Grupo VIII (GVIII): Enxerto com prótese tubular de PLGA com preenchimento de veia jugular externa do 2º período.

Neste grupo formado por 8 animais, aos 60 dias de vida foram realizadas as cirurgias. Todos os procedimentos realizados neste grupo são iguais aos realizados no grupo GIV, com apenas a exceção de que neste grupo os animais foram sacrificados após 12 semanas das cirurgias.

4.1 TÉCNICA CIRÚRGICA

Em todos os grupos, o nervo isquiático direito foi utilizado nas cirurgias experimentais, enquanto o nervo isquiático esquerdo foi mantido intacto. Para realização das cirurgias, a anestesia geral foi induzida com injeção intramuscular de Dopalen (Cloridrato de Quetamina) associado ao Anasedan (Cloridrato de Xilazina) na dosagem de 0,1ml/100g de massa corporal. Da mesma forma os animais foram sacrificados por dose excessiva da associação de Dopalen® e Anasedan®, em dois períodos (6 e 12 semanas). Técnica asséptica foi utilizada durante os procedimentos, assim como instrumentais de microcirurgia e microscópio cirúrgico DF Vasconcelos. As incisões na pele do animal foram realizadas após tricotomia da região, tanto para a higienização quanto para facilitar as incisões. Após as cirurgias, os animais foram colocados em ambiente aquecido para evitar a hipotermia decorrente da anestesia geral. Para que fossem feitas imagens durante as cirurgias, foi utilizado o microscópio digital (DINO- Lite Plus®), com um aumento de 20X.

4.2 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS DE NERVO

As amostras coletadas da porção média do enxerto e do coto distal foram fixadas em formol a 10% por 24 horas. Em seguida foi feita a lavagem das amostras por 24 horas em água corrente, para então serem armazenadas em álcool a 70%, por 24 horas. Para a inclusão das amostras em historesina, as mesmas foram imersas em álcool a 95% por 2 horas. Depois, as amostras passaram 4 horas em uma mistura de álcool a 95% e historesina por 4 horas. Após este período o material ficou 24 horas em historesina líquida. Na sequência, as amostras foram colocadas em fôrmas com a historesina catalisada, para permitir o seu endurecimento e confecção dos blocos. Para o corte da historesina foram produzidas navalhas de vidro a partir de um “knife-maker” (Leica - EMKMR2, Áustria), que é um cortador específico para produção dessas navalhas; e vidros especiais para confecção das navalhas. Os cortes histológicos semi-finos foram feitos com a espessura de 2 µm e corados com azul de toluidina a 1% por 15 minutos.

4.3 ANÁLISE MORFOMÉTRICA

Com a utilização de um microcomputador com um software de captura e análise de imagens, Image Pro-Plus 6.0, acoplado a um microscópio Olympus BX-50, pôde ser avaliada a presença de fibras nervosas mielínicas tanto no terço médio quanto no coto distal dos enxertos e, dessa maneira, realizar a morfometria das fibras nervosas encontradas. Para a realização das imagens, utilizou-se a objetiva de 40X do microscópio, que fornecia a melhor nitidez dos cortes para a coloração usada. Também foi possível avaliar os materiais utilizados (membranas), verificando se agregaram benefícios ao processo de regeneração nervosa, assim como avaliar aquele que apresentou o melhor potencial para tal processo. Com esse intuito, foi realizada a morfometria das fibras mielínicas e foi aferida a espessura das bainhas de mielina em cada animal em que foi encontrado tecido nervoso regenerado dentro do enxerto. Foram analisadas 100 fibras do terço médio do enxerto e 100 fibras das lâminas obtidas das amostras do coto distal de cada animal. Estas fibras foram escolhidas aleatoriamente, em diversos campos diferentes de uma mesma lâmina.

4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A partir das fibras mielínicas avaliadas, foi feita uma análise comparativa entre os grupos e períodos utilizando Análise de Variância a dois critérios e Teste de Tukey. Para aplicação da análise foi feita a transformação logarítmica dos dados, pois os grupos não passavam pelo critério de homogeneidade de variâncias. Para todas as análises, valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes. Os testes estatísticos foram aplicados através do programa Statistica v. 5.1 (StatSoft Inc., Tulsa, EUA).

4.5 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Foi realizada a microscopia eletrônica de varredura, das membranas de colágeno e PLGA, com o objetivo de observar as condições de suas superfícies,

como rugosidade, presença de imperfeições e poros nesses materiais. Para tanto, as membranas foram metalizadas, levadas ao Microscópio Eletrônico de Varredura (JEOL-T220A da FOB-USP) e fotografadas em vários aumentos, sendo apresentadas neste trabalho as imagens que melhor nos permitiram observar algumas características das superfícies destes materiais.

5 Resultados

5 RESULTADOS

5.1 OBSERVAÇÕES MACROSCÓPICAS

Durante os experimentos, observou-se que, após a secção do nervo isquiático, os animais apresentavam paralisia da pata posterior direita (ANEXO G), conforme o esperado. Como consequência, na segunda abordagem cirúrgica, onde os animais seriam sacrificados, a musculatura da pata, naqueles em que não houve regeneração, apresentou-se bastante atrofiada. Embora esse quadro gerasse certa dificuldade para a locomoção dos animais, os mesmo conseguiam se movimentar pela caixa. Em alguns animais do grupo GCDI e GCDII foi observada a autofagia dos dedos da pata posterior direita do animal, que ocorre como uma resposta do animal à perda da sensibilidade dos dedos.

Ao longo do período experimental, 4 animais morreram, sendo 2 em decorrência da anestesia geral, 1 por estresse e 1 por complicações pós-cirúrgicas, porém todos foram repostos, sem perda em número para os grupos.

No momento da 2ª cirurgia, em torno de todos os enxertos, foi observado o crescimento de uma fina cápsula de tecido fibroso, fato que, inclusive, facilitou localizar os tubos.

5.2 DEGRADAÇÃO DOS MATERIAIS

Na cirurgia de sacrifício dos animais do 1º período foi possível observar que as membranas de colágeno já estavam completamente reabsorvidas, pois não havia na região do enxerto nenhum resíduo deste material. Já nos animais em que foi utilizada a membrana de PLGA, ao final do 1º período, ainda era possível observar o tubo feito com a membrana, embora tenha apresentado paredes bem menos espessas. Após as 12 semanas, nos enxertos, foi possível confirmar a degradação total dos tubos feitos com as membranas de PLGA.

5.3 ANÁLISE DE MATERIAL HISTOLÓGICO

Embora, tenha ocorrido regeneração de fibras nervosas na maioria dos enxertos, os valores do diâmetro dessas fibras foram inferiores, quando comparados como os grupos controles (GCNI e GCNII). Essa condição pode ser observada quando se comparam as imagens dos grupos GCNI (ANEXO H) com os grupos experimentais GI, GII e GIII (ANEXOS I, J e K). No grupo GCNI observou-se um grande número de fibras mielínicas maduras e de axônios bem-orientados, com um padrão de organização típico de um nervo sadio, em que as fibras apresentam-se divididas por três membranas de tecido conjuntivo: o endoneuro, em torno de cada fibra; o perineuro, envolvendo cada fascículo; e o epineuro delimitando todo o nervo (ANEXO H).

Em alguns cortes histológicos realizados com material coletado do terço médio dos enxertos, verificou-se, além de fibras regeneradas, muitos fibroblastos em decorrência da invasão de tecido conjuntivo fibroso dentro do enxerto, como no grupo GIV (ANEXOS L e M).

Nos grupos GCOI e GCOII, na região do enxerto não foram encontradas fibras nervosas regeneradas nos períodos experimentais avaliados, apenas tecido conjuntivo com abundantes fibroblastos (ANEXO N). No coto distal destes grupos foi possível observar a presença de muitas fibras nervosas em degeneração (ANEXO O).

Em alguns animais dos grupos experimentais não houve crescimento de fibras nervosas regeneradas dentro do enxerto, nos quais verificou-se a substituição do tecido nervoso, também no coto distal, por um tecido conjuntivo, repleto de fibroblastos e algumas poucas fibras nervosas em processo de degeneração, como em um animal do grupo GIII (ANEXO P).

No grupo GCNII, observamos um grande número de fibras maduras, mielínicas e de axônios bem-orientados, com um padrão de organização típico de um nervo sadio (ANEXO Q). No 2º período experimental, o grupo GV foi aquele que apresentou a menor quantidade de fibras mielínicas, assim como os menores diâmetros (ANEXO R). Enquanto nos outros grupos GVI, GVII e GVIII (ANEXOS S, T e U), foi possível verificar a presença de fibras nervosas mielínicas, embora sempre em menor quantidade do que no grupo GCNII (ANEXO Q).

Dentro dos enxertos foi observada a presença de vários vasos sanguíneos em meio ao tecido nervoso, fato que muitos autores acreditam ser essencial para o processo de regeneração, pois esses capilares podem funcionar como guias, atraindo os novos microfascículos em regeneração, que agiriam como estruturas satélites do capilar, em direção ao coto distal. Em GII, por exemplo, encontramos inúmeros vasos sanguíneos na porção central do enxerto (ANEXO V).

5.4 ANÁLISE DAS FIBRAS NERVOSAS MIELÍNICAS

Para a análise dos dados morfométricos, foram feitos a Análise de Variância e o Teste de Tukey para a comparação dos 8 grupos experimentais e 2 controles (os grupos GCOI, GCOII, CDI e CDII não entraram na análise, por não ocorrer regeneração neste grupos), sendo adotado nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

Através de microscopia óptica dos cortes histológicos do terço médio do enxerto, verificou-se uma variabilidade na área do tecido nervoso, com presença de fibras regeneradas em todos os grupos, sendo que em GI e GII encontrou-se uma maior quantidade de fibras mielínicas distribuídas pela região central do enxerto (ANEXOS I e J), ainda assim em quantidade inferior a encontrada em GCNI.

Entre todos os grupos, ao analisarmos o terço médio do enxerto, GI apresentou o menor valor médio para o diâmetro das fibras mielínicas em regeneração (3,41 μm), embora neste grupo essas fibras estivessem visivelmente em maior quantidade que nos outros grupos. O maior valor médio foi aquele encontrado nas fibras do grupo GII, sendo de 5,8 μm (Tabela 1).

Quanto ao uso do PLGA, este material apresentou um resultado melhor no 2º período, possivelmente pelo fato de estar totalmente degradado em 12 semanas, não existindo mais produtos de degradação na região do enxerto, que podem interferir no processo de regeneração.

No que diz respeito ao diâmetro das fibras mielínicas encontrado no coto distal dos grupos experimentais, em GI foi encontrado o menor valor médio dos diâmetros das fibras mielínicas (3,50 μm), enquanto em GII novamente foi

encontrado o maior valor (5,72 μm). Entre os outros grupos os valores encontrados não apresentaram diferença significativa entre si (Tabela 2).

Tabela 1 - Dados morfométricos referentes às fibras mielínicas encontradas no terço médio (TM) dos enxertos e nos grupos controle normais. D = Diâmetro da fibra, E = Espessura da bainha de mielina.

Grupo	D(μm)		E(μm)	
	Média	dp	Média	dp
GI	3,41 ^a	0,41	0,73 ^a	0,09
GII	5,80 ^{bc}	0,65	1,65 ^c	0,18
GIII	5,02 ^b	0,73	1,21 ^b	0,17
GIV	5,41 ^{bc}	0,62	1,16 ^b	0,13
GV	5,17 ^{bc}	0,64	1,34 ^b	0,17
GVI	5,16 ^{bc}	0,33	1,12 ^b	0,07
GVII	5,64 ^{bc}	0,46	1,31 ^b	0,11
GVIII	4,94 ^b	0,28	1,18 ^b	0,06
GCN I	6,55 ^{cd}	0,65	2,29 ^d	0,23
GCN II	7,64 ^d	1,23	2,67 ^d	0,43

Grupos com a mesma letra não possuem diferença entre si

Tabela 2 - Dados morfométricos referentes às fibras mielínicas encontradas no coto distal (CD) do nervo isquiático dos animais dos grupos experimentais e dos grupos controle normais. D = Diâmetro da fibra, E = Espessura da bainha de mielina.

Grupo	D(μm)		E(μm)	
	Média	dp	Média	dp
GI	3,50 ^a	0,39	0,70 ^a	0,08
GII	5,72 ^{bc}	0,62	1,54 ^{bc}	0,17
GIII	5,21 ^b	0,34	1,82 ^{cd}	0,12
GIV	5,42 ^{bc}	0,59	1,35 ^b	0,15
GV	5,28 ^{bc}	0,37	1,74 ^{cd}	0,12
GVI	5,23 ^{bc}	0,54	1,83 ^d	0,19
GVII	5,23 ^{bc}	0,26	1,47 ^b	0,07
GVIII	4,97 ^b	0,58	1,44 ^b	0,17
GCN I	6,41 ^{cd}	0,56	2,24 ^d	0,20
GCN II	7,64 ^d	1,23	2,67 ^d	0,43

Grupos com a mesma letra não possuem diferença entre si

Todos esses dados indicam que no 1º período, o material que apresentou o melhor desempenho, no sentido de auxiliar o processo de regeneração, foi o tubo feito com a membrana de colágeno, enquanto que no 2º período o material que mais contribuiu com a regeneração foi o PLGA.

Embora, tenham sido encontradas fibras nervosas regeneradas em todos os grupos experimentais, entre todos os grupos comparados, o valor médio dos diâmetros das fibras mielínicas foi menor que nos grupos controles GCNI e GCNII (Gráfico 1).

Gráfico 1 – Representação gráfica do valor do diâmetro médio das fibras nervosas em regeneração, encontradas tanto no terço médio (TM) do enxerto, quanto no coto distal (CD) dos enxertos realizados em todos os grupos.

Da mesma forma, o índice de mielinização, verificado a partir da espessura da bainha de mielina, ficou abaixo daquele encontrado em fibras nervosas dos grupos controle GCNI e GCNII (Gráfico 2), sendo que nestes grupos foi possível confirmar uma morfologia normal, característica de um nervo sadio.

Gráfico 2 – Representação gráfica do valor da espessura média das bainhas de mielina das fibras nervosas em regeneração, encontradas tanto no terço médio (TM) do enxerto, quanto no coto distal (CD) dos enxertos realizados em todos os grupos.

5.5 ANÁLISE DA MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

As superfícies das membranas foram observadas através das imagens de microscopia eletrônica de varredura, em que foi possível verificar as condições das superfícies dos dois materiais. As imagens apresentadas foram aquelas cujo aumento permitiu visualizar algumas características que podem contribuir com o reparo nervoso ou interferir nesse processo, como lisura de superfície e porosidade. Na imagem da membrana de PLGA observamos as ondulações presentes neste material (ANEXO W) e, em um maior aumento, verificamos uma superfície bastante lisa e homogênea (ANEXO X), que pode auxiliar o crescimento axonal, favorecendo o desenvolvimento de uma matriz bem organizada. Na imagem da membrana de colágeno foram vistas algumas irregularidades e também alguns poros distribuídos pelo material (ANEXO Y).

6 Discussão

6 DISCUSSÃO

O propósito deste estudo foi avaliar duas membranas reabsorvíveis, uma de colágeno e outra de PLGA, no processo de regeneração em um nervo periférico, no caso, o nervo isquiático, o mais calibroso dentre os nervos espinhais. Embora esses dois materiais já tenham sido utilizados com essa finalidade em outros estudos, partimos da utilização de membranas desenvolvidas e com resultados comprovados como barreiras biológicas na técnica de regeneração óssea guiada. Portanto, essas membranas favorecem a neoformação de tecido ósseo e não nervoso, diferentemente dos outros trabalhos, em que os materiais haviam sido desenvolvidos exclusivamente para as técnicas de tubulização.

Da mesma forma, avaliamos a técnica da utilização da veia jugular externa em regeneração nervosa, porém de uma maneira totalmente diferente da qual já foi utilizada (CHIU, 1983; CHIU e STRAUCH, 1990; PU et al., 1990; WANG et al., 1993; WANG, et al., 1995; FERRARI et al., 1999; BARCELOS et al., 2003; ALLET, et al., 2003; CHOI et al., 2005; ACAR, et al., 2008; KARAGOZ, et al., 2009), ou seja, agora esse vaso funciona como tecido de preenchimento para os tubos preparados a partir das membranas.

O rato foi escolhido por ser o modelo animal mais utilizado em cirurgias do nervo isquiático, por ser de baixo custo, fácil manipulação e pela sua capacidade de regeneração nervosa ser equivalente a dos primatas (MACKINNON et al., 1985), cuja velocidade regenerativa favorece estudos de curto período de duração (MAZZER et al., 2008).

Porém, este modelo animal tem alguns inconvenientes. Logo, muito cuidado deve ser tomado ao se estabelecer paralelos entre estudos realizados em roedores e a aplicação clínica. Talvez, a melhor característica do rato, além da sua alta capacidade regenerativa, seja sua habilidade em alcançar uma recuperação funcional em modelos de lesões em nervos, o que seria impossível no ser humano em um mesmo período. Da mesma maneira, estudos comparativos de técnicas ou materiais para regeneração nervosa não devem ser realizados com um período experimental muito longo, uma vez que existe, a partir de 15 semanas, um aumento expressivo da capacidade regenerativa do animal, chamado “blow through” (WITHLOCK et al., 2009), em que, independentemente da técnica, a regeneração

pode atingir altos níveis, mascarando assim os resultados. Partindo desses princípios, escolhemos dois períodos, 6 e 12 semanas, para que a avaliação comparativa dos materiais e da técnica cirúrgica apresentasse resultados mais fidedignos, por serem períodos mais curtos do que aqueles muitas vezes apresentados na literatura (PFISTER et al., 2007; WHITLOCK et al., 2009; YAO et al., 2010; OKAMOTO et al., 2010).

Ao escolhermos os materiais para serem utilizados em nosso estudo, nos atentamos ao fato de que existem alguns requisitos fundamentais para o desenvolvimento de tubos utilizados em reparo de nervos periféricos. Em especial, essas próteses tubulares devem prevenir a invasão de tecido fibroso cicatricial e ser permeáveis, permitindo a passagem de nutrientes e a revascularização do tecido nervoso (KARAGOZ et al., 2009). Pelo fato de serem materiais reabsorvíveis, previnem a resposta inflamatória crônica, que é a maior responsável pelos quadros de dor em lesões de nervos periféricos. Outra característica favorável desses materiais está na ausência de necessidade de um segundo procedimento cirúrgico para remoção do tubo, devido a sua reabsorção (GRIFFITH, 2002).

Comprovadamente, em nosso estudo, ficou evidente o processo de degradação dos materiais durante a abertura do sítio onde foi realizado o procedimento, no período de sacrifício, constatando a ausência das membranas ao final de 12 semanas e presença de fibras nervosas em regeneração. Por esta razão, destacamos o potencial existente tanto nas membranas de Colágeno quanto de PLGA (Baumer S.A.), em processos de regeneração de nervos periféricos.

Para avaliar a qualidade dessas fibras nervosas presentes no terço médio do enxerto, foi feita a avaliação dos diâmetros das fibras mielínicas. Esse método é de particular importância no controle da qualidade da regeneração nervosa, uma vez que os maiores diâmetros são pertencentes às fibras motoras, sendo desejável, portanto, que sejam encontrados os maiores valores possíveis de diâmetro, para que existam mais fibras motoras regeneradas e para que se tenha o retorno da função motora perdida (ROSEN et al., 1989). Partindo desse princípio, os valores médios dos diâmetros das fibras nervosas regeneradas foram intensamente analisados e comparados a outros dados da literatura.

Comparando os grupos experimentais do 1º período (6 semanas), o grupo em que se utilizou a membrana de colágeno associada à veia jugular externa como

preenchimento (GII), apresentou o melhor resultado. Provavelmente, esse fato é devido à associação das características benéficas tanto do colágeno quanto da presença da veia jugular.

O colágeno é um polímero natural, biodegradável e tem boa afinidade pelos tecidos vivos. É conhecidamente um elemento promotor da proliferação celular em geral e do reparo tecidual, além de produzir menor quantidade de tecido cicatricial e reposta inflamatória, sendo reabsorvido muito mais rapidamente que outros materiais biodegradáveis (OKAMOTO et al., 2010).

A própria adesividade do colágeno por diferentes tipos celulares e sua capacidade de induzir a angiogênese, são também importantes no processo de regeneração. Portanto, as propriedades dos tubos de colágeno com relação à revascularização, degradação, baixa imunoreatividade e habilidade de servir como uma matriz adequada para células de Schwann, fazem com que ele seja um material que atenda todos os critérios para ser utilizado como tubo (STANG et al., 2005).

A utilização do enxerto de veia invertida na regeneração de “gaps” de 12 mm no nervo isquiático de ratos já se mostrou bastante efetiva, devido ao fato de que as células de Schwann e o colágeno da túnica adventícia (camada mais externa da veia), em associação a laminina também presente nas paredes do vaso, quando em contato com axônios em regeneração, fornecem um microambiente “vivo”, propício ao crescimento dos axônios (FERRARI et al., 1999; GRAVVANIS et al., 2004) e ao aumento da vascularização dentro do enxerto.

Da mesma maneira, neste nosso estudo também foi possível confirmar os efeitos benéficos da presença da túnica adventícia da veia jugular, dentro do enxerto, em contato direto com as fibras em regeneração. No grupo GII foi encontrado o melhor resultado, com maior valor médio para o diâmetro das fibras nervosas mielínicas que se regeneraram, ou seja, a presença da veia jugular dentro do enxerto contribuiu, juntamente com a membrana de colágeno, para melhorar o processo de regeneração.

As vantagens da associação do uso da veia associada ao colágeno já foram comprovadas por Choi et al. (2005), que promoveu um estudo utilizando a veia jugular externa de coelhos, como tubos, sendo preenchidas com colágeno sob a forma de gel. Neste trabalho, o autor verificou que o gel de colágeno colocado dentro da veia aumentou tanto o número quanto o diâmetro dos axônios

mielinizados, contribuindo, pelas suas inúmeras características, com a promoção da regeneração nervosa.

Dentre os grupos observados, o grupo GII também foi o que apresentou o maior grau de maturação de suas fibras, tanto pelos maiores valores de diâmetros quanto de espessura das bainhas de mielina, embora fossem inferiores aos encontrados nos grupos controles normais (GCNI e GCNII). O fato de a túnica adventícia da veia jugular ser repleta de células de Schwann, as quais são responsáveis pela inervação simpática e parassimpática da veia, também auxiliou o processo de regeneração, uma vez que esses tipos celulares são sabidamente aqueles que iniciam o reparo nervoso. Segundo Barcelos et al. (2003), a presença da adventícia também fornece uma matriz de colágeno que favorece o crescimento dos axônios em regeneração.

Yao et al. (2010) realizaram um estudo em que eram utilizados tubos de colágeno, com e sem subdivisões internas, ou seja, o tubo de alguns grupos experimentais era produzido com múltiplos canais internos, os quais os autores acreditavam que impediriam o processo de dispersão dos axônios em crescimento. Essa dispersão, comumente relatada em muitos trabalhos, pode resultar em uma inervação inapropriada, ou impedir o encontro desses axônios com o coto distal, levando a degeneração nervosa e até mesmo à formação de neuromas.

Embora, com a produção destes microcanais dentro do tubo, o autor pretendesse proteger as fibras em regeneração, e alcançar melhores resultados, após um período de 16 semanas, os maiores valores encontrados de diâmetros das fibras mielínicas e de espessura da bainha de mielina, foram do grupo em que o tubo não apresentava subdivisões, 4,37 μm e 0,66 μm , respectivamente. Esses valores foram inferiores aos encontrados em nosso trabalho, em que após um período de 12 semanas, já foi possível observar valores médios de diâmetro de 5,17 μm e espessura da bainha de mielina de 1,34 μm , nos tubos feitos a partir das membranas de colágeno sem preenchimento.

Yoshii et al. (2001) relataram o uso de um tubo feito a partir da união de vários filamentos de colágeno, em que se obteve, após 8 semanas, um diâmetro médio das fibras mielínicas dentro do enxerto de 2,3 μm , sendo este valor menor que o encontrado em nosso trabalho após um período de 6 semanas, em que o valor médio dos diâmetros das fibras encontradas, com a utilização do tubo feito de

membrana de colágeno sem preenchimento (GI), foi de 3,41 μm . O próprio autor considera esse valor pequeno em relação aos resultados obtidos com o enxerto autólogo de nervo, também realizado no trabalho, no qual ele encontra um valor médio de diâmetro de 3,3 μm , após as 8 semanas, sendo este bem próximo ao encontrado em nosso estudo, após 6 semanas, com o grupo GI (3,41 μm).

O grau de maturação inferior verificado na utilização da membrana de colágeno sem preenchimento (GI), quando comparado com o grupo com preenchimento (GII), nos remete a outra substância presente nas paredes da veia jugular, o VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), o qual estimula a vascularização. Este fator de crescimento tem mostrado influência na proliferação e migração de células de Schwann, assim como também aumenta a possibilidade de crescimento axonal em associação aos receptores de VEGF presentes nos axônios (KEMPTON et al., 2009). Em nosso estudo, o VEGF pode ter contribuído com a regeneração, pois estava presente diretamente dentro do enxerto, através da utilização da veia jugular externa, agregando esses benefícios ao processo de reparo.

Quanto ao grupo em que foi feita a utilização da membrana de colágeno sem preenchimento (GI), os resultados foram os menores encontrados entre todos os grupos dos dois períodos. Porém, mesmo com o pequeno diâmetro observado em suas fibras mielínicas, esse grupo ainda apresentou resultado superior ao encontrado por Okamoto et al. (2010), que relatou um valor médio para o diâmetro de suas fibras mielínicas de 3,08 μm , após 15 semanas da implantação de tubo de colágeno, e Yoshii et al. (2001) com 3,3 μm em um enxerto autólogo de nervo, após as 8 semanas, sendo esta última técnica apresentada na literatura com os melhores resultados. Em nosso trabalho, após 6 semanas, já encontrávamos um diâmetro médio das fibras de 3,41 μm (GI), ou seja, conseguimos, em um período menor de tempo, um resultado melhor do que o apresentado por esses autores.

Esse valor inferior encontrado nos diâmetros das fibras de GI pode ser devido à reabsorção rápida da membrana, que protegeu o enxerto por um período menor de tempo. Comparado com o grupo GII, à ausência de preenchimento dentro do enxerto no grupo GI, pode ter gerado tanto um certo colapso da membrana, como também pode ter levado à diminuição da presença de algumas substâncias

tróficas como aquelas presentes na veia jugular, que podem contribuir com o processo de regeneração.

Em alguns animais em que não verificamos o crescimento de fibras em regeneração, encontramos grande quantidade de fibroblastos. Na literatura existem relatos de que os fibroblastos que formam o perineuro contribuem com a reconstrução do “gap” do nervo, trabalhando como um guia para os tipos celulares subseqüentes, que são as células de Schwann e os axônios (SCHRODER et al., 1993). Entretanto, quando existe uma quantidade muito maior de fibroblastos, o resultado é a formação de tecido cicatricial nos locais de sutura e fibrosamento do centro do enxerto, o qual tem um efeito bastante prejudicial à regeneração nervosa (SHEN et al., 1999).

Quanto à utilização da veia jugular, tanto como preenchimento, demonstrado em nosso trabalho, quanto na forma de tubo, o uso da veia parece ser promissor em técnicas de enxerto para regeneração nervosa. CHOI et al. (2005) acreditam que o enxerto de veia oferece vantagens em relação ao enxerto autólogo de nervo, uma vez que a morbidade e o déficit funcional são insignificantes devido à grande disponibilidade desses vasos nos mais diversos diâmetros e comprimentos. Associado, por exemplo, às células-tronco aspiradas da medula óssea, o enxerto de veia, já é considerado um método promissor para a reconstrução de longos “gaps”, tanto pelas vantagens do uso da veia e suas propriedades, quanto pela capacidade das células-tronco de se diferenciarem em neurônios e células de Schwann (NIJHUIS et al., 2010).

Alguns autores acreditam que a técnica que utilize o enxerto de veia, fornece excelentes resultados, também devido à mínima invasão de tecido cicatricial dentro da veia. Barcelos et al. (2003) avaliaram a utilização da técnica de veia invertida (ao avesso) como tubo e, após 10 semanas, encontraram um valor médio de diâmetro das fibras mielínicas de 5,24 μm no terço médio do enxerto e valor médio da espessura de suas bainhas de mielina de 1,1 μm . Estes valores são muito próximos ao encontrados em nosso trabalho, quando a veia era utilizada como preenchimento do tubo de colágeno, após 12 semanas, onde verificamos um valor médio de diâmetro de 5,16 μm no terço médio do enxerto e da espessura da bainha de mielina de 1,12 μm , sugerindo que a utilização do tubo de colágeno com

preenchimento de veia pode apresentar resultados tão bons quanto aqueles obtidos com a utilização do enxerto de veia invertida.

Quando Kelleher et al. (2001) compararam as técnicas do enxerto de veia e do enxerto de veia invertida, após um período de 12 semanas, os resultados apontaram a técnica de veia invertida como a que obteve os maiores valores. O enxerto padrão de veia apresentou um valor médio de 5,65 μm e espessura média da bainha de mielina de 1,22 μm , sendo este valor um pouco menor do que o encontrado na técnica da veia invertida em que os valores médios foram respectivamente 6,25 μm e 1,44 μm . Estes valores foram muito próximos aos encontrados em nosso trabalho, no grupo GII, talvez pelo fato do grupo também apresentar a influência da veia jugular dentro do enxerto, especialmente colocando a túnica adventícia diretamente em contato com as fibras lesadas, semelhante ao que ocorre com a técnica da veia invertida.

Porém, neste artigo o autor traz uma questão interessante, que já havia sido levantada por Wang et al. (1993), quanto aos altos valores obtidos pelo grupo que utilizou a veia invertida, pois os resultados histológicos, muitas vezes, não são acompanhados pelos resultados obtidos através da avaliação funcional, onde esse tipo de enxerto não apresentou uma recuperação da função tão importante que correspondesse aos altos valores médios obtidos para o diâmetro e espessura da bainha de mielina. O autor acredita, que como a adventícia da veia jugular recebe inervação simpática e parassimpática, ela se encontra repleta de células de Schwann, as quais, em contato com os neuritos, podem contribuir para aumentar a mielinização (espessura da bainha de mielina), observada através da análise morfométrica, gerando estes altos resultados.

Acreditamos que esta deva ser uma variável a ser levada em consideração, pois em nosso estudo os valores médios apontados também se encontram altos em relação a muitos trabalhos, sendo que diferentemente do trabalho de Kelleher et al. (2001), não realizamos a avaliação funcional da musculatura, uma vez que nossos objetivos se resumiam a verificar o potencial dos materiais utilizados, as membranas de colágeno e PLGA, e a associação desses materiais com as propriedades da veia jugular externa, na regeneração de um nervo periférico.

Da mesma maneira, Wang et al. (1993) ao comparar o enxerto de veia invertida com o enxerto autólogo de nervo, encontraram valores significativamente maiores nos diâmetros dos axônios no grupo da veia invertida, após 12 semanas. Porém, embora este autor considere esta técnica um "living nerve guide", pela presença das células de Schwann na parede da veia, faz as ressalvas acima mencionadas.

Na avaliação dos grupos experimentais do 2º período (12 semanas), a membrana de PLGA apresentou o melhor resultado, no que diz respeito ao processo de regeneração, pois neste grupo foi encontrado o maior diâmetro médio das fibras mielínicas no terço médio do enxerto, indicando que este material permitiu o maior amadurecimento das fibras nervosas regeneradas, quando comparado ao colágeno e as associações desses dois materiais com a veia jugular externa. O resultado obtido para os valores médios de diâmetro das fibras mielínicas foi de 5,64 µm, sendo muito semelhante ao encontrado por LEE et al. (2006) em que esse valor foi de 5,4 µm, com um tubo de PLGA sendo preenchido por colágeno em gel para reparar um "gap" de 15 mm. Neste trabalho de 2006, também foi confirmada a degradação total do tubo de PLGA após 12 semanas das cirurgias, como o verificado em nosso estudo, mesmo esses autores tendo utilizado uma proporção diferente dos polímeros que compõem o PLGA (75:25), enquanto em nosso estudo a proporção foi de 50:50.

Em muitos trabalhos, o PLGA tem demonstrado o seu potencial em processos de regeneração nervosa, nos quais acredita-se que não somente quando utilizado isoladamente, mas também associado a técnicas terapêuticas como o ultrassom e culturas de células pode ser ainda mais benéfico, propiciando um aumento do diâmetro dos axônio, maior permeabilidade de vasos sanguíneos e aumento da área das fibras (CHANG et al., 2007). Em um estudo realizado em cães, o PLGA ao ser utilizado para reconstruir um "gap" de 5 cm apresentou resultados muito semelhantes aos encontrados nos enxertos autólogos de nervo, que são considerados os mais eficazes (DING et al., 2010).

Outras características importantes do PLGA, como a sua degradação dentro do corpo do animal e a sua porosidade, quando utilizados com a finalidade de permitir a regeneração nervosa, contribuem em reduzir os processos decorrentes das reações de corpo estranho, relatadas como mínimas no uso do PLGA quando

comparadas a tubos feitos com materiais como o silicone, por exemplo (CHANG et al., 2005). Sendo a biocompatibilidade do PLGA comprovadamente eficaz quando se utiliza o rato como modelo animal (HE et al., 2009).

Além de ser de fácil produção, o PLGA também apresenta pequena resposta inflamatória, sendo considerado um copolímero seguro, com ampla utilização em sistemas de implantes para a liberação lenta de drogas dentro do organismo, fazendo parte de um grupo de materiais aprovados pelo FDA, o qual oferece garantias deste ser um material desenvolvido com finalidade clínica e terapêutica. Em estudos experimentais, aparece associado à liberação de fatores de crescimento como NGF (MADDURI et al., 2010) e VEGF (KARAL-YILMAZ et al., 2011), importantes não somente em regeneração nervosa como no controle de inúmeras doenças do sistema nervoso, como a Doença de Alzheimer (BÜRGER et al., 2010; PROVIAS e JEYNES, 2010).

Piquilloud et al. (2007), utilizaram tubos de PLGA como um sistema de liberação de GDNF (Glial cell line-derived neurotrophic factor) em “gaps” de 3 mm no nervo isquiático, para verificar se, conforme o material se degradava, o fator de crescimento era liberado e assim gerava um efeito benéfico sobre as fibras lesadas, possivelmente acelerando o processo de regeneração. Embora tenha utilizado um “gap” pequeno, após 12 semanas o autor relata a presença de fibras com diâmetro de 1 a 4 μm , considerado um bom resultado, confirmando a habilidade deste material em modular o crescimento axonal através da liberação controlada de GDNF.

A compressão do enxerto pelos músculos adjacentes durante o movimento, o acúmulo de líquidos que pode ocorrer em decorrência do processo inflamatório, a pressão externa e choques mecânicos, embora normalmente fracos, podem gerar danos aos axônios em regeneração. Para resistir a esses processos, o PLGA, além das características já descritas, também permite ser dobrado em ângulos de 90° e, em seguida, voltar a sua posição original, uma habilidade que é necessária para sua adaptação dentro de qualquer organismo (LEE et al., 2006).

A resistência mecânica do PLGA lhe confere não somente essas propriedades, mas também uma estrutura estável de suporte que fornece um espaço adequado dentro do tubo durante o período de regeneração (PARK et al., 2010), evitando que ocorra o colapamento e consequentemente um

estrangulamento do enxerto. Fato demonstrado em nosso trabalho, em que o PLGA forneceu um melhor resultado em um período maior de tempo, provavelmente por essas características que agregaram proteção e estabilidade ao enxerto, enquanto o material ainda não havia sido totalmente reabsorvido.

Embora existam inúmeras vantagens que tornem o PLGA um dos copolímeros mais utilizados pelas técnicas de engenharia tecidual, é importante conhecer algumas de suas propriedades que podem comprometer o enxerto. Essas desvantagens, como o fato de não promover adesão celular e proliferação integralmente, devido à sua hidrofobicidade natural e, aos produtos da sua degradação levarem a uma diminuição do pH na região do enxerto, podem dificultar a regeneração tecidual (SHEN et al., 2010). Porém, trabalhos já demonstraram que embora existam essas características, após um período de 4 semanas pós-cirúrgico, o PLGA, permitiu o crescimento de fibras em regeneração, como em nosso estudo, sendo que após 12 semanas a quantidade e o diâmetro dessas fibras já se encontrava bastante aumentada (SHI et al., 2008).

Em todos os grupos experimentais, verificamos que os diâmetros das fibras e a espessura das bainhas de mielina foram menores que nos grupos controles normais (GCNI e GCNII), sendo confirmado na literatura que os axônios em brotamento tendem a ter menores diâmetros que os axônios das fibras integras (BARCELOS et al., 2003). Este fato pode ocorrer devido a uma colagenização aumentada, à retração endoneural e efeitos tardios de algumas substâncias sobre o corpo celular (ANSSELIN, FINK e DAVEY, 1997). Da mesma forma, também pode ocorrer um “sprouting”, ou seja, um brotamento das fibras nervosas, sendo que a partir de uma fibra podem se desenvolver vários neuritos em crescimento, que vão gerar várias fibras de diâmetro menor.

Nós imaginamos que um dos fatores que pode ter levado a essa diferença entre os resultados encontrados em nosso trabalho e outros estudos, sendo os nossos algumas vezes superiores, deva ser a origem do colágeno da membrana, osso cortical desmineralizado. Esse atributo pode ter oferecido características benéficas, como a porosidade da membrana, sendo esta uma das propriedades biológicas importantes em materiais usados na regeneração de nervos periféricos, uma vez que é determinante do transporte de nutrientes e trocas entre o sítio de regeneração e o tecido adjacente (WAITAYAWINYU et al., 2007).

Em nosso trabalho apresentamos, portanto, a utilização do colágeno a partir de uma origem diferente das descritas na literatura atual, a cortical óssea desmineralizada, sendo que o colágeno obtido de outras fontes é bastante conhecido no seu uso para regeneração nervosa, como, por exemplo, do tendão do calcanhar bovino e dos tendões da cauda do rato (OLIVEIRA et al., 2005), da pele bovina (YOSHII et al., 2003) e os produzidos artificialmente (STANG et al., 2005; OKAMOTO et al., 2010).

O colágeno bovino possui excelente biocompatibilidade e contribui com o crescimento de células nervosas sendo atualmente utilizado em tubos para regeneração que são aprovados para uso clínico pelo FDA (MADDURI et al., 2010). Archibald et al. (1991) relataram sucesso no uso desses tubos de colágeno em gaps de 4mm para regeneração nervosa tanto em ratos quanto em primatas. Li et al. (2010) já haviam demonstrado as vantagens de tubos semi-permeáveis de colágeno, que permitem a difusão de moléculas de nutrientes do meio externo para o enxerto e de importantes fatores neurotróficos.

Kitahara et al. (1999) também relataram que a utilização de tubos de colágeno em regeneração nervosa apresenta resultados comparáveis ao enxerto autólogo de nervo, enquanto Colin e Donoff (1984), reportaram que o colágeno proporciona resultados ainda melhores que os obtidos com o enxerto autólogo de nervo, em regeneração nervosa em ratos, produzindo um padrão ainda mais organizado e com uma formação menor de tecido fibroso.

De uma maneira geral, o colágeno é conhecido por fornecer suporte biológico para o crescimento celular e aumentar a diferenciação de muitos tipos celulares (WAITAYAWINYU et al., 2007).

Quanto às características da superfície das membranas registradas através de microscopia eletrônica, foi possível confirmar a presença de poros na membrana de colágeno, como já descrito por TAGA (2005), os quais são provenientes do tecido de origem, uma vez que a membrana é uma lâmina de osso cortical desmineralizado. Na membrana de PLGA, vimos tanto as ondulações características dessa material, quanto uma superfície bastante lisa e homogênea, com uma morfologia densa, sendo estes atributos já relatados na literatura (MOTTA e DUEK, 2006). Superfícies internas do tubo que apresentam-se mais lisas caracterizam uma regeneração mais bem estruturada, com cabos de regeneração

livres para o crescimento, com fibras de maior diâmetro, sendo o oposto descrito para as superfícies muito rugosas, que apresentam o tecido nervoso mais disperso dentro do enxerto (AEBISCHER et al., 1990).

A superfície de um material utilizado com a finalidade de promover regeneração nervosa pode gerar efeitos diretos sobre o processo de reparo, uma vez que a regeneração também pode ser influenciada pela textura da superfície interna dos tubos utilizados com essa finalidade, alterando até mesmo a morfologia dos nervos periféricos restaurados (GUÉNARD et al., 1991).

Da mesma forma, as reações de corpo estranho dependem da superfície dos materiais, enquanto as superfícies mais rugosas tendem a atrair maior quantidade de macrófagos e até mesmo de células gigantes, as lisas tendem a permitir uma cicatrização mais rápida da região (BELKAS et al., 2004).

Quando os cotos nervosos de um nervo transeccionado entram em contato com uma membrana de superfície rugosa, o tecido em regeneração se adere fortemente à sua superfície e forma uma fibra com formato mais irregular. Em contraste, se entra em contato com uma superfície lisa, forma-se um cabo nervoso circular sem ligações com a superfície do polímero (GUÉNARD et al., 1991), com as características do padrão de normalidade. Portanto, embora a membrana de PLGA apresenta-se ondulações, a sua superfície caracteriza-se por ser bastante lisa, fato que pode contribuir com o crescimento axonal, favorecendo o desenvolvimento de uma matriz bem organizada centralmente no tubo (WAITAYAWINYU et al., 2007).

Baseado nesses princípios, muitos pesquisadores acreditam que as características de vários polímeros, incluindo o PLGA podem ser alteradas, para que apresentem propriedades que os tornem ainda mais efetivos como biomateriais (LEE et al., 2006, PARK et al., 2010). Dessa maneira, hoje, o maior desafio da engenharia tecidual seria desenvolver e fabricar um tubo biodegradável com uma composição química adequada para a adesão, proliferação e diferenciação celular, que pudesse guiar a regeneração tecidual (PRABHAKARAN et al., 2008), promovendo uma combinação exata entre as propriedades mecânicas e biológicas, as quais apresentam um papel crucial nesse processo.

Nos últimos anos ocorreram muitos avanços nessa área de pesquisa, na tentativa de melhorar o processo de regeneração, porém ainda existe um déficit dos resultados obtidos em relação ao padrão normal de um nervo. Este fato pode ser

parcialmente atribuído, entre outras causas, à formação inadequada de matriz extracelular dentro dos tubos e também pela falta de fatores tróficos durante a fase inicial da regeneração (CEBALLOS et al., 1999; FRANCELE et al., 2003).

Embora em nosso estudo tenha sido verificada a presença de fibras nervosas dentro do enxerto, com diâmetros médios não tão inferiores aos grupos controles normais (GCNI e GCNII), as fibras apresentavam-se imaturas, com baixo índice de mielinização e sem padrão de organização típico de um nervo normal (divisão em fascículos). Acreditamos que algumas características dessas membranas ainda possam ser melhoradas, como controle da porosidade e espessura do material, pois esses fatores se relacionam intimamente com a permeabilidade de nutrientes e fatores tróficos essenciais (OH et al., 2008). Dessa maneira, com a associação de novas tecnologias aos materiais já existentes, pode-se conseguir um aumento no número de axônios regenerados, assim como da espessura da bainha de mielina em torno desses axônios, considerados parâmetros importantes para caracterizar o processo de maturação das fibras nervosas (ROSEN et al., 1989) e, conseqüentemente, da regeneração total do próprio nervo.

Em vista disso, ainda sugerimos a utilização dessas membranas associadas a algum sistema de liberação de fatores de crescimento, como os utilizados com NGF e VEGF. Em especial, o NGF, o qual age modulando o reparo nervoso, permitindo que as fibras em regeneração atinjam altos níveis de maturação, uma vez que esse fator tem sido relatado como uma substância com papel crítico na sobrevivência de fibras nervosas, no crescimento de axônio, assim com também na diferenciação das células de Schwann e na regulação do processo de remielinização (HUANG e REICHARDT, 2001).

Em suma, acreditamos que embora tenhamos encontrado indícios suficientes de que estas membranas apresentam grande potencial para serem utilizadas na regeneração de nervos periféricos, outros estudos ainda devem ser feitos, com a utilização desses materiais, agregando-se mais períodos experimentais, avaliações funcionais diversificadas e análise histomorfométrica também do tecido muscular afetado pela desnervação. Se adicionarmos essas outras metodologias, teremos condições de apresentar dados ainda mais fidedignos e direcionados a linha de pesquisa de regeneração em nervos periféricos, cujo objetivo é encontrar meios, através de materiais e técnicas cirúrgicas, para restaurar

nervos lesados e atingir padrões funcionais, tanto sensitivos quanto motores, que estejam o mais próximo possível da normalidade.

7 Conclusão

7 CONCLUSÃO

Com a realização desse trabalho, concluímos que as membranas de Colágeno Ósseo Bovino e PLGA (produto comercial e produto em desenvolvimento respectivamente da Baumer S.A.) projetadas para uso como barreiras biológicas na técnica de regeneração óssea guiada, nas área de medicina e odontologia, apresentam grande potencial para serem utilizadas como tubo em estudos de regeneração em nervos periféricos, uma vez que foram encontradas fibras nervosas em regeneração dentro dos enxertos feitos com esses materiais. Acreditamos que a membrana de colágeno forneceu resultados um pouco melhores que a de PLGA, provavelmente por ser um tecido biológico. Da mesma maneira, demonstramos que a utilização da veia jugular externa como preenchimento do enxerto agregou valores positivos, especialmente quando associada à membrana de colágeno, sendo que podem ser estudadas outras técnicas e maneiras de utilizá-la, com o objetivo de melhorar os resultados de enxertos, até mesmo com outros materiais existentes, desenvolvidos com a finalidade de promover regeneração em nervos periféricos.

Referências

REFERÊNCIAS

- ACAR, M. et al. The effect of autogenous vein grafts on nerve repair with size discrepancy in rats: An electrophysiological and stereological analysis. **Brain Research**, n. 1198, p. 171-181, 2008.
- AEBISCHER, P.; GUENARD, V.; VALENTINI, R. F. The morphology of regenerating peripheral nerves is modulated by the surface microgeometry of polymeric guidance channels. **Brain Research**, v. 631, p. 211-218, 1990.
- ALLET, M. A. et al. Graft versus graft covered with vein conduits in nerve repairs. **Rev Bras Ortop**, v. 38, n. 4, April 2003.
- ALLUIN, O. et al. Functional recovery after peripheral nerve injury and implantation of a collagen guide. **Biomaterials**, v.30, p. 363–373, 2009.
- ANSSELIN, A. D.; FINK, T.; DAVEY, D.F. Peripheral nerve regeneration through nerve guides seeded with Schwann cells. **Neurophatol Appl Neurobiol**, v. 23, p. 387-398, 1997.
- ARCHIBALD, S. et al. A collagen-based nerve guide conduit for peripheral nerve repair: an electrophysiological study of nerve regeneration in rodents and non human primates. **J Comp Neurol**, v. 306, p. 685–96, 1991.
- ARMSTRONG, S. J. et al. ECM molecules mediate both Schwann cell proliferation and activation to enhance neurite outgrowth. **Tissue Eng**, v. 13, n. 12, p. 2863-2870, 2007.
- AZZE, R.J.; MATTAR JR., R. **Lesões dos nervos periféricos**. In: Pardini Jr. A.G., editor. Traumatismos da mão. 3rd ed. Belo Horizonte: Medsi, 2000.
- BARCELOS, A. S. et al. Inside-out vein graft and inside-out artery graft in rat sciatic nerve repair. **Microsurgery**, v. 23, n. 1, p. 66-71, 2003.
- BELKAS, J.S. et al. Peripheral nerve regeneration through guidance tubes. **Neurological Research**, v. 26, p. 151–160, 2004.
- BENMERAH, S.; LACOUR, S. P.; TARTE, E. Design and Fabrication of Neural Implant with Thick Microchannels based on Flexible Polymeric Materials. **31st**

Annual International Conference of the IEEE EMBS, Minneapolis, Minnesota, USA, n. 2-6, Sept 2009.

BERGSMA, J. E. et al. Late Degradation Tissue Response to poly(L-lactide) Bone Plates and Screws. **Biomaterials**, v. 16, p. 25-31, 1995.

BINI, T. B. et al. Peripheral nerve regeneration by microbraided poly(l-lactide-co-glycolide) biodegradable polymer fibers. **J Biomed Mater Res A**, v. 68, p. 286–295, 2004.

BRYAN, D. J. et al. Enhanced peripheral nerve regeneration elicited by cell-mediated events delivered via a bioresorbable PLGA guide. **J Reconstr Microsurg**, v. 19, p. 125–134, 2003.

BÜRGER, S. et al. Effect of VEGF and its receptor antagonist SU-5416, an inhibitor of angiogenesis, on processing of the β -amyloid precursor protein in primary neuronal cells derived from brain tissue of Tg2576 mice. **Int J Dev Neurosci**, v. 28, n. 7, p. 597-604, Nov 2010.

BUNGNER, O. V. Über die degenerations und Regenerations vorgänge am Nerven nach Verletzungen. **Beitr Pathol Anat**, v. 10, p.321, 1891.

BUSHNELL, B. D. et al. Early clinical experience with collagen nerve tubes in digital nerve repair. **J Hand Surg Am**, v. 33, p.1081–7, 2008.

CAJAL, R. S. **Degeneration and Regeneration of the Nervous System**, vol 1. London: Oxford University Press, 1928.

CAO, X.; SCHOICHET, M. S. Delivering neuroactive molecules from biodegradable microspheres for application in central nervous system disorders. **Biomaterials**, v. 20, p. 329–339, 1999.

CEBALLOS, D. et al. Magnetically aligned collagen gel filling a collagen nerve guide improves peripheral nerve regeneration. **Exp Neurol**, v. 158, n. 2, p. 290-300, 1999.

CHALFOUN, C. T.; WIRTH, G. A.; EVANS, G. R. Tissue engineered nerve constructs: where do we stand? **J Cell Mol Med**, v. 10, n. 2, p. 309-17, Apr-Jun 2006.

-
- CHANG, C. J. et al. Effects of unidirectional permeability in asymmetric poly(DL-lactic acid-co-glycolic acid) conduits on peripheral nerve regeneration: an in vitro and in vivo study. **J Biomed Mater Res B Appl Biomater**, v. 83, n. 1, p. 206-15, Oct 2007.
- CHANG, C. J. et al. Low-intensity-ultrasound-accelerated nerve regeneration using cell-seeded poly(D,L-lactic acid-co-glycolic acid) conduits: an in vivo and in vitro study. **J Biomed Mater Res B Appl Biomater**, v. 75, n. 1, p. 99-107, Oct 2005.
- CHIU, D. T. A comparative electrophysiologic evaluation of nerve grafts and vein grafts as nerve conduits. **Surg Forum**, v. 34, p. 601-603, 1983.
- CHIU, D. T.; STRAUCH, B. A prospective clinical evaluation of autogenous vein grafts used as a nerve conduit for distal sensory nerve defects of 3cm or less. **Plast Reconstr Surg**, v. 86, p. 928-934, 1990.
- CHIU, D.T. et al. Neurotropism revisited. **Neurol Res**, v. 26, n. 4, p.381-7, Jun 2004.
- CHOI, B. H. et al. Nerve Repair Using a Vein Graft Filled with Collagen Gel. **Microsurgery**, v. 21, n. 4, p. 267-72, May 2005.
- COLLIN, W.; DONOFF, R. B. Nerve regeneration through collagen tubes. **J Dent Res**, v. 63, p. 987-993, 1984.
- COSTA, M. P. et al. A utilização do tubo de ácido poliglicólico e FK506 na regeneração de nervos periféricos. **Acta Ortop Bras**, v. 14, p. 25-9, 2006.
- CRISCI, A. R.; FERREIRA, L.F. Low-intensity pulsed ultrasound accelerates the regeneration of the sciatic nerve after neurotomy in rats. **Ultrasound in Med & Bio**, v. 28, n. 10, p. 1335-1341, 2002.
- CUI, T. et al. Rapid prototyping of a double-layer polyurethane-collagen conduit for peripheral nerve regeneration. **Tissue Eng Part C Methods**, v. 15, n. 1, p. 1-9, Mar 2009.
- DAMIANI, G. J.; CÉSPEDES, I. C. Prevalência da lesão dos nervos alveolar inferior, bucal e lingual em procedimentos operatórios. **Revista Odonto**, n. 29, Jan- Jun 2007.
- DE BOER, R. et al. In vitro and in vivo release of nerve growth factor from biodegradable poly-lactic-co-glycolic-acid microspheres. **J Biomed Mater Res A**, v. 95, n. 4, p. 1067-73, 2010.

DEZAWA, M. et al. Sciatic nerve regeneration in rats induced by transplantation of in vitro differentiated bone-marrow stromal cells. **Eur J Neurosci**, v. 14, p. 1771–1776, 2001.

DING, F. et al. Use of Tissue-Engineered Nerve Grafts Consisting of a Chitosan/Poly(lactic-co-glycolic acid) - Based Scaffold Included with Bone Marrow Mesenchymal Cells for Bridging 50-mm Dog Sciatic Nerve Gaps. **Tissue Eng**, v. 16, n. 12, 2010.

DVALI, L.; MACKINNON, S. Nerve repair, grafting, and nerve transfers. **Clinics in plastic surgery**, v. 30, n. 2, p. 203-21, 2003.

EVANS, G. R. D. et al. Bioactive poly (L-lactic acid) conduits seeded with Schwann cells for peripheral nerve regeneration. **Biomaterials**, v. 23, p. 841– 848, 2002.

EVANS, G. R. et al. Clinical long-term in vivo evaluation of poly (l-lactic acid) porous conduits for peripheral nerve regeneration. **J Biomater Sci Polym**, v. 11, p. 869–878, 2000.

EVANS, G. R. Peripheral nerve injury: a review and approach to tissue engineered constructs. **The Anatomical Record**, v. 263, n. 4, p. 396-404, 2001.

FARIA, S. D. et al. Standardization of techniques used in facial nerve section and facial movement evaluation in rats. **Rev Bras Otorrinolaringol**, v. 72, n. 3, p. 341-7, 2006.

FAWCETT, J.W.; KEYNES, R.J. Peripheral nerve regeneration. **Annu Rev Neurosci**, v.13, p. 43–60, 1990.

FERNANDES, M. et al. Estudo comparativo entre enxerto autógeno e enxerto muscular coberto com tubo de veia autógeno em nervos tibiais de ratos wistar, utilizando o fluoro-gold como marcador neuronal. **Acta Ortop Bras**, v. 15, n. 2, p. 97-100, 2007.

FERRARI, F. et al. Inside-out vs. standard vein graft to repair a sensory nerve in rats. **Anat Rec**, v. 256, n. 3, p. 227-32, 1999.

FORMATTI, C. Zur technik der nervennaht. **Arch Klin Chir**, v. 73, p. 643, 1904.

- FRANCEL, P. C. et al. Regeneration of rat sciatic nerve across a LactoSorb bioresorbable conduit with interposed short-segment nerve grafts. **J Neurosurg**, v. 99, n. 3, p. 549-54, 2003.
- GARDNER, E. D. **Sistema Nervoso**. In: GARDNER, E. Gray, D. J.; RAHILLY, R. O'. In: *Anatomia*. 4ª ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2008. p. 32-38.
- GEUNA, S. et al. Morphological analysis of peripheral nerve regenerated by means of vein grafts filled with fresh skeletal muscle. **Anat Embryol**, v. 201, n. 6, p. 475-82, 2000.
- GOTO, E. et al. A rolled sheet of collagen gel with cultured Schwann cells: model of nerve conduit to enhance neurite growth. **J Biosci Bioeng**, v. 109, n. 5, p. 512-8, May 2010.
- GRAVVANIS, AL et al. Beneficial effect of nerve growth factor-7S on peripheral nerve regeneration through inside-out vein grafts: an experimental study. **Microsurgery**, v. 24, n. 5, p. 408-15, 2004.
- GRIFFITH, L. G. Emerging design principles in biomaterials and scaffolds for tissue engineering. **Ann N Y Acad Sci**, v. 961, p. 83-95, 2002.
- GUÉNARD, V.; VALENTINI, R. F.; AEBISCHER, P. Influence of surface texture of polymeric sheets on peripheral nerve regeneration in a two-compartment guidance system. **Biomaterials**, v. 12, n. 2, p. 259-63, 1991.
- GUO, B. F.; DONG, M. M. Application of neural stem cells in tissue-engineered artificial nerve. **Otolaryngol Head Neck Surg**, v. 140, n. 2, p. 159-64, Feb 2009.
- GUZEN, F. P. et al. Tratamento farmacológico e regeneração do Sistema Nervoso Central em situações traumáticas. **Rev Neurocienc**, v. 17, n. 2, p. 128-32, 2009.
- HADLOCK, T. et al. A novel, biodegradable polymer conduit delivers neurotrophins and promotes nerve regeneration. **Laryngoscope**, v. 109, n. 9, p. 1412-6, Sep 1999.
- HANNA, A. S.; DEMPSEY, R. Nanofibrous channels: a potential alternative to nerve grafting. **Neurosurgery**, v. 67, n. 4, p.14-5. 2010.
- HASHIMOTO, T. et al. Peripheral nerve regeneration using non-tubular alginate gel crosslinked with covalent bonds. **J Mater Sci Mater Med**, v. 16, n. 6, p. 503-9, Jun 2005.

HE, L. et al. Manufacture of PLGA multiple-channel conduits with precise hierarchical pore architectures and in vitro/vivo evaluation for spinal cord injury. **Tissue Eng Part C Methods**, v. 15, n. 2, p. 243-55, Jun 2009.

HOU, S. Y. et al. Tissue-engineered peripheral nerve grafting by differentiated bone marrow stromal cells. **Neuroscience**, v. 140, p. 101–110, 2006.

HSU, S. H. et al. In vitro and in vivo effects of Ginkgo biloba extract EGb 761 on seeded Schwann cells within poly (DL-lactic acid-co-glycolic acid) conduits for peripheral nerve regeneration. **J Biomater Appl**, v.19, p. 163–182, 2004.

HUANG, E. J., REICHARDT, L. F. Neurotrophins: roles in neuronal development and function. **Annu Rev Neurosci**, v. 24, p. 677-736, 2001.

IJPMA, F. F.; VAN DE GRAAF, R. C.; MEEK, M. F. The early history of tubulation in nerve repair. **J Hand Surg Eur**, v. 33, n. 5, p. 581-6, 2008.

JOHNSON, E. O.; SOUCACOS, P. N. Nerve repair: experimental and clinical evaluation of biodegradable artificial nerve guides. **Injury**, v. 39, Suppl 3, S30-6, Sep 2008.

JOHNSON, E. O.; ZOUBOS, A. B.; SOUCACOS, P. N. Regeneration and repair of peripheral nerves. **Injury**, v. 36, suppl 4, p. 24–29, 2005.

JOHNSON, P. J. et al. Nerve Endoneurial Microstructure Facilitates Uniform Distribution of Regenerative Fibers: A Post Hoc Comparison of Midgraft Nerve Fiber Densities. **J Reconstr Microsurg**, Oct 2010.

KARAGOZ, H. et al. Comparison of regeneration results of prefabricated nerve graft, autogenous nerve graft, and vein graft in repair of nerve defects. **Microsurgery**, v. 29, n. 2, p. 138-43, 2009.

KARAL-YILMAZ, O. et al. Preparation and in vitro characterization of vascular endothelial growth factor (VEGF)-loaded poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) microspheres using a double emulsion/solvent evaporation technique. **J Microencapsul**, v.28, n. 1, p. 46-54, 2011.

KELLEHER, M. O. et al. The use of conventional and invaginated autologous vein grafts for nerve repair by means of entubulation. **Br J Plast Surg**, v. 54, n. 1, p. 53-7, 2001.

-
- KEMPTON, L. B. et al. Assessment of Axonal Growth into Collagen Nerve Guides Containing VEGF-Transfected Stem Cells in Matrigel. **Anat Rec**, v. 292, p. 214–224, 2009.
- KINGHAM, P. J.; TERENGHI, G. REVIEW: Bioengineered nerve regeneration and muscle reinnervation. **J Anat**, v. 209, p. 511–526, 2006.
- KITAHARA, A. K. et al. Facial nerve repair using a collagen conduit in cats. **Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg**, v. 33, p. 187–193, 1999.
- LANDER, A. D.; FUJII, D. K.; REICHARDT, L. F. Laminin is associated with the "neurite outgrowth-promoting factors" found in conditioned media. **Proc Natl Acad Sci**, v. 82, n. 7, p. 2183–7, Apr 1985.
- LEE, D. Y. et al. Nerve regeneration with the use of a poly(l-lactide-co-glycolic acid)-coated collagen tube filled with collagen gel. **J Craniomaxillofac Surg**, v. 34, n. 1, p. 50–6, Jan 2006.
- LEKOVIC, V. et al. Combination use of bovine porous bone mineral, enamel matrix proteins, and a bioabsorbable membrane in intrabony periodontal defects in humans. **J Periodontol**, v. 72, n. 5, p. 583–589, 2001.
- LI, B. C. et al. PLGA conduit seeded with olfactory ensheathing cells for bridging sciatic nerve defect of rats. **J Biomed Mater Res A**, v. 94, n. 3, p. 769–80, Sep 2010.
- LI, S. et al. Peripheral nerve repair with collagen conduits. **Clin Mater**, v. 9, p. 195–200, 1992.
- LIGA DE NEUROCIRURGIA. Sistema Nervoso. Disponível em <http://www.sistemanervoso.com/pagina.php?secao=11&materia_id=208&materiaver=1>. Acesso em 18 nov. 2010.
- LOHMEYER, J. A. Bridging extended nerve defects with an artificial nerve graft containing Schwann cells pre-seeded on polyglactin filaments. **Int J Artif Organs**, v. 30, n. 1, p. 64–74, Jan 2007.
- LOHMEYER, J. A. et al. Bridging peripheral nerve defects by means of nerve conduits. **Chirurgie**, v. 78, p. 142–7, 2007.

- LOHMEYER, J. A.; MACHENS, H. G. Basics and Current Approaches to Tissue Engineering in Peripheral nerve Reconstruction. **Neurosurgery Quarterly**, v. 19, n. 2, p. 101-109, 2009.
- LUNDBORG, G. A 25-year perspective of peripheral nerve surgery: evolving neuroscientific concepts and clinical significance. **The Journal of hand surgery**, v. 25, n. 3, p. 391-414, 2000.
- LUNDBORG, G. et al. Tissue specificity in nerve regeneration. **Scand J Plast Reconstr Surg**, v. 20, p. 279–83, 1986.
- LUNDBORG, G. Nerve injury and repair - a challenge to the plastic brain. **J Peripher Nerv Syst**, v. 8, p. 209–226, 2003.
- MACKINNON, S.E.; DELLON, A.L. **Surgery of the Peripheral Nerve**. New York: Thieme. 1988.
- MACKINNON, S. E.; DELLON, A. L. Clinical nerve reconstruction with bioabsorbable polyglycolic acid tube. **Plast Reconstr Surg**, v. 85, p. 419, 1990.
- MADDURI, S. et al. Collagen nerve conduits releasing the neurotrophic factors GDNF and NGF. **J Control Release**, v. 143, n. 2, p. 168-74, Apr 2010.
- MADISON, R. D.; ROBINSON, G. A.; CHADARAM, S. R. Review: The specificity of motor neurone regeneration (preferential reinnervation). **Acta Physiol**, v. 189, p. 201–206, 2007.
- MANO, J. et al. Bioinert, Biodegradable and Injectable Polymeric Matrix Composites for Hard Replacement: State of the Art and Recent Developments. **Composites Science and Technology**, v. 64, p. 789–817, 2004.
- MEEK, M. F.; COERT, J. H. Clinical use of nerve conduits in peripheral-nerve repair: review of the literature. **Journal of Reconstructive Microsurgery**, v. 18, n. 2, p. 97-109, 2002.
- MERLE, M. et al. Complications from silicon-polymer intubulation on nerves. **Microsurgery**, v. 10, p. 130-33, 1989.
- MILLES, H. Techniques for nerve grafting. **Hand Clinics**, v.16, n. 1, p. 73-91, 2000.

-
- MOHAMMADI, R. et al. Comparison of beneficial effects of undifferentiated cultured bone marrow stromal cells and omental adipose-derived nucleated cell fractions on sciatic nerve regeneration. **Muscle Nerve**, Nov 2010.
- MOORE, A. M. et al. Limitations of Conduits in Peripheral Nerve Repairs. **HAND**, v. 4, p. 180–186, 2009.
- MOTTA, A.C.; DUEK, E.A.R. Síntese, Caracterização e Degradação “*in vitro*” do poli(L-ácido láctico-co-ácido glicólico). **Revista Matéria**, v. 11, n. 3, p. 340 – 350, 2006.
- NAGEOTTTE, J. Le processus de la cicatrisation des nerfs. **C R Soc Biol**, v. 78, p. 249–53, 1915.
- NEWMAN, K. D.; MCBURNEY, M. W. Poly (D,L lactic-co-glycolic acid) microspheres as biodegradable microcarriers for pluripotent stem cells. **Biomaterials**, v. 25, p. 5763–5771, 2004.
- NGEOW, W. C. Scar less: a review of methods of scar reduction at sites of peripheral nerve repair. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 109, n. 3, p. 357-66, Mar 2010.
- NIJHUIS, T. H. J. et al. Isogenic venous graft supported with bone marrow stromal cells as a natural conduit for bridging a 20 mm nerve gap. **Microsurgery**, v.30, n. 8, p. 639-45, Nov 2010.
- OH, S. H. et al. Peripheral nerve regeneration within an asymmetrically porous PLGA/Pluronic F127 nerve guide conduit. **Biomaterials**, v. 29, n. 11, p. 1601-9, Apr 2008.
- OKAMOTO, H. et al. Recovery process of sciatic nerve defect with novel bioabsorbable collagen tubes packed with collagen filaments in dogs. **J Biomed Mater Res A**, v. 92, n. 3, p. 859-68, Mar 2010.
- OLIVEIRA, A. L. R.; VIDAL, B.C.; LANGONE, F. Naturally supraorganized collagen increases axonal regeneration after tubulization repair. **Braz J Morphol Sci**, v. 22, n. 3, 143-148, 2005.
- OLIVEIRA, L. B. et al .Evaluation Of The Accidents And Complications Associated With Third Molar Surgery. **Rev Cir Traumatol Buco-Maxilo-Fac**, v.6, n.2, p. 51 - 56, 2006.

- PARK, S. C. et al. Ultrasound-stimulated peripheral nerve regeneration within asymmetrically porous PLGA/Pluronic F127 nerve guide conduit. **J Biomed Mater Res B Appl Biomater**, v. 94, n. 2, p. 359-66, Aug 2010.
- PATEL, M. et al. Video-Gait Analysis of Functional Recovery of Nerve Repaired with Chitosan Nerve Guides. **Tissue Eng**, v. 12, n. 11, 2006.
- PFISTER, L. A. et al. REVIEW: Nerve conduits and growth factor delivery in peripheral nerve repair. **J Peripher Nerv Syst**, v.12, p. 65–82, 2007.
- PIQUILLOUD, G. et al. Variations in glial cell line-derived neurotrophic factor release from biodegradable nerve conduits modify the rate of functional motor recovery after rat primary nerve repairs. **Eur J Neurosci**, v. 26, n. 5, p. 1109-17, Sep 2007.
- PLATT, H. On the results of bridging gaps in injured nerve trunks by autogenous fascial tubulization and autogenous nerve grafts. **Br J Surg**, v. 7, p. 384–9, 1920.
- POLITIS, M. J.; EDERLE, K.; SPENCER, P. S. Tropism in nerve regeneration in vivo. Attraction of regenerating axons by diffusible factors derived from cells in distal nerve stumps of transected peripheral nerves. **Brain Res**, v. 253, n. 1-2, p. 1-12, Dec 1982.
- PRABHAKARAN, M. P. et al. Surface modified electrospun nanofibrous scaffolds for nerve tissue engineering. **Nanotechnology**, v. 19, n. 45, 455102-455111, 2008.
- PROVIAS, J.; JEYNES, B. Correlation Analysis of Capillary APOE, VEGF and eNOS Expression in Alzheimer Brains. **Curr Alzheimer Res**, Dec 2010.
- PU, L. L. et al. Effects of nerve growth factor on nerve regeneration through a vein graft across a gap. **Plast Reconstr Surg**, v. 104, n. 5, p. 1379-85, Oct 1999.
- RADTKE, C.; VOGT, P. M. Peripheral Nerve Regeneration: A Current Perspective. **Eplasty**, v. 12, n. 9, p. 47, Oct 2009.
- RAIMONDO, S. et al. Schwann cell behavior after nerve repair by means of tissue-engineered muscle-vein combined guides. **J Comp Neurol**, v. 489, n. 2, p. 249-59, Aug 2005.
- REZENDE, C. A. et al. Membranas de poli (ácido láctico-co-ácido glicólico) como curativos para pele: degradação *in vitro* e *in vivo*. **Polímeros**, v. 15, n. 3, São Carlos July/Sept 2005.

-
- RIZZOLO, R. J. C.; MADEIRA, M. C. **Sistema Nervoso**. In: Anatomia Facial com fundamentos de anatomia sistêmica geral. 3rd ed. São Paulo: Sarvier, 2006. cap. 8, p. 213.
- RODRIGUES, A.C.; SCHMALBRUCH, H. Satellite cells and myonuclei in long-term denervated rat muscles. **Anat Rec**, v. 243, n. 4, p. 430-37, 1995.
- ROSEN, J. M. et al. Artificial nerve graft compared to autograft in a rat model. **J Rehabil Res Deu**, v. 26, n. 1, p. 1-14, 1989.
- SCHMIDT, C.; LEACH, J. B. Neural tissue engineering: strategies for repair and regeneration. **Annu Rev Biomed Eng**, v. 5, p. 293–347, 2003.
- SCHRODER, J. M.; MAY, R.; WEIS, J. Perineurial cells are the first to traverse gaps of peripheral nerves in silicone tubes. **Clin Neurol Neurosurg**, v. 95, p. 78–83, 1993.
- SHEN, H. et al. Ciliary neurotrophic factor-coated polylactic-polyglycolic acid chitosan nerve conduit promotes peripheral nerve regeneration in canine tibial nerve defect repair. **J Biomed Mater Res B Appl Biomater**, v. 95, n. 1, p. 161-70, Oct 2010.
- SHEN, Z. L. et al. Viability of cultured nerve grafts: An assessment of proliferation of Schwann cells and fibroblasts. **Microsurgery**, v. 19, p. 356–363, 1999.
- SHI, Y. et al. Transplantation of neural stem cells overexpressing glia-derived neurotrophic factor promotes facial nerve regeneration. **Acta Otolaryngol**, v. 17, p. 1-9, Oct 2008.
- SINIS, N. et al. Tissue engineering of peripheral nerves. **Handchir Mikrochir Plast Chir**, v. 38, n. 6, p. 378-89, Dec 2006.
- STANG, F. et al. Structural parameters of collagen nerve grafts influence peripheral nerve regeneration. **Biomaterials**, v. 26, n. 16, p. 3083-91, Jun 2005.
- STRAUCH, B. Use of nerve conduits in peripheral nerve repair. **Hand Clinics**, v. 16, n. 1, p. 123-30, 2000.
- SUNDERLAND, S. **Nerves and nerve injuries**. New York: Churchill Livingstone, 1978.
- SUZUKI, K. et al. Histologic and electrophysiological study of nerve regeneration using a polyglycolic acid-collagen nerve conduit filled with collagen sponge in canine model. **Urology**, v. 74, n. 4, p. 958-63, Oct 2009.

TAGA, M. L. L. **Análise histológica e radiográfica do potencial osteopromotor da membrana de cortical óssea bovina no reparo de defeito ósseo de tamanho crítico na calvária de cobaia (*Cavia porcellus*)**. 2005. 148 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru, 2005.

TAKEISHI, H. et al. Molded bone augmentation by a combination of barrier membrane and recombinant human bone morphogenetic protein-2. **Oral Dis**, v.7, p.281-286, 2001.

TANG, J. B.; SHI, D.; ZHOU, H. Vein conduits for repair of nerves with a prolonged gap or in unfavorable conditions: an analysis of three failed cases. **Microsurgery**, v. 16, p. 133-7, 1995.

TARAS, J.; NANAVATI, V.; STEELMAN, P. Nerve conduits. **J Hand Ther**, v. 18, p. 191–7, 2005.

TEIXEIRA, L. N. **Regeneração tecidual guiada: estudo da biocompatibilidade *in vitro* da membrana do compósito de poli(vinilideno-trifluoretileno)/titanato de bário**. 2009. 131 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

TERZIS, J. K.; SUN, D. D.; THANO, P. K. H. Historical and basic science review: past, present, and future of nerve repair. **J Reconstr Microsurg**, v. 13, n. 3, p. 215-25, Apr. 1997.

THANOS, P. K.; OKAJIMA, S.; TERZIS, J. K. Ultrastructure and Cellular biology of nerve regeneration. **J Reconstr Microsurg**, v. 14, n. 6, p. 423-36, Aug 1998.

THOMSEN, L. et al. Treatment by collagen conduit of painful post-traumatic neuromas of the sensitive digital nerve: A retrospective study of 10 cases. **Chir Main**, v. 29, n. 4, p. 255-62, Sep 2010.

ULKUR, E. et al. Nerve graft prefabrication: preliminary study. **J Reconstr Microsurg**, v. 24, n. 2, p. 137-45, 2008.

VAREJÃO, A. S. P. et al. Toe out angle: a functional index for the evaluation of sciatic nerve recovery in the rat model. **Exp Neurol**, v. 183, p. 695–699, 2003.

-
- WAITAYAWINYU, T. et al. A comparison of polyglycolic acid versus type 1 collagen bioabsorbable nerve conduits in a rat model: an alternative to autografting. **J Hand Surg Am**, v. 32, p. 1521–9, 2007.
- WALLER, A. Experiments on the section of the glossopharyngeal and hypoglossal nerves in the frog, and observations of the alterations produced thereby in the structure of their primitive fibers. **Philos Trans R Soc London (Biol)**, v. 140, p. 423, 1850.
- WALTON R.L. et al. Autogenous vein graft repair of digital nerve defects in the finger: a retrospective clinical study. **Plast Reconstr Surg**, v. 84, p. 944-949, 1989.
- WANG, K. K. et al. Inside-out vein graft promotes improved nerve regeneration in rats. **Microsurgery**, v. 14, p. 608–618, 1993.
- WANG, K. K. et al. Inside-out vein graft repair compared with nerve grafting for nerve regeneration in rats. **Microsurgery**, v.16, p. 65–70, 1995.
- WANG, X. et al. Peroneal Nerve Regeneration using a unique bilayer polyurethane-collagen guide conduit. **J Bioact Compat Polym**, v. 24, p.109, 2009.
- WANG, X. et al. Polyurethane-collagen Guide Conduit Peroneal Nerve Regeneration Using a Unique Bilay. **J Bioact Compat Polym**, v. 24, p. 109, 2009.
- WEI, X.; LAO, J.; GU, Y. D. Bridging peripheral nerve defect with chitosan-collagen film. **Chin J Traumatol**, v. 6, n. 3, p. 131-4, Jun 2003.
- WEISS P. Further experimental evidence against (neurotropism) in nerve regeneration. **J Exp Zool**, v. 95, p.233–57, 1944.
- WHITLOCK, E. L et al. Processed allografts and type I collagen conduits for repair of peripheral nerve gaps. **Muscle & Nerve**, v. 39, n. 6, p.787-99, Jun 2009.
- WIBERG, M.; TERENCEHI, G. Will it be possible to produce peripheral nerves? **Surg Technol Int**, v. 11, p. 303–310, 2003.
- YAMASHIMA, T. et al. Vascular adventitia generates neuronal progenitors in the monkey hippocampus after ischemia. **Hippocampus**, v. 14, n. 7, p. 861-75, 2004.
- YAMATOIGI, R. S. et al. Histologia da associação de membranas biológicas de origem bovina implantadas no tecido subcutâneo de ratos. **Ciência Rural**, v. 35, n. 4, p. 837-842, 2005.

YAO, L. et al. Multichanneled Collagen Conduits for Peripheral Nerve Regeneration: Design, Fabrication, and Characterization. **Tissue Eng**, v. 16, n. 6, part C, 2010.

YOSHII, S. et al. Bridging a 30-mm nerve defect using collagen filaments. **J Biomed Mater Res**, v. 67, n. 2, p. 467-74, Nov 2003.

YOSHII, S. et al. Peripheral nerve regeneration along collagen filaments. **Brain Res**, v. 888, p.158 –162, 2001.

YOSHITANI, M. et al. Experimental repair of phrenic nerve using a polyglycolic acid and collagen tube. **J Thorac Cardiovasc Surg**, v. 133, n. 3, p. 726-32, Mar 2007.

YUKSEL, E. et al. Increased free fat-graft survival with the long-term, local delivery of insulin, insulin-like growth factor-I, and basic fibroblast growth factor by PLGA/PEG microspheres. **Plast Reconstr Surg**, v.105, p. 1712–1720, 2000

ANEXOS

ANEXO A - Sutura epineural em dois pontos distintos do nervo isquiático

Observar que foi preservada uma distância entre os pontos de 10 mm, sem qualquer tensão, utilizando fio de sutura de nylon 10.0.

ANEXO B - Remoção de um segmento de nervo de 10 mm entre as suturas epineurais

Observar que foram utilizados instrumentais de microcirurgia.

ANEXO C - Distância de 10 mm entre os cotos proximal e distal

A distância simula uma lesão com essa extensão. Foi utilizada uma sonda periodontal, para confirmação do “gap” de 10 mm.

ANEXO D - Membranas de colágeno passadas por baixo do fio 10.0 e enroladas para se formar um tubo

ANEXO E - Realização de três amarrações, com fio de sutura Vycril® 4.0

Essas amarrações foram feitas próximas aos cotos (proximal e distal) e na porção central do enxerto, para manutenção da membrana fechada e do seu formato cilíndrico.

ANEXO F - Segmento de veia colocado próximo ao coto proximal

ANEXO G - Paralisia da pata posterior direita do animal

Comparar a pata direita, em que foi realizada a cirurgia (paralisada), com a pata esquerda (saudável).

ANEXO H - Corte histológico do nervo isquiático de animal do grupo GCNI

Observar grande número de fibras mielínicas de diâmetros variados, apresentando morfologia com padrão de normalidade. Notar grande fibra nervosa mielínica (seta preta) e linha de divisão formada pelo perineuro (seta branca).

ANEXO I – Corte histológico do terço médio do enxerto de animal do grupo GI

Observar a distribuição esparsa das fibras mielínicas. Note fibra mielínica (seta).

ANEXO J - Corte histológico do terço médio do enxerto de animal do grupo GII

Observar a distribuição esparsa das fibras mielínicas. Note fibra mielínica (seta).

ANEXO K - Corte histológico do terço médio do enxerto de animal do grupo GIII

Observar uma distribuição esparsa de fibras mielínicas com diâmetros heterogêneos entre as fibras nervosas regeneradas. Note fibra mielínica (seta).

ANEXO L – Corte histológico do terço médio do enxerto de animal do grupo GIV

Observar uma distribuição esparsa de fibras mielínicas com presença de grande quantidade de tecido conjuntivo fibroso. Note a abundância de capilares (seta preta), fibra mielínica (seta branca) e tecido conjuntivo fibroso (cabeça de seta).

ANEXO M - Corte histológico do terço médio do enxerto de animal do grupo GIV

Observar a abundância de tecido conjuntivo com muitas fibrilas colágenas (seta preta) e algumas fibras nervosas regeneradas (seta branca).

ANEXO N - Corte histológico da região operada do animal do grupo GCOI

Observar a ausência de fibras nervosas regeneradas e abundante tecido conjuntivo com muitos fibroblastos.

ANEXO O - Corte histológico da região operada do animal do grupo GCOII

Note a presença de fibras nervosas em degeneração (seta).

ANEXO P - Corte histológico do terço médio do enxerto de animal do grupo GIII

Observar a ausência de fibras nervosas regeneradas, algumas fibras degeneradas (seta preta) e grande abundância de fibroblastos e fibrilas colágenas.

ANEXO Q - Corte histológico do nervo isquiático de animal do grupo GCNII

Observar grande número de fibras mielínicas de diâmetros variados, apresentando morfologia com padrão de normalidade. Notar grande fibra nervosa mielínica (seta preta).

ANEXO R - Corte histológico do terço médio do enxerto de animal do grupo GV

Observar a presença de poucas fibras mielínicas (seta preta).

ANEXO S - Corte histológico do terço médio do enxerto de animal do Grupo GVI

Note a morfologia de uma fibra mielínica em regeneração (seta preta).

ANEXO T - Corte histológico do terço médio do enxerto de animal do grupo GVII

Observar a presença de fibras mielínicas bastante dispersas (seta preta).

ANEXO U - Corte histológico do terço médio do enxerto de animal do grupo GVIII

Notar o grande número de fibras mielínicas de pequeno diâmetro (seta).

ANEXO V- Corte histológico do terço médio de animal do grupo GII

Notar a presença de grande quantidade de capilares no terço médio do enxerto (seta preta) e fibras mielínicas (seta branca).

ANEXO W – Elétron-micrografia de varredura da superfície da Membrana de PLGA

Notar a presença de ondulações na Membrana de PLGA.

ANEXO X – Elétron-micrografia de varredura da superfície da Membrana de PLGA

Notar a superfície bastante lisa e homogênea.

ANEXO Y – Elétron-micrografia de varredura da superfície da Membrana de Colágeno

Notar a presença de poros na membrana de colágeno.

APÊNDICE

APÊNDICE A – Parecer da Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais da FOB-USP

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru
 Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-901 – C.P. 73
 PABX (0XX14)3235-8000 – FAX (0XX14)3223-4679

Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais
 Fone: (14)3235-8356
 e-mail: mferrari@fob.usp.br

CEEPA-Proc. Nº 020/2009

Bauru, 18 de setembro de 2009.

Senhor Professor,

O projeto de pesquisa encaminhado a esta Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais, denominado *"Enxerto sintético e biológico com e sem preenchimento com túnica adventícia de veia no reparo de nervo periférico em ratos"*, de autoria de Carina Guimarães de Souza Melo, foi enviado ao relator para avaliação.

O parecer do Relator **aprovando** o projeto foi aceito *"ad referendum"* desta Comissão, considerando que não existem infrações éticas.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Rodrigo Cardoso de Oliveira

Presidente da Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

Prof. Dr. Antonio de Castro Rodrigues
 Docente do Departamento de Ciências Biológicas