SILVIA REJANE FONTOURA HERRERA

**Comparação entre duas técnicas cirúrgicas
para correção intra-uterina de
meningomielocele em feto de ovelha**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título
de Doutor em Ciências

Programa de Patologia

Orientadora: Profa. Dra. Denise Araújo Lapa Pedreira

São Paulo

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Herrera, Silvia Rejane Fontoura

Comparação entre duas técnicas cirúrgicas para correção intra-uterina de meningocele em feto de ovelha / Silvia Rejane Fontoura Herrera. -- São Paulo, 2014.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Patologia.

Orientadora: Denise Araújo Lapa Pedreira.

Descritores: 1.Meningocele 2.Disrafismo espinal 3.Terapias fetais
4.Fetosopia 5.Ovinos

USP/FM/DBD-221/14

Dedicatória

*A minha doce Lara, pela sabedoria dos seus 9 anos,
ter compreendido minha ausência. Ao Vinícius, que surgiu
na história na reta final e aguentou firme e forte intra-útero,
o ritmo da mãe. Ao meu marido pelo companheirismo de
cada ano dedicado a esse trabalho. Aos meus pais e ao
meu irmão que estão sempre na retaguarda.*

Agradecimentos

A **Profa. Dra. Denise Araújo Lapa Pedreira**, minha orientadora, que se tornou uma grande amiga. Uma mulher com uma espécie de genialidade a frente de seu tempo, da qual serei eterna admiradora. Agradeço pelos desafios propostos, que me fizeram trilhar um caminho muito mais amplo no exercício da Medicina Fetal.

Ao **Dr. Paulo Roberto Valente**, do Instituto de Cardiologia Dante Pazzanese, veterinário responsável pelas nossas ovelhas, que sempre demonstrou um carinho e dedicação enorme aos cuidados com os animais.

Ao **Prof. Dr. Ricardo José de Almeida Leme**, neurocirurgião responsável pela correção cirúrgica de um dos grupos estudados, que além de sua admirável precisão cirúrgica, contribuiu com seus ensinamentos de vida que deixavam todos mais leves.

A **Prof^a. Dra. Élia Garcia Caldini**, por ter aberto as portas do laboratório, onde pudemos enxergar as respostas que buscávamos.

Ao **Dr. Paulo Hilário Nascimento Saldiva**, por nos mostrar qual o caminho a seguir, pela dedicação do seu escasso tempo na interpretação dos resultados e pelo seu bom humor de sempre.

Aos funcionários do Instituto Dante Pazzanese, em especial ao **Eduardo da Silva** e ao **Isaías Clasto** pela dedicação aos cuidados com os animais.

Aos funcionários do laboratório Biologia Celular, em especial a **Nilsa Regina Damasceno Rodrigues**, pela força enorme no processamento do material e na preparação das lâminas.

Ao **Dr. Luis Salomão e Paulo Zoppi**, proprietários do laboratório Salomão Zoppi Diagnósticos, minha segunda casa, pela compreensão do tempo dedicado a esse trabalho, pelo incentivo e confiança.

Ao **Dr. Cláudio Márcio Cirino**, meus chefe direto, pela ajuda em conciliar o tempo entre estudo e trabalho.

A minha família pelo porto seguro e pelos momentos de leveza e alegrias que me proporcionam.

Aos amigos do Laboratório Salomão Zoppi pelo apoio e incentivo.

Aos amigos da UNICAMP, que acompanharam de longe, mas torceram sempre pelo sucesso desse trabalho.

Aos velhos e novos amigos da vida, que tornam a vida mais animada e feliz.

Epígrafe

*“O começo de todas as ciências
é o espanto de as coisas serem o que são”.
(Aristóteles)*

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Júlia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo. Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviatura dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas e siglas

Lista de gráfico e figuras

Lista de tabelas

Resumo

Summary

1- INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Desenvolvimento normal e alterado do Sistema Nervoso Central	2
1.2 Prevalência	4
1.3 Fatores de risco e prevenção	4
1.4 Prognóstico e diagnóstico.....	5
1.5 Tratamento	7
1.6 Cicatrização	10
1.7 O sistema colagênico	13
1.8 Justificativa	15
2- OBJETIVOS.....	16
2.1 Objetivo geral.....	17
2.2 Objetivos específicos.....	17
3- MÉTODOS.....	18
3.1 Tipo de estudo	19
3.2 Cálculo amostral	19
3.3 Animais utilizados	20
3.4 Procedimentos e técnicas.....	21
3.4.1 Criação do defeito	23
3.4.2 Correção cirúrgica.....	26
3.4.3 Sacrifício	30
3.4.4 Avaliação macroscópica	30
3.4.5 Ressonância magnética.....	31
3.4.6 Avaliação microscópica.....	32

3.4.6.1	Coloração pela hematoxilina-eosina.....	32
3.4.6.2	Coloração pelo picrossírius-hematoxilina	32
3.4.6.3	Análise qualitativa das fibras colagênicas	33
3.4.6.4	Avaliação qualitativa	34
3.5	Resultados adversos e troca de fornecedor	35
3.6	Análise estatística.....	35
4-	RESULTADOS	36
4.1	Evolução geral	37
4.2	Macroscopia	41
4.3	Ressonância magnética	43
4.4	Análise histopatológica	44
4.3.1	Grupo 1 - Técnica Neurocirúrgica	44
4.4.2	Grupo 2 - Técnica Simplificada	46
4.5	Análise Estatística	48
5-	DISCUSSÃO.....	50
6-	CONCLUSÃO	59
7-	ANEXOS.....	61
8-	REFERÊNCIAS	70

LISTAS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CAPPesq -	Comitê de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa.
CB -	Celulose Biosintética.
CDC -	<i>Center of Disease Control and Prevention.</i>
COBEA -	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal.
DTN -	Defeitos do tubo neural.
EB -	Espinha bífida.
FDA -	<i>Food and Drug Administration.</i>
HE -	hematoxilina-eosina.
IGC -	Idade Gestacional na Cirurgia.
IGP -:	Idade Gestacional no Parto.
IGS -:	Idade Gestacional no Sacrifício.
KCI -	Cloreto de Potássio.
MMC -	Mielomeningocele.
MOMS -	<i>Management of Myelomeningocele Study.</i>
OF -	Óbito fetal.
PCR -	polimerase chain reaction.
PDGF -	<i>Platelet derived Grown Factor.</i>
PIU -	Permanência Intrauterina
SMP -	Síndrome da Medula Presa.
SNC -	Sistema nervoso central.
SP -	São Paulo.
TGF α -	<i>Transforming Grown Factor α.</i>
TGF β -	<i>Transforming Grown Factor β.</i>
TPP -	Trabalho de parto prematuro.
USA -	<i>United States of América.</i>

LISTA DE GRÁFICOS E FIGURAS

Esquema 1 - Evolução de todas ovelhas selecionadas para o estudo	38
Gráfico 1 - Observa-se a duração da gestação, de acordo com a técnica cirúrgica empregada.....	40
Figura 1- Sinal ultrassonográfico indireto de MMC, detectável no primeiro trimestre.	6
Figura 2 - Estrutura de uma molécula de colágeno típica.	14
Figura 3 - Ovelhas da raça Hampshire Down	20
Figura 4 - Ovelhas da raça Santa Inês	21
Figura 5 - Alojamento dos animais. Baías com oferta de água, ração e feno. Estrado para evitar deslizamento	22
Figura 6 - Criação do defeito no dorso fetal, planos superficiais	25
Figura 7 - Criação do defeito no dorso fetal, visualização e abertura dos planos profundos	25
Figura 8 - Fechamento da dura-máter, usando a técnica neurocirúrgica	27
Figura 9 - Aproximação das bordas do músculo paravertebral, usando a técnica neurocirúrgica	27
Figura 10 - Fechamento do defeito através da técnica simplificada	29
Figura 11 - Fechamento da pele, usado em ambas as técnicas cirúrgicas	29
Figura 12 - Aspecto da cicatriz da pele no momento do sacrifício. A pele completamente cicatrizada, sem pontos de extravasamento de líquido.....	42
Figura 13- Fio de sutura na pele. A seta mostra a presença da extremidade do fio ancorada na pele.....	42
Figura 14 - Ressonância magnética pós sacrifício.....	43
Figura 15 - Micrografias obtidas de preparados histológicos da medula espinhal representativos do resultado da técnica neurocirúrgica	44

Figura 16 -	Micrografia obtida de preparado histológico corado com Picrossirius e observado sob luz polarizada. Finas fibras de colágeno aparecem brilhando contra o fundo azul	45
Figura 17 -	Micrografias obtidas de preparados histológicos da medula espinhal representativos do resultado da técnica simplificada	46
Figura 18 -	Micrografia obtida de preparado histológico corado com Picrossirius e observado sob luz polarizada	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Evolução dos casos pós procedimento cirúrgico que foram submetidos a correção de um defeito semelhante à MMC	39
Tabela 2 -	Tabela de frequência simples e relativa à técnica cirúrgica empregada e a aderência da medula à cicatriz.....	48
Tabela 3 -	Tabela de frequência simples e relativa à técnica cirúrgica empregada e a formação de uma neoduramáter	48
Tabela 4 -	Tabela de frequência simples e relativa à técnica cirúrgica empregada e a preservação do funículo posterior.....	49
Tabela 5 -	Tabela de frequência simples e relativa à técnica cirúrgica empregada e a visualização dos cornos da substância cinzenta	49

RESUMO

Herrera SRF. *Comparação entre duas técnicas cirúrgicas para correção intra-uterina da meningocele em feto de ovelha* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo: 2014. 79p.

Introdução: A incidência de defeitos do tubo neural é de cerca de 1/1000 nascimentos. Na mielomeningocele, o tratamento intra-uterino utilizando a técnica neurocirúrgica clássica, apresenta melhor prognóstico neurológico, do que o tratamento pós natal, mas está associado a complicações maternas e fetais. Novas técnicas de correção estão sendo estudadas para diminuir a morbidade materna e fetal. **Objetivo:** Comparar os efeitos sobre a medula de duas técnicas cirúrgicas de correção intra-uterina de um defeito semelhante à mielomeningocele, em fetos de ovelha. **Métodos:** Em 15 fetos foi criado um defeito semelhante à mielomeningocele (laminectomia e excisão de dura-máter) no 90º dia de gestação. O tipo de correção foi randomizado. No grupo 1, o defeito foi corrigido usando a técnica neurocirúrgica clássica, com a sutura de três camadas (dura-máter, músculo e pele), realizada por um neurocirurgião. No grupo 2, um especialista em Medicina Fetal, utilizou uma técnica simplificada, colocando um fragmento de celulose Biosintética sobre a medula e suturando apenas a pele sobre a celulose. Próximo ao termo da gestação (132º dias), os fetos foram sacrificados para análise anatomopatológica. **Resultados:** Ocorreram 1 morte materna, 3 casos de trabalho de parto precoce e 4 tardios. Um total de 10 casos foram viáveis para avaliação anatomopatológica 10 casos, 6 no grupo 1 e 4 no grupo 2. No grupo 1, todos os casos mostraram aderência da medula à cicatriz (meningoadesão) e perda da arquitetura medular por destruição do funículo posterior e 5 de 6 casos apresentaram perda da visualização da substância cinzenta. No grupo 2, observamos em todos os casos, a formação de uma neoduramater, separando o tecido nervoso do músculo adjacente, sendo que o funículo posterior e a substância cinzenta estavam preservados. **Conclusão:** A técnica simplificada foi superior à técnica neurocirúrgica, com maior preservação da medula e evitando as aderências do tecido nervoso. Nossos achados sugerem que a técnica utilizada atualmente na correção de mielomeningocele em fetos humanos deva ser reavaliada.

Descritores: Meningocele, disrafismo espinal, terapias fetais, fetoscopia, ovinos.

SUMMARY

Herrera SRF. *Comparison between two surgical technique for prenatal correction of meningomyelocele in sheep* [Thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo": 2014. 79 p.

Introduction: The incidence of neural tube defects is about 1/1000 births. In myelomeningocele, the intrauterine treatment with the classical neurosurgical technique suggest better neurological prognosis for the fetus, than postnatal treatment, but it is associated with maternal and fetal complications. New correction techniques are being studied to decrease maternal and fetal morbidity. **Objective:** To compare the effects on the medulla of two surgical techniques for intrauterine correction of myelomeningocele-like defect in sheep. **Methods:** In 15 pregnant sheep a myelomeningocele -like defect (laminectomy and dural excision) was created in the lumbar region in 90^o day gestation. The type of correction was randomized. In group 1 the defect was corrected using the classic neurosurgical technique of three layers suture (dura-mater, muscle and skin closure) performed by a neurosurgeon. In group 2, a fetal medicine specialist used a biosynthetic cellulose patch to protect the medulla and only the skin was sutured above it. Near term (132^o day gestation) fetuses were sacrificed for pathological analysis. **Results:** One maternal death occurred, early preterm labour, and late preterm labour occurred in 3 and 4 cases, respectively. A total of 10 cases were available for pathological analysis, 6 in group 1 and 4 in group 2. In group 1, all the cases showed a adherence of the medulla to the scar (meningoneural adhesion) and a destruction of the normal architecture of nervous tissue, without view of posterior funiculus and in 5 of 6 cases without view of grey matter. In group 2, in all the cases were observed a formation of an organized tissue involving the cellulose patch, a neoduramater, separating the nervous tissue of adjacent muscle, preserving the posterior funiculus and grey matter. **Conclusion:** The simplified new technique was better than the classical neurosurgical technique. It preserved the nervous tissue and avoided the adherence of the medulla to the scar. This suggests the current technique used for the correction of spina bifida in humans may need to be reassessed.

Descriptors: Meningomyelocele, Spinal disraphism, fetal therapies, fetoscopy, sheep.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Desenvolvimento normal e alterado do Sistema Nervoso Central

O sistema nervoso central (SNC) se desenvolve a partir da placa neural observada no embrião de três semanas, cujos bordos formam as pregas neurais, as quais se aproximam na linha média provocando o fechamento e consequente formação do tubo neural ¹.

O termo defeitos do tubo neural (DTN), como o nome sugere, é usado para designar todas as malformações do sistema nervoso central causadas pela falha de fechamento do tubo neural em etapas precoces da embriogênese. Os DTN compreendem, classicamente, a anencefalia, a espinha bífida e encefalocele ^{2,3,4}.

A espinha bífida (EB) ou mielomeningocele é um defeito da neurulação primária que resulta na falência da fusão da porção caudal do tubo neural, durante a quarta semana da embriogênese ^{3,5}. É uma das mais comuns malformações em fetos humanos. O defeito pode ser exclusivo do arco vertebral (EB oculta), ou pode ocorrer exposição do conteúdo do canal vertebral (EB aberta) ^{2,3}.

Na espinha bífida oculta as metades embrionárias do arco vertebral não crescem normalmente e não se fundem no plano mediano. Ocorre mais frequentemente nas vértebras L5 a S1 e pode ser encontrado como achado radiográfico incidental em 15% da população. A maioria dos casos são inócuos e não está associado a déficits neurológico ou ortopédico, porém

uma pequena percentagem das crianças afetadas tem defeitos funcionalmente significativos da medula espinhal subjacente e das raízes espinhais.

A **Espinha bífida aberta** se divide em 3 tipos:

- **Espinha Bífida com meningocele:** quando o saco herniário contém as meninges e o fluido cerebroespinal. A medula espinhal e as raízes espinhais estão em sua posição normal, mas pode haver anormalidade dessas estruturas. A meningocele pode ocorrer em diversos níveis do canal medular, sendo as lombossacrais as mais frequentes.
- **Espinha Bífida com mielomeningocele:** quando a medula espinhal e/ou raízes nervosas estão incluídas no saco herniário. A mielomeningocele (MMC) pode estar coberta por pele ou por uma membrana delgada que se rompe com facilidade. É mais comum e mais grave que a anterior. A MMC também pode ocorrer em diversos níveis a coluna, sendo que a incidência é de 25% para as regiões torácica e tóraco-lombar, 40% para a região lombar, 25% para a região lombossacral e 10% para a região sacral. As de localização cervical são muito raras ⁶.
- **Espinha bífida com mielosquise:** é o tipo mais grave de espinha bífida. Neste caso, a medula espinhal na área afetada está aberta, porque as pregas neurais também não se fundiram. Isto faz com que a medula espinhal seja representada por uma massa achatada de tecido nervoso, sem saco herniado ⁴.

1.2 Prevalência

A prevalência mundial dos defeitos de tubo neural é de cerca de 1 a cada 1000 nascidos vivos ⁷. As regiões com menores prevalências no mundo são França com 0,07 casos, Itália 0,09 e Inglaterra 0,1 por 1000 nascidos vivos. O Brasil aparece em 4º lugar entre aqueles com maior prevalência, apresentando índice de 1,14, atrás apenas da Bulgária, Venezuela e México, com 1,15; 1,20 e 1,53, respectivamente, segundo a World Health Organization ⁸. Nos estudos realizados no Brasil, os índices variam de 1,3 casos por 1000 nascidos vivos em São José dos Campos em São Paulo ⁹, até 5 casos por 1000 nativos em Recife ¹⁰.

1.3 Fatores de risco e prevenção

Os fatores de risco mais fortemente associados à doença são: história familiar, com aumento do risco de 3 a 8 % para um irmão afetado ¹¹; inadequada ingestão de ácido fólico, antes ou durante a gravidez aumenta o risco em 2 a 8 vezes ¹²; mulheres com diabetes pré-gestacional tem 2 vezes mais risco (associado à concentração sanguínea de glicose no primeiro trimestre) ¹³; uso de ácido valproico ou carbamazepina, aumentam o risco em 1 a 2 % ¹⁴.

Em uma recente revisão sistemática de três ensaios clínicos randomizados, a suplementação de ácido fólico no período periconcepcional reduziu a recorrência de defeito do tubo neural em 70 % e na prevenção primária observou-se uma redução de incidência de 62% ¹⁵. A dose

recomendada pelo Centers of Disease Control and Prevention (CDC) é de 400 µg/dia para todas as mulheres em idade fértil, via suplementação ou alimento fortificado, que deve ser mantida ao se confirmar a gravidez. Para mulheres com antecedentes familiares de DTN a recomendação é de ingerir 4000 µg/dia, iniciando três meses antes da concepção e mantendo até o 3º ou 4º mês de gestação ¹⁶.

1.4 Prognóstico e diagnóstico

A taxa de mortalidade para nascidos vivos com MMC foi de 4,4%, como mostrou um estudo coorte com 20 anos de acompanhamento ¹⁷. A maioria dos nascidos vivos com esse defeito desenvolve paraparesias, disfunções no sistema urinário, intestinal e anormalidades ortopédicas ⁵. A malformação de Arnold Chiari tipo II, está presente em mais de 75% dos indivíduos afetados e é constituída da herniação do cerebelo, quarto ventrículo, ponte e medula oblonga pelo forame magno e está associada à hidrocefalia ¹⁸.

No exame ultrassonográfico, observam-se sinais indiretos no crânio e no cerebelo (sinal do limão e banana), decorrentes da malformação de Arnold Chiari tipo II. O exame direto da medula permite determinar o nível da lesão, porém sua exatidão é de apenas 38% ¹⁹. A tendência hoje é usar cada vez mais o screening de primeiro trimestre para identificar malformações severas, sendo possível identificar a própria lesão medular, mas principalmente outros sinais indiretos obtidos em corte sagital do pólo cefálico. Nesta fase observa-se um alargamento do tronco cerebral e uma

diminuição da distância entre o tronco e o osso occipital, levando a um aumento da relação entre o tronco cerebral e a distância tronco-osso occipital²⁰.

Figura 1 - Sinal ultrassonográfico indireto de MMC, detectável no primeiro trimestre. (a): Feto normal. BS: tronco cerebral, IT: translucência intracraniana ou quarto ventrículo, f.CM: cisterna magna, OB osso occipital. Seta amarela: diâmetro do tronco cerebral, seta vermelha: diâmetro do tronco cerebral ao osso occipital. (b): Feto com MMC. Seta amarela: mostra o diâmetro de tronco cerebral aumentado, seta vermelha mostra o diâmetro do tronco cerebral ao osso occipital diminuído

A ressonância magnética além de acrescentar informações adicionais aos fetos com anormalidade do sistema nervoso central, mostra-se como importante ferramenta correlacionando os achados anormais com fatores prognósticos²¹. Lesões altas estão associadas a disfagia. Quanto mais e de maior dimensão for a lesão, maior a chance de ser necessário o uso de cadeira de rodas permanentes. A ausência de membrana recobrindo o defeito, está associada a escoliose e alto risco de disfunção de bexiga²².

1.5 Tratamento

Estudos experimentais sugerem que a lesão da medula é progressiva na vida intra-uterina, pela exposição do tecido nervoso normal às agressões mecânicas (movimentação fetal) e químicas (líquido amniótico), decorrentes do não fechamento das estruturas posteriores da coluna ²³. A publicação recente dos resultados do ensaio clínico randomizado americano denominado *Management Of Myelomeningocele Study* (MOMS), mostrou que a correção intra-uterina em humanos melhora o prognóstico neurológico na evolução dos recém-nascidos afetados, quando se compara a correção pré-natal com a pós-natal ²⁴.

Neste estudo a técnica cirúrgica utilizada, consiste em histerostomia, com abertura da membrana amniótica, exposição do feto ao ambiente extra uterino e correção do defeito da coluna através da técnica neurocirúrgica clássica.

A técnica neurocirúrgica clássica consiste, no fechamento do defeito em planos distintos. Inicialmente a placa neural e o saco dural são descolados da zona de transição adjacente. Em seguida, a dura-máter é fechada, seguindo-se da sutura da fáscia, com reaproximação da musculatura paravertebral. Por fim, a pele é fechada na linha média do defeito. A técnica de correção pós-natal foi simplesmente transposta para utilização pré-natal, sem que seu desempenho fosse avaliado a nível pré-natal.

Embora este estudo tenha mostrado vantagens do ponto de vista neurológico, foram observadas tanto complicações maternas, quanto fetais.

Do ponto de vista materno, em 35% dos casos foi observado, de adelgaçamento à deiscência completa, da cicatriz da incisão cirúrgica no útero, 6% de descolamento de placenta, 6% de edema agudo de pulmão, entre outras complicações.²⁴ Do ponto de vista fetal, a média de idade ao nascimento foi de 34,1 semanas e 13% de nascimentos ocorreram antes de 30 semanas, além de 20% de Síndrome da Angústia Respiratória como complicação da prematuridade ²⁴.

No estudo MOMS a correção pré-natal aumentou a incidência de medula presa, necessitando de correção cirúrgica em 8% dos casos, comparados com 1% dos casos, submetidos à correção pós-natal ²⁴.

A Síndrome da Medula Presa (SMP) é uma entidade caracterizada por sinais e sintomas causados pelo excessivo estiramento da medula, que fica aderida à pele na cicatriz da correção do defeito. Pode surgir em qualquer idade e cursa com fraqueza, dor, sinais cutâneos, deformidades ortopédica, principalmente escoliose, piora na deambulação e do desempenho neurológico ²⁵. Aproximadamente de 10 a 30 % das crianças que foram submetidas a cirurgia de correção de MMC pós-natal, pela técnica clássica, desenvolverão SMP, porque todas as crianças submetidas a cirurgia de correção, tem medula aderida à cicatriz demonstrada na ressonância magnética ²⁶.

Com o objetivo de desenvolver uma técnica menos invasiva para reduzir o risco materno da cirurgia a céu aberto, Kohl et al, desenvolveram uma técnica endoscópica, que preservou a função neuromuscular e minimizou os riscos maternos ²⁷. Com o mesmo objetivo, nosso grupo

desenvolveu com sucesso uma técnica sono-endoscópica, utilizando a fetoscopia²⁸ para o tratamento fetal, em modelo animal.

Para permitir a abordagem endoscópica foi necessário simplificar a técnica cirúrgica para a correção do defeito propriamente dito. O sucesso desta nova técnica simplificada foi demonstrado em feto de coelho²⁹ e também em feto de ovelha³⁰, pois o feto de ovino vem sendo utilizado como modelo de escolha, para o desenvolvimento de novas técnicas em cirurgia fetal, pela similaridade com os fetos humanos em tamanho e anatomia^{31,32,33,34}.

Essa técnica utiliza um substituto de dura-máter colocado sobre o defeito, sem sutura ou fixação, com fechamento apenas da pele. O material utilizado é a celulose biosintética (CB), uma película de produção nacional e de baixo custo. A CB é usada rotineiramente em cirurgia plástica como substituto de pele em queimaduras graves, promovendo hemostasia e evitando contaminação bacteriana e perda de eletrólitos^{35,36}. A CB foi estudada por Melo et. al., como substituto de dura-máter em craniotomia de cães, apresentando bons resultados³⁷. Um dos nossos estudos anteriores, comparou a eficácia da CB com uma matriz dérmica humana acelular e demonstrou a superioridade da CB, que foi considerada o material mais adequado como substituto de dura-máter na correção intra-uterina da MMC, em fetos de ovelha³⁸.

Outros autores já demonstraram que a menor manipulação cirúrgica do feto, usando outros materiais de cobertura e outras técnicas de suturas para proteção da medula e fechamento do defeito são efetivos³⁹.

1.6 Cicatrização

O processo de reparo de lesões em animais é representado por uma sequência de eventos que objetivam restaurar o tecido que sofreu injúria, ocorrendo então o reparo, com formação de cicatriz.

O processo de cicatrização basicamente envolve inflamação, proliferação e remodelagem tecidual, é uma complexa série de reações e interações célula-célula, célula-matriz, além de uma interação indireta entre diferentes populações celulares, através de mediadores solúveis. O equilíbrio entre os mediadores estimuladores e inibidores durante o processo de cicatrização é essencial para alcançar a homeostasia tecidual pós-lesão^{40,41}.

A cicatrização de feridas envolve 5 fases sequenciais: injúria, coagulação, inflamação, formação tecidual e remodelagem tecidual⁴².

Na injúria, o rompimento de uma solução de continuidade tecidual proporciona um extravasamento de sangue no local. Aminas vasoativas como histamina, serotonina e outros mediadores aumentam a permeabilidade vascular para a transmigração de células como neutrófilos, monócitos, linfócitos, plaquetas e proteínas plasmáticas como fibronectina e fibrinogênio, ao sítio da lesão. Esses fenômenos acontecem devido a interação dinâmica de citocinas e fatores liberados pelas células, como fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e fatores de transformação de crescimento alfa e beta (TGF- α e TGF- β), sendo responsáveis pela síntese de matriz extracelular^{42,43}.

Na coagulação, as plaquetas e as fibrinas são os principais componentes do processo, sendo as plaquetas as primeiras células a aparecerem após a lesão ⁴⁴. O extravasamento de sangue na lesão permite a ativação das plaquetas através do contato com componentes da matriz extracelular, como colágeno fibrilar e fibronectina entre outras. As plaquetas ativadas são submetidas a adesão e agregação, juntamente com a conversão do fibrinogênio em fibrina pela trombina, forma-se um coágulo de fibrina para evitar a perda de sangue ^{43,44}. O coágulo de fibrina atua como matriz provisória para a migração de leucócitos, queratinócitos, fibroblastos e células endoteliais. As plaquetas também contribuem nos processos de inflamação, reepitelização, fibroplasia e angiogênese ⁴⁴.

Na inflamação, ocorre um fluxo de leucócitos para a lesão. Dentro de poucas horas, grandes quantidade de neutrófilos atravessam o endotélio dos capilares sanguíneos, ativados por citocinas, iniciando o desbridamento do tecido lesionado e fagocitose de agentes infecciosos, com liberação de substâncias anti-microbianas. Os monócitos são atraídos por quimiocinas e produtos da degradação da matriz extracelular, como colágeno, fibronectina, trombina. Os monócitos se diferenciam em macrófagos que fagocitam, digerem e destroem, patógenos, debris celulares e neutrófilos remanescentes. Esse processo induz a angiogênese e formação de tecido de granulação. Os macrófagos liberam fatores quimiotáticos como a fibronectina que atraem fibroblastos para a lesão ⁴⁴.

Na formação tecidual ocorre uma intensa atividade celular e migração de diferentes tipos de células para o local, geralmente se inicia no

terceiro dia pós-lesão. Nesta fase é formado o tecido de granulação. Essa granulação é formada por dois mecanismos, a formação de novos vasos (angiogênese) e migração de fibroblastos para a lesão (fibroplasia).

A célula endotelial é a principal responsável pela angiogênese e surge de vasos capilares lesados. Elas saem desses vasos, degradam a matriz provisória e formam brotos, que se conectam a outro capilar para formar uma rede vascular, permitindo a circulação do sangue ⁴⁵.

Na fibroplasia ocorre uma proliferação de fibroblastos e sua migração para o interior da lesão por estímulos de fatores de crescimento. Os fibroblastos que já estão na área, começam a sintetizar colágeno e se diferenciam em miofibroblastos para contração da lesão. Os fibroblastos que migram para a lesão interagem com elementos da matriz extracelular, sintetizando, depositando e remodelando-a. Começa então uma grande produção de colágeno, que é o principal alicerce do novo tecido conectivo ⁴⁰.

Nesta fase também ocorre a reepitelização, que é o processo de restauração da epiderme, envolvendo vários processos incluindo a migração e proliferação de queratinócitos da epiderme adjacente para a área da lesão, a diferenciação do novo epitélio em epiderme estratificada e a restauração da membrana basal que conecta a epiderme a derme subjacente ⁴⁴.

Na remodelagem tecidual há uma tentativa de retorno à estrutura tecidual normal. Ocorre um equilíbrio entre a formação do colágeno novo e degradação de colágeno velho através da ação das collagenases ⁴⁶. Nesse processo também ocorre a redução gradual da celularidade e vascularidade

⁴⁵.

No feto o processo de cicatrização é diferente. Em geral a cicatrização de uma ferida, ocorre sem a formação de cicatriz. As características de inflamação observadas no adulto estão ausentes no feto. A taxa de citocinas tem níveis bastante reduzidos. O depósito de matriz é rápido e organizado, similar a pele sem ferimentos, as vezes levando a completa restituição normal da arquitetura dérmica ⁴⁷.

1.7 O sistema colagênico

As fibras do sistema colagênico constituem uma família de proteínas fibrosas bem características, e são encontradas em todos os animais multicelulares. São produzidas por diversos tipos de células, e que se distinguem em composição química, distribuição nos tecidos, funções propriedades físicas e morfologia. São as proteínas mais abundantes nos mamíferos, constituindo cerca de 30% da sua massa proteica seca total ⁴⁸.

A principal característica de uma molécula de colágeno típica é a estrutura longa e rígida de sua fita tripla helicoidal, na qual três cadeias polipeptídicas de colágeno, chamadas cadeias α , são enroladas umas nas outras formando um tipo de corda supertorcida (Figura 2).

Figura 2 - Estrutura de uma molécula de colágeno típica. (A) Modelo de uma cadeia α no qual cada aminoácido é representado por uma esfera. Cada cadeia α é composta por uma série de sequências Glicina-X-Y, na qual X e Y podem ser qualquer aminoácido. (B) Um modelo de uma molécula de colágeno formada por três cadeias α , cada uma mostrada em cor diferente, arranjadas em forma de tripla hélice ⁴⁹

Existem vários tipos de colágeno, cada um definido por suas cadeias $\alpha 1$ e $\alpha 2$ específicas. Já foram descritos 28 diferentes tipos de colágenos ⁵⁰.

As moléculas de colágeno se associam no espaço extracelular e, dependendo de sua composição e formato, podem formar fibrilas, redes ou mesmo se associar a fibras colágenas. Existem, portanto, colágenos fibrilares (isto é, que formam fibrilas e fibras, como por exemplo os colágenos tipo I, II, III) e não fibrilares (como o colágeno tipo IV, que é um dos principais componentes das lâminas basais).

Na dura-máter encontraremos principalmente o colágeno tipo I, que é, o mais comum entre os colágenos, forma fibrilas grossas (com diâmetro médio de 75 nm) que se associam formando fibras grossas de 2 a 10 μm ,

conhecidas como “fibras colágenas” na histologia clássica. Estão presentes no tecido conjuntivo propriamente dito, no osso, dentina, cemento, tendão, ligamentos, fáscias, epimísio, epineuro constituindo cerca de 90% do colágeno do organismo, tendo como principal função, a resistência à tensão ⁵¹.

1.8 Justificativa

Na busca do desenvolvimento de uma técnica endoscópica de correção da mielomeningocele, que possa minimizar os riscos maternos e fetais da correção intra-útero, o presente estudo propõem-se a investigar a eficiência da técnica simplificada de correção, comparando-a com a técnica clássica aplicada atualmente, no tratamento de fetos humanos.

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo Geral

Comparar os efeitos sobre a medula de duas técnicas cirúrgicas de correção de um defeito semelhante à mielomeningocele, em fetos de ovelha.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a aderência entre a medula e a cicatriz comparando as duas técnicas de correção.
- Avaliar a formação de uma neo dura-máter comparando as duas técnicas de correção.
- Avaliar a preservação da anatomia da medula comparando as duas técnicas de correção.

3 MÉTODOS

Os procedimentos foram realizados de acordo com os princípios éticos de experimentação animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) (www.cobea.com.br) e pela lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, que regulamenta os procedimentos para uso científico em animais.

Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) Protocolo: 1229/09, pelo Comitê de Ética do Instituto Dante Pazzanese e foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) Protocolo: 2010/00088-7.

3.1 Tipo de estudo

Estudo experimental, realizado com ovelhas prenhas da raça Hampshire Down e Santa Inês, no Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia, durante o período de 06/05/2011 a 15/01/2012.

3.2 Cálculo de tamanho amostral

Antes do presente estudo, foi realizado um estudo piloto com 3 animais para definição prévia de tamanho da amostra, treino da equipe na técnica cirúrgica empregada e definição dos métodos de avaliação dos resultados. O tamanho da amostra calculada foi de no mínimo de 4 casos para cada grupo.

3.3 Animais utilizados

Ovelhas da raça Hampshire Down, tem como berço os condados de Wilts, Hants e Dorset, no sul da Inglaterra. Os seus ancestrais eram ovinos primitivos que pertenciam a duas raças: Wiltshire e Berkshire Knots. ASPECTO GERAL - Ovino de tamanho grande, conformação harmoniosa e constituição robusta, compacto e musculoso. Raça especializada na produção de carne, de boa capacidade de adaptação aos diferentes meios e regimes de criação. Os cordeiros bem alimentados atingem 35 Kg de peso vivo aos 3 ou 4 meses. Boa fertilidade e prolífera.

Figura 3 - Ovelhas da raça Hampshire Down

Ovelhas da raça Santa Inês foi desenvolvida no nordeste brasileiro, resultante do cruzamento intercorrente das raças Bergamacia, Morada Nova, Somalis e outros ovinos sem raça definida. ASPECTO GERAL - Animal deslanado, com pêlos curtos e sedosos, de grande porte com média de peso para macho de 80 a 120 Kg e para as fêmeas de 60 a 90 Kg, Fêmeas prolíferas e com boa habilidade materna. (www.accoes.com.br- Associação de criadores de caprinos e ovinos do Espírito Santo).

Figura 4 - Ovelhas da raça Santa Inês

3.4 Procedimentos e técnicas

O estudo compreendeu duas etapas.

Na primeira etapa foram utilizadas 10 ovelhas prenhas do cruzamento da raça Hampshire Down, provenientes da fazenda Grama Roxa, de Avaré (SP) e na segunda etapa foram utilizadas 8 ovelhas prenhas da raça, Santa Inês, provenientes da fazenda Carneiros e Cordeiros, Tatuí (SP).

Foi realizada monta programada nas ovelhas fêmeas no período natural do cio, com rigoroso controle da idade gestacional, que é realizado pelo controle do dia da monta do macho rufião que tem seu abdome pintado para marcar a monta através do aparecimento da tinta no dorso da fêmea, além de posterior confirmação ultrassonográfica da prenhez.

O transporte da fazenda até o laboratório foi feito à noite, para reduzir o stress nos animais pela temperatura mais amena e pela maior facilidade de trânsito em nossa cidade. Os animais chegaram ao alojamento do Laboratório de Cirurgia Experimental do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia, no mínimo 5 dias antes da cirurgia para aclimação. Na

chegada foram recebidos pela nossa equipe, que realizou um breve exame ultrassonográfico para a confirmação da gravidez.

As ovelhas permaneceram em baias com ventilação e iluminação natural e semi cobertas. Permitindo que os animais mantivessem a variação natural entre dia e noite.

Figura 5 - Alojamento dos animais. Baias com oferta de água, ração e feno. Estrado para evitar deslizamento

Uma equipe ficou disponível para seus cuidados com alimentação e oferta de água 12 horas por dia.

As ovelhas permaneceram em jejum antes da cirurgia, 48 horas para alimentos sólidos e 24 horas para líquidos. Os animais foram transportados para uma ante sala para administração de medicação pré-anestésica, que se constituiu de acepromazine 1% (0,2 a 0,4mg/Kg) e midazolan (0,3 a

0,5 mg/Kg) administrados por via endovenosa (EV). Após sedação, foi realizada tricotomia e em seguida os animais foram levados à sala cirúrgica.

Para indução anestésica foi utilizado o Thiopental 2,5% (7,5 a 10 mg/Kg) EV em bolus. Foi realizada intubação com cânula nº 10 e manutenção com sevoflurano, mantendo-se o animal no 3º plano de Guedel. A cefazolina 1g/EV em dose única, foi administrada no início do procedimento cirúrgico para antibiótico profilaxia.

O experimento aconteceu em duas fases: cirurgia para criação do defeito no feto, seguido de correção imediata, a segunda cirurgia foi o sacrifício, realizado pouco antes do termo da gestação.

3.4.1 Criação do defeito

Na primeira etapa realizamos o procedimento cirúrgico, entre o 90º e o 93º dia de gestação e na segunda entre 110º e o 113º dia de gestação.

O defeito foi criado sempre por um único cirurgião, que desconhecia que técnica seria empregada para corrigi-lo. O cirurgião realizava o defeito e se ausentava imediatamente da sala cirúrgica.

O posicionamento do animal foi em decúbito lateral direito, com laparotomia materna paramamária esquerda de aproximadamente 15 cm, seguido de abertura por planos até a exposição e exteriorização do útero.

A posição fetal foi avaliada por palpação e a histerotomia de aproximadamente 6 cm de extensão foi realizada na projeção da coluna fetal, após o reparo das bordas uterinas com pontos de fio multifilamentar de ácido glicólico (Safil®), 2-0. A abertura do miométrio e membranas foi

realizada através de eletrocautério e tesoura. Retirou-se aproximadamente 120 ml líquido amniótico em seringas estéreis de 60 ml, que foram mantidas aquecidas em cuba com solução fisiológica a 37 °C, para posterior reposição.

Apenas cauda e as patas traseiras até o início do tronco do feto foram exteriorizadas, mantendo-se o restante dentro do útero. A ressecção da pele fetal foi fusiforme, medindo 3,0 x 2,0 cm, começando na altura da crista ilíaca e estendendo-se 3 cm acima dela . Retirou-se o músculo paravertebral bilateralmente com tesoura. Realizou-se incisão com bisturi no espaço intervertebral entre L5 e S1, seguida de ressecção dos processos espinhosos na extensão de 3 vértebras com tesoura bilateralmente (Figura 6). Após exposição da medula espinhal, foi retirado um fuso de 1,0 cm da dura-máter com tesoura Castroviejo curva confirmada pela visualização direta da saída de líquido e nenhuma lesão medular adicional foi realizada (Figura 7).

Figura 6 - Criação do defeito no dorso fetal, planos superficiais. (a) retirada de 3,0 x 2,0 cm da pele; (b) retirada do músculo para vertebral; (c) o ligamento interespinhoso e os processos espinhosos, são levantados pela pinça para melhor identificação do plano de clivagem e com a tesoura retiram-se três processos espinhosos

Figura 7 - Criação do defeito no dorso fetal, visualização e abertura dos planos profundos. (a) visualização da dura-máter e da medula íntegra; (b) a pinça levanta a dura-máter que foi excisada por tesoura. Nenhuma lesão adicional foi realizada na medula

3.4.2 Correção cirúrgica

Imediatamente após a realização do defeito, dois tipos de correção cirúrgica foram empregados. A seleção da técnica empregada foi realizada previamente por randomização simples, com tamanhos iguais entre os dois grupos, utilizando o programa estatístico R 2.11.0, para Windows.

No grupo 1, a técnica clássica neurocirúrgica foi executada sempre pelo mesmo neurocirurgião, que utilizando pinças para microcirurgia, realizou o fechamento da dura-máter com sutura contínua, usando fio de polipropileno, 6.0 Prolene®. A seguir, era realizada a aproximação das bordas dos músculos paravertebrais com fio de poliéster com polibutilato 5.0 (Ethibond ®), com pontos separados, seguindo-se do fechamento da pele através de sutura contínua, utilizando fio de polipropileno 2.0 com ranhuras (Quill ™), permitindo seu “travamento” na pele, dispensando a necessidade de nós nas extremidades da sutura (Figuras 8 e 9).

Figura 8 - Fechamento da dura-máter, usando a técnica neurocirúrgica. (a) a seta mostra o primeiro ponto dado na dura-máter. (b) entre as setas observa-se o aspecto da sutura contínua terminada

Figura 9 - Aproximação das bordas do músculo paravertebral, usando a técnica neurocirúrgica

No grupo 2, foi utilizada uma técnica simplificada que consistiu na colocação da celulose biosintética (Bionext ®- Brasil), película de 2,0 x 1,0 cm, sobreposta ao defeito da medula, sem qualquer ponto ou cola para sua fixação aos tecidos adjacentes (Figura 10). Não foi realizada a aproximação das bordas do músculo paravertebral, sendo realizada somente a sutura da pele, utilizando-se o mesmo fio e a mesma técnica de fechamento descrita acima para o grupo 1 (Figura 11).

A película de celulose biosintética (Bionext®, Bionext, Parana, Brasil) é produzida por cepas de bactérias selecionadas que produzem fibras contínuas de celulose randomicamente arranjadas, gerando uma estrutura microfibrilar de alta resistência, desenvolvida no Brasil, e aprovada pelo FDA desde 1995. A CB é mantida e transportada em temperatura ambiente e pode ser esterilizada e reesterilizada em óxido de etileno. É fornecida em unidades de 5 x 5 cm, permitindo recortes adequados ao tamanho da lesão na sala cirúrgica. Não necessita de preparo prévio para sua aplicação nos tecidos.

Figura 10 - Fechamento do defeito através da técnica simplificada. (a) colocação da película de celulose biosintética sobre a medula, no nível da musculatura; (b) a seta mostra a celulose posicionada e é possível ver a medula por transparência sob a celulose

Figura 11 - Fechamento da pele, usado em ambas as técnicas cirúrgicas. (a) o fechamento inicia-se no centro da lesão, seguido de sutura contínua usando uma agulha para cada extremidade da pele; (b) ao final da sutura corta-se o fio, as ranhuras travam o fio na pele, não necessitando de nó

Após a correção, o feto foi reconduzido ao útero e o líquido amniótico armazenado foi recolocado na cavidade amniótica, ao final da histerorrafia, que foi realizada através de sutura contínua, com fio multifilamentar de ácido glicólico (2.0Safil®). O abdome materno foi fechado por planos. Os batimentos cardíacos fetais foram avaliados ao fim do procedimento cirúrgico e o animal consciente reconduzido ao alojamento.

3.4.3 Sacrifício

O sacrifício materno-fetal foi realizado entre o 130° e o 134° dia de gestação (o termo natural ocorre entre 137 e 140 dias). Os animais receberam as mesmas medicações pré-anestésicas e anestésicas, sem necessidade de intubação orotraqueal, seguidas de injeção de cloreto de potássio (KCL) em bolus na circulação sistêmica. Após cessarem os batimentos cardíacos materno e fetal, os fetos foram retirados por laparotomia, seguida de histerotomia.

3.4.4 Avaliação macroscópica

Os fetos foram pesados, fotografados e a região operada foi examinada em relação ao fechamento da pele, sendo realizada a mensuração da cicatriz da pele.

Foi retirado um bloco da região operada com margem de dois processos espinhosos acima e abaixo da lesão. Os limites foram determinados pela palpação dos processos espinhosos e não pela cicatriz

da pele. As margens laterais distaram 3 cm, desde a pele até o corpo vertebral.

As peças ficaram em formaldeído por 7 dias e foram descalcificadas em solução tampão de EDTA (anexo), substituída a cada 3 dias por cerca de 40 dias. As peças foram cortadas em blocos a cada 0,5 cm, partindo do centro da lesão, cranial e caudalmente, para preparação do estudo microscópico.

Após a retirada dos blocos, na primeira etapa o restante da carcaça fetal foi congelada para avaliação do conteúdo da fossa posterior do crânio.

3.4.5 Ressonância magnética

Na segunda etapa, surgiu a oportunidade de realizar ressonância magnética nos fetos a fresco (após a retirada do bloco da medula), com o mesmo objetivo de averiguação de presença de herniação cerebelar pós-correção. Foi utilizada Ressonância magnética de campo aberto, para uso veterinário, de 0,23 tesla, usando eco espinal, sequência T1 e T2, com bobina DPA-coil e cortes de 5 mm. A ressonância foi realizada no máximo até 6 horas após o sacrifício. A relação da altura do cerebelo em relação ao forame magno foi avaliada.

3.4.6 Avaliação microscópica

3.4.6.1 Coloração pela hematoxilina-eosina

Foram confeccionadas lâminas de todos os blocos, que foram coradas com hematoxilina-eosina (HE).

Os cortes histológicos foram desparafinados em xilol, hidratados em gradiente alcoólico (70° a 100°) e água e corados durante 2 minutos pela Hematoxilina de Harris. Os cortes foram então lavados em água corrente e corados com eosina durante dez minutos; a seguir, foram lavados em água corrente, desidratados em gradiente alcoólico (95° e 100°), diafanizados em xilol e montados com lamínula e *entellan* para análise microscópica.

3.4.6.2 Coloração pelo picrossírius-hematoxilina

Foram selecionados os três blocos centrais da lesão para realização de coloração de picrossírius.

Os preparados histológicos foram corados com picrossírius-hematoxilina e o estudo foi realizado com auxílio do programa de análises de imagens digitais Image Pro-Plus (Media Cybernetics, USA) acoplado a um microscópio de luz Nikon Optiphot.

O corante Sirius Red é uma molécula alongada, com seis grupamentos sulfônicos ácidos e quatro grupamentos cromofóricos diazóticos. Demonstrou-se que os grupamentos sulfônicos do corante interagem fortemente com os aminoácidos básicos das moléculas dos diferentes tipos de colágeno, conferindo-lhe intensa cor vermelha, sendo

assim muito apropriado para sua identificação em cortes histológicos de rotina ⁵².

Os cortes histológicos foram desparafinados em xilol, hidratados em gradiente alcoólico (70° a 100°) e água e corados durante uma hora em uma solução 0,1% de Sirius Red dissolvido em solução aquosa saturada de ácido pícrico. Os cortes foram então lavados em água corrente e contracorados com hematoxilina de Harris fresca durante dois minutos; a seguir, foram lavados em água corrente, desidratados em gradiente alcoólico (70° a 100°), diafanizados em xilol e montados com lamínula e *entellan* para análise microscópica.

3.4.6.3 Análise qualitativa das fibras colagênicas

Utilizou-se a microscopia com luz polarizada pela sua capacidade de distinção entre fibras grossas e finas de colágeno ⁵³.

A coloração pelo método do picrossírius-hematoxilina faz com que uma grande quantidade de moléculas do Sirius Red disponha-se paralelamente às moléculas do colágeno, o que acarreta em um aumento considerável da birrefringência das fibras de colágeno quando observadas na microscopia com luz polarizada. O fenômeno do aumento da birrefringência ocorre exclusivamente com o colágeno. Assim, o método da coloração com o picrossírius-hematoxilina associado à microscopia com luz polarizada é um método para detecção de estruturas compostas de moléculas de colágeno orientadas. Além de se mostrarem fortemente birrefringentes, as fibras que contem colágeno assumem cores e

intensidades de birrefringência variadas, resultantes dos diferentes graus de agregação física dos diferentes tipos de colágeno.

O colágeno tipo I é composto por fibrilas grossas densamente agrupadas e conseqüentemente apresentam uma intensa birrefringência com coloração amarelada ou avermelhada. Já o colágeno tipo III é composto por fibrilas finas frouxamente dispostas, apresentando uma fraca birrefringência e coloração esverdeada ^{53,54}.

Desta forma, fibras finas, como aquelas presentes no tecido de granulação jovem, são reveladas como estruturas de cor esverdeada fracamente birrefringentes, enquanto as fibras grossas, características de lesões fibróticas maduras, são caracterizadas por sua forte birrefringência e pelas cores amarela ou vermelha ⁵⁵.

3.4.6.4 Avaliação qualitativa

- foi avaliada a aderência entre a medula e o tecido cicatricial, histologicamente definido pela presença de tecido nervoso em contato direto com o tecido muscular adjacente, utilizando a coloração HE.
- foi avaliada a formação de uma neo dura-máter, observando a presença de um tecido neoformado pela atividade do colágeno, identificado através da coloração de picrossirius, envolvendo a medula e isolando-a do músculo adjacente.
- foi avaliada a integridade dos funículos posteriores, por visualização direta, através da coloração HE.

- foi avaliada a morfologia dos cornos da substância cinzenta da medula, por visualização direta em coloração HE.

3.5 Resultados adversos e troca de fornecedor

Devido ao elevado número de perdas fetais tardias espontâneas que sugeriam infecção fetal de transmissão vertical, suspeitamos de infestação no local de criação e optamos por procurar outro fornecedor até que a situação fosse esclarecida para evitar atrasos no projeto.

Fizemos uma busca ativa de um novo fornecedor, conhecendo pessoalmente as condições da fazenda e controle do ciclo gestacional. Foi optado então, pela fazenda Cordeiros e Carneiros.

Na segunda etapa foi realizado um novo estudo piloto com 2 animais, uma vez que somente a raça Santa Inês estava disponível no novo fornecedor. Esta espécie apresentava um porte significativamente menor que a raça Hampshire Down aos 90 dias de gestação, nos obrigando a postergar a idade gestacional, pois o feto era muito pequeno para ser operado. As cirurgias foram realizadas entre 110° e 113 ° dias de gestação.

3.6 Análise estatística

O estudo estatístico foi realizado no Laboratório de Epidemiologia e Estatística do Instituto Dante Pazzanese com análise descritiva avaliando a homogeneidade dos grupos. Para tanto, utilizou-se o teste *Exato de Fisher*, considerando um nível de significância de 5%.

4 RESULTADOS

4.1 Evolução geral

Durante a execução da primeira etapa, dentre os 10 animais selecionados, houve 1 óbito fetal antes da cirurgia e 9 ovelhas foram operadas. Neste grupo ocorreu 1 morte materna no 2º dia pós-operatório (por provável contaminação bacteriana), 2 trabalhos de parto prematuros (TPP) precoces no 8º e 9º dias após a cirurgia e 3 casos de prematuridade tardia (esquema 1). Isso nos levou a investigar uma possível causa infecciosa para justificar a elevada perda fetal e prematuridade observada neste grupo. Foram realizadas sorologias para toxoplasmose, brucelose e leptospirose em todos os animais, sendo que os dois fetos que tiveram parto prematuro precoce foram submetidos a necropsia que resultou inconclusiva. Nos tecidos fetais também foi realizada polimerase chain reaction (PCR) para os mesmos agentes infecciosos, que resultou negativa.

Baseados na morte fetal pré-cirurgia e no elevado número de trabalho de partos prematuros, optamos pela extensão do estudo, realizando mais uma etapa, porém buscando outro fornecedor de animais, uma vez que não conseguimos chegar a uma causa clara desses eventos.

Na segunda etapa, 6 ovelhas foram operadas, das quais 1 caso evoluiu com TPP precoce no 5º dia pós-operatório e 1 caso com TPP tardio (caso 13), mas com sinais de óbito fetal de longa data (Esquema 1).

Esquema 1 - Evolução de todas ovelhas selecionadas para o estudo

Evolução dos casos nas duas etapas

- 1ª etapa:

- 2ª etapa:

TPP: trabalho de parto prematuro.
OF: óbito fetal.

A distribuição dos resultados segundo a técnica de correção empregada encontra-se na Tabela 1.

Tabela 1 - Evolução dos casos pós-procedimento cirúrgico que foram submetidos a correção de um defeito semelhante à MMC

Caso	IGC (dias)	IGS (dias)	IGP (dias)	Peso fetal (g)	PIU (dias)	Técnica de correção	Seguimento
1	95	133		3565	38	Simplificada	Sacrifício
2	90	130		4290	40	Simplificada	Sacrifício
3	90				2	Neurocirúrgica	Morte materna
4	90		128	1360	38	Neurocirúrgica	TPP tardio
5	91		99		9	Simplificada	TPP precoce
6	91		115	2265	24	Neurocirúrgica	TPP tardio
7	91	132		2170	41	Simplificada	Sacrifício
8	92		128	1125	36	Neurocirúrgica	TPP tardio
9	90		99		9	Neurocirúrgica	TPP precoce
10	110	134		1960	24	Neurocirúrgica	Sacrifício
11	112	134		1270	22	Simplificada	Sacrifício
12	110	134		1430	24	Neurocirúrgica	Sacrifício
13	111		132	620	21	Simplificada	TPP tardio, com sinais de OF
14	113	134		925	21	Neurocirúrgica	Sacrifício
15	113		118		5	Simplificada	TPP precoce

IGC: idade gestacional na cirurgia
 IGS: idade gestacional no sacrifício
 IGP: idade gestacional no parto
 PIU: permanência intrauterina

Para avaliarmos a duração da gravidez, segundo a técnica cirúrgica empregada, excluimos o caso 3 e 13. Consideramos TPP precoce, quando o parto ocorreu até 10 dias após a cirurgia (aproximadamente 100 dias de gestação) e como TPP tardio, quando o parto ocorreu espontaneamente entre 115 e 132 dias.

Gráfico 1 - Observa-se a duração da gestação, de acordo com a técnica cirúrgica empregada

Dentre os 14 animais que sobreviveram à cirurgia, 10 foram submetidos à análise patológica, 6 pertenciam ao grupo 1 e 4 ao grupo 2. Foram excluídos os 3 casos de parto prematuro precoce e o caso de parto prematuro tardio com sinais de maceração.

4.2 Macroscopia

Na avaliação macroscópica, a pele estava completamente fechada em todos os casos nos dois grupos, não sendo observados pontos de extravasamento de líquido. A cicatriz mediu aproximadamente entre 7 e 8 cm em todos os casos, exceto em dois casos de prematuro tardio, que mediu 5,0 cm. O fio de sutura estava presente em 100 % dos casos (Figuras 12 e 13).

Figura 12 - Aspecto da cicatriz da pele no momento do sacrifício. A pele completamente cicatrizada, sem pontos de extravasamento de líquido

Figura 13 - Fio de sutura na pele. A seta mostra a presença da extremidade do fio ancorada na pele

4.3 Ressonância magnética

Dos 4 fetos que realizaram a ressonância magnética, 3 eram do grupo 1 e 1 do grupo 2. Todos os casos mostraram ausência de herniação de cerebelo (Figura 14).

Figura 14 - Ressonância magnética pós-sacrifício. A linha verde encontra-se na altura do forame magno e c é o cerebelo acima desta

4.3 Análise Histopatológica

4.3.1 Grupo 1 - Técnica Neurocirúrgica

Em todos os casos de correção neurocirúrgica observamos uma acentuada aderência da medula às meninges e ao tecido cicatricial, que incluía músculo e pele. Foi observada em 5 dos 6 casos, uma verdadeira “herniação” do tecido nervoso na altura do ponto de sutura da dura-máter. Em todos estes casos também se observou uma perda da arquitetura da medula, com destruição do funículo posterior e, em 5 dos 6 casos, também uma perda da visualização da substância cinzenta (Figura 15).

Figura 15 - Micrografias obtidas de preparados histológicos da medula espinhal representativos do resultado da técnica neurocirúrgica. Cada uma das imagens (a, b, c, d, e, f) corresponde a um caso cirúrgico. A “herniação” do tecido nervoso ocorrida em 5 dos 6 casos está apontada pela seta nas imagens a, b, c, d, e. O funículo posterior foi danificado em todos os casos. Exceto no caso (f), todos os demais demonstraram uma destruição da arquitetura medular, não sendo possível a visualização dos cornos da substância cinzenta. Em a, c, d e f barra= 500 µm, b barra=100 µm, e barra=1000 µm, coloração HE

Em nenhum desses casos observou-se tecido organizado neoformado entre a medula e a cicatriz. Mesmo com o método da Picrossírius-polarização, não se observou a presença de tecido de reparação neoformado (Figura 16).

Figura 16 - Micrografia obtida de preparado histológico corado com Picrossírius e observado sob luz polarizada. Finas fibras de colágeno aparecem brilhando contra o fundo azul. Nota-se a ausência de tecido de reparação organizado entre a medula, o músculo e a pele. Este caso é representativo de todos os demais operados com a técnica neurocirúrgica. Objetiva de 40x

4.4.2 Grupo 2 - Técnica Simplificada

Em todos os casos de correção simplificada foi observada ausência de aderência entre a medula e a cicatriz da pele e ou músculo. Observou-se a preservação do funículo posterior e da substância cinzenta em todos os casos (Figura 17).

Figura 17 - Micrografias obtidas de preparados histológicos da medula espinhal representativos do resultado da técnica simplificada. Cada uma das imagens (a, b, c, d) corresponde a um caso cirúrgico. Todos os casos apresentam o funículo posterior íntegro e os pontilhados contornam os cornos da substância cinzenta, mostrando uma preservação da arquitetura da medula espinhal. Em a, b, c barra= 500µm, d barra= 1000µm, coloração HE

Em todos os casos foi observada a formação de uma camada de tecido novo envolvendo celulose, de modo a estabelecer uma continuidade anatômica com a dura-máter original. Este tecido, e a própria celulose, separaram o tecido nervoso da cicatriz de músculo e pele.

Usando-se o método da Picrossirius-polarização pode se observar a formação de colágeno em abundância, sob a forma fibras, fortemente birrefringentes de coloração avermelhadas que brilham contra o fundo escuro. Esse tecido mostra-se organizado com as fibras colágenas dispostas paralelamente entre si. Trata-se de um tecido novo de reparação, em continuidade com a dura-máter, podendo ser considerado uma neodura-máter (Figura 18).

Figura 18 - Micrografia obtida de preparado histológico corado com Picrossirius e observado sob luz polarizada. A seta branca mostra a presença de fibras de colágeno grossas, fortemente birrefringentes, justapostas à membrana de celulose (seta amarela), e em continuidade com a dura-máter. Este tecido neoformado tem padrão organizado com fibras paralelas entre si, caracterizando-se como uma neodura-máter. Este caso é representativo de todos os demais operados com a técnica simplificada. Objetiva de 40X

4.5 Análise Estatística

As tabelas a seguir mostram a diferença estatística entre as duas técnicas cirúrgicas no que se refere a aderência entre a medula e a cicatriz, formação de uma neodura-máter, integridade dos cornos posteriores e visualização dos cornos da substância cinzenta.

Tabela 2 - Tabela de frequência simples e relativa à técnica cirúrgica empregada e a aderência da medula à cicatriz

Técnica cirúrgica	Aderência		Total
	<i>Sim</i>	Não	
Neurocirurgia	6	0	6
Simplificada	0	4	4
Total	6	4	10

Teste Exato de Fisher
P=0,009

Tabela 3 - Tabela de frequência simples e relativa à técnica cirúrgica empregada e a formação de uma neodura-máter

Técnica cirúrgica	Neodura-máter		Total
	<i>Sim</i>	Não	
Neurocirurgia	0	6	6
Simplificada	4	0	4
Total	4	6	10

Teste Exato de Fisher
P=0,009

Tabela 4 - Tabela de frequência simples e relativa à técnica cirúrgica empregada e a preservação do funículo posterior

Técnica cirúrgica	Preservação do funículo posterior		Total
	Sim	Não	
Neurocirurgia	0	6	6
Simplificada	4	0	4
Total	4	6	10

Teste Exato de Fisher
 $P=0,009$

Tabela 5 - Tabela de frequência simples e relativa à técnica cirúrgica empregada e a visualização dos cornos da substância cinzenta

Técnica cirúrgica	Visualização dos cornos da substância cinzenta		Total
	Sim	Não	
Neurocirurgia	1	5	6
Simplificada	4	0	4
Total	5	5	10

Teste Exato de Fisher
 $P=0,047$

As Tabelas 2, 3, 4 e 5 indicam que para os quatro fatores avaliados pela análise com o teste exato de Fisher, observa-se uma diferença estatisticamente significativa ($p<0,05$). O grupo da Neurocirurgia apresenta maior aderência que o grupo da técnica Simplificada, que por sua vez apresenta a formação de uma neodura-máter e maior preservação dos funículos posteriores e cornos medulares.

5 DISCUSSÃO

Utilizando como modelo animal o feto de ovelha para o estudo da correção pré-natal de um defeito semelhante à mielomeningocele, observamos que a técnica neurocirúrgica clássica levou a um desarranjo importante da citoarquitetura medular, com aderência entre a medula, as meninges e a cicatriz propriamente dita. Por outro lado, a técnica simplificada de correção, utilizando a celulose biosintética como interface, induz à formação de uma neodura-máter que “isola” a medula, evitando sua aderência às meninges e aos tecidos adjacentes. A técnica simplificada ainda leva a uma maior preservação da citoarquitetura medular, quando comparada à técnica neurocirúrgica clássica.

Vários estudos para correção intrauterina de mielomeningocele, sugeriam que a correção pré-natal levava a uma menor destruição da medula exposta ao líquido amniótico e melhores resultados clínicos⁵⁶⁻⁵⁹. O estudo do MOMS, realizado em humanos, corroborou esta teoria demonstrando que a correção intra-uterina reduziu a necessidade de colocação de shunt ventrículo peritoneal de 82% para 40%, quando se comparou a correção pós-natal com a pré-natal, respectivamente. Este estudo ainda demonstrou uma superioridade cognitiva e motora na avaliação até os 30 meses de idade, no grupo submetido à correção pré-natal²⁴.

Alguns estudos já haviam demonstrado que a cirurgia intra-uterina, realizada a céu aberto, aumenta o risco de trabalho de parto prematuro e de complicações maternas, tais como, deiscência uterina e edema agudo de

pulmão ^{24,56,59}. O estudo MOMS mostrou que a idade gestacional média ao nascimento foi de 34,1 semanas nos casos operados antes, comparada a 37,3 semanas, quando a cirurgia foi realizada após o nascimento. Observou-se também uma diferença significativa no número de casos de ruptura espontânea de membranas de 46% nos casos de cirurgia aberta, contra 8% dos casos que realizaram cirurgia pós-natal ²⁴.

A elevada morbidade materna associada à correção a céu aberto, sugere que métodos minimamente invasivos devam ser o futuro da correção antenatal de mielomeningocele. Alguns autores têm estudado a correção endoscópica do defeito, tanto em modelo animal ^{33,39,60} quanto em humanos ²⁷, neste último caso ainda com resultados incipientes, porém promissores. A nosso ver, para o sucesso da correção por via endoscópica, seria necessário desenvolver uma técnica simplificada de fechamento do defeito propriamente dito, já que a técnica neurocirúrgica clássica prevê a sutura da dura-máter, a reaproximação da musculatura e o fechamento da pele em planos distintos. O fechamento clássico, não apenas seria de difícil execução técnica por via endoscópica, mas aumentaria significativamente o tempo cirúrgico, que acreditamos ser um ponto importante para o sucesso da técnica endoscópica. Com o objetivo de simplificar o fechamento do defeito, vários materiais foram testados em modelo animal, para substituir a dura-máter. Também o modo de fixação destes materiais variou entre os autores, sendo que alguns utilizam colas, selantes ou sutura para fixá-los sobre o defeito ^{31,37,39}.

A celulose biosintética foi testada como substituto de dura-máter em cães submetidos à craniotomia por Mello et al.³⁷, tendo induzido à formação de uma neodura-máter. Nosso grupo testou a celulose para correção de um defeito na coluna em feto de coelho²⁹ e posteriormente em ovinos^{30,38}, demonstrando que o material não causou reação de corpo estranho e inclusive levou à formação de uma neodura-máter, evitando a aderência entre a cicatriz e a medula. No presente estudo, usamos a celulose sobreposta à medula, sem utilizar sutura ou substância adesiva para fixá-la à medula, apenas a pele foi fechada sobre a celulose, para mantê-la sobre o defeito.

Uma das limitações do presente estudo é que a lesão que foi criada é diferente da lesão da mielomenigocele em fetos humanos. A lesão que produzimos foi imediatamente corrigida, portanto não houve exposição crônica da medula ao líquido amniótico, apenas a dura-máter foi retirada, não tendo sido realizada qualquer lesão intencional da medula. Como nosso objetivo era comparar o efeito de técnicas distintas de correção sobre a medula, era importante garantir que o mesmo tipo de defeito fosse corrigido, garantindo-se a reprodutibilidade da lesão. Assumimos que a lesão medular seria difícil de reproduzir, e portanto optamos por realizar apenas a lesão da dura-máter, ao nosso ver mais reprodutível. Avaliando os resultados encontrados, julgamos que este aspecto pode ter nos favorecido na comparação, pois levando-se em conta que a correção foi realizada sobre uma medula “normal”, nossos achados sugerem que a técnica neurocirúrgica, per se, pode causar lesão em uma medula normal e não

desencadeia uma resposta no processo de cicatrização favorável a preservação da medula. Outros estudos serão necessários para avaliar as causas deste desarranjo, bem como, se ele isoladamente pode piorar uma lesão pré-estabelecida, de certa forma agravando as repercussões neurológicas.

No presente estudo, demonstramos a superioridade a nível medular da técnica simplificada, porém seria interessante avaliar se a preservação citoarquitetural se traduz em menor repercussão no desenvolvimento neuropsicomotor. Seria importante também avaliar o seu efeito sobre a fossa posterior, para avaliar se a técnica simplificada também é capaz de fazer com que o cerebelo volte à sua posição original, revertendo a herniação cerebelar. Em teoria, a preservação neuronal a nível medular deve levar a menor repercussão no desenvolvimento neuropsicomotor, com menos sequelas neurológicas, a longo prazo.

Outra limitação foi o pequeno número de casos que resultaram disponíveis para comparação. No entanto, as diferenças foram tão significativas entre todos os aspectos estudados que nos questionamos sobre a necessidade de aumentar a casuística, já que todos os casos do grupo 1 apresentaram aderência meningoneural, enquanto ela estava ausente em todos os casos do grupo 2, onde ainda se observou intensa atividade reparadora com a formação de uma neodura-máter.

Um dos pontos fortes do nosso estudo, diz respeito ao que se conhece como “medula presa”. Na correção pós-natal em humanos, quando se utilizam métodos de imagem, observa-se aderência da medula ao tecido

cicatricial em todos os casos operados com a técnica neurocirúrgica clássica ²⁶. Parte destes recém-nascidos irá apresentar manifestações clínicas durante sua evolução definida como “Síndrome da Medula Presa” (SMP). Os sintomas associados à SMP são a deterioração neuronal progressiva, convulsões, bexiga neurogênica, incontinência fecal e escoliose severa ^{61,62}. Frente a esta situação é necessário reoperar o defeito para “soltar” a medula, o que acaba levando a uma piora do prognóstico neurológico. Utilizando-se a técnica simplificada não observamos aderência entre a medula e a cicatriz da pele, o que tem o potencial de evitar o desenvolvimento da SMP, na evolução destes recém-nascidos.

Avaliando este aspecto da medula presa, poucos estudos foram publicados ^{24,63,64} comparando a evolução de fetos humanos operados antes e após o nascimento. Danzer et al. já relatavam uma diferença significativa entre a evolução pós-natal dos fetos submetidos à correção intra-uterina, quando comparados aos corrigidos após o nascimento ⁶³. Ambos os estudos mais recentes publicados, comparando a correção pré e pós-natal ^{24,64}, mostraram maior incidência de SMP nos fetos operados intra-útero. No estudo do MOMS, ocorreram 6 casos de medula presa, no total de 77 operados intra-útero, contra 1 caso entre 80 operados após o nascimento. Verbeek et al. mostram 5 casos de SMP do total de 13 operados intra-útero, contra 2 casos entre 13 operados após o nascimento ⁶⁴.

Uma possível explicação para este resultado poderia estar relacionada a uma diferença significativa entre a cicatrização fetal e a neonatal. No entanto, se fosse esse o caso, estes achados indicariam uma

“pior cicatrização” no período fetal, o que seria difícil de justificar já que a cicatrização fetal é reconhecidamente excelente, pois o feto cicatriza sem formar cicatriz ^{47,65}. No grupo com correção neurocirúrgica, não se observa uma resposta cicatricial fetal adequada para a reparação do defeito.

Pensando em outra hipótese para explicar esta diferença, nos parece razoável pensar na sutura da dura-máter como “causador” de aderência entre as meninges e o tecido nervoso. Haines, em 1991, já havia demonstrado que a penetração de uma agulha para sutura da dura-máter desencadeia uma intensa resposta inflamatória que culmina na aderência meningodural ⁶⁶. Palm et al., em estudo com cães, demonstraram que a utilização de clips não penetrantes, para fechamento da dura, evita a aderência entre a medula e as meninges, enquanto que a penetração da dura, assim como a utilização de diferentes fios de sutura, induz à adesão ⁶⁷.

Em nossa casuística, todos os casos operados pela técnica neurocirúrgica apresentaram aderência da medula à cicatriz, se isto foi causado pela reação inflamatória produzida pelo fio de sutura da dura-máter ⁶⁷, esta mesma reação inflamatória também pode ter contribuído para o desarranjo estrutural da medula no nível da lesão. Pois, estudos em modelo de lesão medular aguda mostram que a supressão da resposta inflamatória pode reduzir a lesão neuronal ⁶⁸.

Outra hipótese seria que quando se tenta aproximar as bordas de dura-máter sobre o defeito, inevitavelmente causa-se um estrangulamento da medula, que talvez comprometa a circulação local levando as lesões adicionais, como a perda de sua arquitetura.

Nossos resultados mostraram que 3 dos 7 casos submetidos à correção neurocirúrgica tiveram trabalho de parto prematuro e apenas 1 de 7 casos de correção simplificada evoluiu dessa forma, porém este único caso apresentava sinais de óbito fetal de longa data. A diferença não chega a ser estatisticamente significativa, porém a relação entre trabalho de parto prematuro e inflamação é bem conhecida. Seria interessante avaliar se a atividade inflamatória crônica, causada pela presença do fio de sutura não absorvível, pode ter contribuído para esta diferença.

Um estudo anterior do nosso grupo ⁶⁵, utilizando um substituto de pele para fechamento de um defeito de pele tão grande que não permite a sua sutura, mostrou que o feto “achou o seu caminho” entre as duas lâminas da pele artificial e produziu, na topografia correta, ou seja acima da derme, uma nova epiderme. Como este tipo de regeneração, nunca havia sido demonstrado em adultos nossa hipótese foi de que a reparação fetal excelente poderia explicar esta diferença, ou seja, ao receber o estímulo certo, pela sua excelente capacidade de regeneração, o feto pode formar um tecido novo de reparo, muito semelhante ao original sem lesão. No presente estudo, no grupo da correção simplificada, o feto “achou o seu caminho” e provavelmente estimulado pela celulose como guia, observou-se uma intensa atividade de tecido de reparação, pela presença de um neo colágeno na topografia correta, formando assim uma neodura-máter, porém no outro grupo isto não foi observado. Acreditamos que esta diferença pode ser explicada no grupo 1, pela presença do material de sutura causando uma inflamação crônica local e também um prejuízo na circulação medular ao se

aproximar as bordas de dura-máter acima da lesão, esses dois mecanismos podem potencialmente prejudicar a cicatrização fetal não permitindo o restabelecimento dos planos teciduais originais, que parece ser uma “tendência natural” do feto.

Até onde vai nosso conhecimento, nenhum estudo avaliou os efeitos da técnica neurocirúrgica clássica sobre a medula na vida fetal. No presente estudo não só pudemos estabelecer estes aspectos, mas também comparamos estas repercussões com uma técnica cirúrgica simplificada. Quando se decidiu corrigir a meningomielocele à céu aberto, houve apenas a transposição da mesma técnica realizada após o nascimento, para a correção intra-uterina ²⁴. Nossos achados sugerem que a técnica clássica possa exercer efeitos indesejados no feto, quando comparados ao recém-nascido, maior incidência, ou incidência mais precoce, de medula presa, que poderia ser evitada com a técnica simplificada.

Isso nos leva a sugerir que, se estes achados forem confirmados em outros estudos, e se for demonstrado que esta técnica simplificada também pode reverter a herniação do cerebelo, a técnica cirúrgica antenatal do defeito deva ser modificada, mesmo se utilizando a via a céu aberto para correção.

6 CONCLUSÃO

A técnica simplificada foi superior à técnica neurocirúrgica, permitindo a preservação da citoarquitetura normal da medula e evitando a aderência da medula à cicatriz, enquanto que a técnica neurocirúrgica causou dano sobre a medula, levando a um desarranjo estrutural ao nível da lesão, além de significativa aderência à cicatriz, que pode favorecer o desenvolvimento de medula presa. Nossos achados sugerem que a técnica utilizada atualmente na correção pré-natal da mielomeningocele em fetos humanos deve ser reavaliada.

7 ANEXOS

Anexo A: Lei nº 11.794, que estabelece os procedimentos para o uso científico de animais

Presidência da República
Casa Civil
Subchefia para Assuntos Jurídicos

LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008.

[Mensagem de veto](#)

Regulamenta o inciso VII do § 1º do art. 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais; revoga a Lei nº 6.638, de 8 de maio de 1979; e dá outras providências.

O PRESIDENTE DA REPÚBLICA Faço saber que o Congresso Nacional decreta e eu sanciono a seguinte Lei:

CAPÍTULO I

DAS DISPOSIÇÕES PRELIMINARES

Art. 1º A criação e a utilização de animais em atividades de ensino e pesquisa científica, em todo o território nacional, obedece aos critérios estabelecidos nesta Lei.

§ 1º A utilização de animais em atividades educacionais fica restrita a:

I – estabelecimentos de ensino superior;

II – estabelecimentos de educação profissional técnica de nível médio da área biomédica.

§ 2º São consideradas como atividades de pesquisa científica todas aquelas relacionadas com ciência básica, ciência aplicada, desenvolvimento tecnológico, produção e controle da qualidade de drogas, medicamentos, alimentos, imunobiológicos, instrumentos, ou quaisquer outros testados em animais, conforme definido em regulamento próprio.

§ 3º Não são consideradas como atividades de pesquisa as práticas zootécnicas relacionadas à agropecuária.

Art. 2º O disposto nesta Lei aplica-se aos animais das espécies classificadas como filo **Chordata**, subfilo **Vertebrata**, observada a legislação ambiental.

Art. 3º Para as finalidades desta Lei entende-se por:

I – filo **Chordata**: animais que possuem, como características exclusivas, ao menos na fase embrionária, a presença de notocorda, fendas branquiais na faringe e tubo nervoso dorsal único;

II – subfilo **Vertebrata**: animais cordados que têm, como características exclusivas, um encéfalo grande encerrado numa caixa craniana e uma coluna vertebral;

III – experimentos: procedimentos efetuados em animais vivos, visando à elucidação de fenômenos fisiológicos ou patológicos, mediante técnicas específicas e preestabelecidas;

IV – morte por meios humanitários: a morte de um animal em condições que envolvam, segundo as espécies, um mínimo de sofrimento físico ou mental.

Parágrafo único. Não se considera experimento:

I – a profilaxia e o tratamento veterinário do animal que deles necessite;

II – o anilhamento, a tatuagem, a marcação ou a aplicação de outro método com finalidade de identificação do animal, desde que cause apenas dor ou aflição momentânea ou dano passageiro;

III – as intervenções não-experimentais relacionadas às práticas agropecuárias.

CAPÍTULO II

DO CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL – CONCEA

Art. 4º Fica criado o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA.

Art. 5º Compete ao CONCEA:

I – formular e zelar pelo cumprimento das normas relativas à utilização humanitária de animais com finalidade de ensino e pesquisa científica;

II – credenciar instituições para criação ou utilização de animais em ensino e pesquisa científica;

III – monitorar e avaliar a introdução de técnicas alternativas que substituam a utilização de animais em ensino e pesquisa;

IV – estabelecer e rever, periodicamente, as normas para uso e cuidados com animais para ensino e pesquisa, em consonância com as convenções internacionais das quais o Brasil seja signatário;

V – estabelecer e rever, periodicamente, normas técnicas para instalação e funcionamento de centros de criação, de biotérios e de laboratórios de experimentação animal, bem como sobre as condições de trabalho em tais instalações;

VI – estabelecer e rever, periodicamente, normas para credenciamento de instituições que criem ou utilizem animais para ensino e pesquisa;

VII – manter cadastro atualizado dos procedimentos de ensino e pesquisa realizados ou em andamento no País, assim como dos pesquisadores, a partir de informações remetidas pelas Comissões de Ética no Uso de Animais - CEUAs, de que trata o art. 8º desta Lei;

VIII – apreciar e decidir recursos interpostos contra decisões das CEUAs;

IX – elaborar e submeter ao Ministro de Estado da Ciência e Tecnologia, para aprovação, o seu regimento interno;

X – assessorar o Poder Executivo a respeito das atividades de ensino e pesquisa tratadas nesta Lei.

Art. 6º O CONCEA é constituído por:

I – Plenário;

II – Câmaras Permanentes e Temporárias;

III – Secretaria-Executiva.

§ 1º As Câmaras Permanentes e Temporárias do CONCEA serão definidas no regimento interno.

§ 2º A Secretaria-Executiva é responsável pelo expediente do CONCEA e terá o apoio administrativo do Ministério da Ciência e Tecnologia.

§ 3º O CONCEA poderá valer-se de consultores **ad hoc** de reconhecida competência técnica e científica, para instruir quaisquer processos de sua pauta de trabalhos.

Art. 7º O CONCEA será presidido pelo Ministro de Estado da Ciência e Tecnologia e integrado por:

I – 1 (um) representante de cada órgão e entidade a seguir indicados:

- a) Ministério da Ciência e Tecnologia;
- b) Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq;
- c) Ministério da Educação;
- d) Ministério do Meio Ambiente;
- e) Ministério da Saúde;
- f) Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento;
- g) Conselho de Reitores das Universidades do Brasil – CRUB;
- h) Academia Brasileira de Ciências;
- i) Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência;
- j) Federação das Sociedades de Biologia Experimental;
- l) Colégio Brasileiro de Experimentação Animal;
- m) Federação Nacional da Indústria Farmacêutica;

II – 2 (dois) representantes das sociedades protetoras de animais legalmente estabelecidas no País.

§ 1º Nos seus impedimentos, o Ministro de Estado da Ciência e Tecnologia será substituído, na Presidência do CONCEA, pelo Secretário-Executivo do respectivo Ministério.

§ 2º O Presidente do CONCEA terá o voto de qualidade.

§ 3º Os membros do CONCEA não serão remunerados, sendo os serviços por eles prestados considerados, para todos os efeitos, de relevante serviço público.

CAPÍTULO III

DAS COMISSÕES DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUAs

Art. 8º É condição indispensável para o credenciamento das instituições com atividades de ensino ou pesquisa com animais a constituição prévia de Comissões de Ética no Uso de Animais – CEUAs.

Art. 9º As CEUAs são integradas por:

- I – médicos veterinários e biólogos;
- II – docentes e pesquisadores na área específica;

III – 1 (um) representante de sociedades protetoras de animais legalmente estabelecidas no País, na forma do Regulamento.

Art. 10. Compete às CEUAs:

I – cumprir e fazer cumprir, no âmbito de suas atribuições, o disposto nesta Lei e nas demais normas aplicáveis à utilização de animais para ensino e pesquisa, especialmente nas resoluções do CONCEA;

II – examinar previamente os procedimentos de ensino e pesquisa a serem realizados na instituição à qual esteja vinculada, para determinar sua compatibilidade com a legislação aplicável;

III – manter cadastro atualizado dos procedimentos de ensino e pesquisa realizados, ou em andamento, na instituição, enviando cópia ao CONCEA;

IV – manter cadastro dos pesquisadores que realizem procedimentos de ensino e pesquisa, enviando cópia ao CONCEA;

V – expedir, no âmbito de suas atribuições, certificados que se fizerem necessários perante órgãos de financiamento de pesquisa, periódicos científicos ou outros;

VI – notificar imediatamente ao CONCEA e às autoridades sanitárias a ocorrência de qualquer acidente com os animais nas instituições credenciadas, fornecendo informações que permitam ações saneadoras.

§ 1º Constatado qualquer procedimento em descumprimento às disposições desta Lei na execução de atividade de ensino e pesquisa, a respectiva CEUA determinará a paralisação de sua execução, até que a irregularidade seja sanada, sem prejuízo da aplicação de outras sanções cabíveis.

§ 2º Quando se configurar a hipótese prevista no § 1º deste artigo, a omissão da CEUA acarretará sanções à instituição, nos termos dos arts. 17 e 20 desta Lei.

§ 3º Das decisões proferidas pelas CEUAs cabe recurso, sem efeito suspensivo, ao CONCEA.

§ 4º Os membros das CEUAs responderão pelos prejuízos que, por dolo, causarem às pesquisas em andamento.

§ 5º Os membros das CEUAs estão obrigados a resguardar o segredo industrial, sob pena de responsabilidade.

CAPÍTULO IV

DAS CONDIÇÕES DE CRIAÇÃO E USO DE ANIMAIS PARA ENSINO E PESQUISA CIENTÍFICA

Art. 11. Compete ao Ministério da Ciência e Tecnologia licenciar as atividades destinadas à criação de animais, ao ensino e à pesquisa científica de que trata esta Lei.

§ 1º [\(VETADO\)](#)

§ 2º [\(VETADO\)](#)

§ 3º [\(VETADO\)](#)

Art. 12. A criação ou a utilização de animais para pesquisa ficam restritas, exclusivamente, às instituições credenciadas no CONCEA.

Art. 13. Qualquer instituição legalmente estabelecida em território nacional que crie ou utilize animais para ensino e pesquisa deverá requerer credenciamento no CONCEA, para uso de animais, desde que, previamente, crie a CEUA.

§ 1º A critério da instituição e mediante autorização do CONCEA, é admitida a criação de mais de uma CEUA por instituição.

§ 2º Na hipótese prevista no § 1º deste artigo, cada CEUA definirá os laboratórios de experimentação animal, biotérios e centros de criação sob seu controle.

Art. 14. O animal só poderá ser submetido às intervenções recomendadas nos protocolos dos experimentos que constituem a pesquisa ou programa de aprendizado quando, antes, durante e após o experimento, receber cuidados especiais, conforme estabelecido pelo CONCEA.

§ 1º O animal será submetido a eutanásia, sob estrita obediência às prescrições pertinentes a cada espécie, conforme as diretrizes do Ministério da Ciência e Tecnologia, sempre que, encerrado o experimento ou em qualquer de suas fases, for tecnicamente recomendado aquele procedimento ou quando ocorrer intenso sofrimento.

§ 2º Excepcionalmente, quando os animais utilizados em experiências ou demonstrações não forem submetidos a eutanásia, poderão sair do biotério após a intervenção, ouvida a respectiva CEUA quanto aos critérios vigentes de segurança, desde

que destinados a pessoas idôneas ou entidades protetoras de animais devidamente legalizadas, que por eles queiram responsabilizar-se.

§ 3º Sempre que possível, as práticas de ensino deverão ser fotografadas, filmadas ou gravadas, de forma a permitir sua reprodução para ilustração de práticas futuras, evitando-se a repetição desnecessária de procedimentos didáticos com animais.

§ 4º O número de animais a serem utilizados para a execução de um projeto e o tempo de duração de cada experimento será o mínimo indispensável para produzir o resultado conclusivo, poupando-se, ao máximo, o animal de sofrimento.

§ 5º Experimentos que possam causar dor ou angústia desenvolver-se-ão sob sedação, analgesia ou anestesia adequadas.

§ 6º Experimentos cujo objetivo seja o estudo dos processos relacionados à dor e à angústia exigem autorização específica da CEUA, em obediência a normas estabelecidas pelo CONCEA.

§ 7º É vedado o uso de bloqueadores neuromusculares ou de relaxantes musculares em substituição a substâncias sedativas, analgésicas ou anestésicas.

§ 8º É vedada a reutilização do mesmo animal depois de alcançado o objetivo principal do projeto de pesquisa.

§ 9º Em programa de ensino, sempre que forem empregados procedimentos traumáticos, vários procedimentos poderão ser realizados num mesmo animal, desde que todos sejam executados durante a vigência de um único anestésico e que o animal seja sacrificado antes de recobrar a consciência.

§ 10. Para a realização de trabalhos de criação e experimentação de animais em sistemas fechados, serão consideradas as condições e normas de segurança recomendadas pelos organismos internacionais aos quais o Brasil se vincula.

Art. 15. O CONCEA, levando em conta a relação entre o nível de sofrimento para o animal e os resultados práticos que se esperam obter, poderá restringir ou proibir experimentos que importem em elevado grau de agressão.

Art. 16. Todo projeto de pesquisa científica ou atividade de ensino será supervisionado por profissional de nível superior, graduado ou pós-graduado na área biomédica, vinculado a entidade de ensino ou pesquisa credenciada pelo CONCEA.

CAPÍTULO V

DAS PENALIDADES

Art. 17. As instituições que executem atividades reguladas por esta Lei estão sujeitas, em caso de transgressão às suas disposições e ao seu regulamento, às penalidades administrativas de:

I – advertência;

II – multa de R\$ 5.000,00 (cinco mil reais) a R\$ 20.000,00 (vinte mil reais);

III – interdição temporária;

IV – suspensão de financiamentos provenientes de fontes oficiais de crédito e fomento científico;

V – interdição definitiva.

Parágrafo único. A interdição por prazo superior a 30 (trinta) dias somente poderá ser determinada em ato do Ministro de Estado da Ciência e Tecnologia, ouvido o CONCEA.

Art. 18. Qualquer pessoa que execute de forma indevida atividades reguladas por esta Lei ou participe de procedimentos não autorizados pelo CONCEA será passível das seguintes penalidades administrativas:

I – advertência;

II – multa de R\$ 1.000,00 (mil reais) a R\$ 5.000,00 (cinco mil reais);

III – suspensão temporária;

IV – interdição definitiva para o exercício da atividade regulada nesta Lei.

Art. 19. As penalidades previstas nos arts. 17 e 18 desta Lei serão aplicadas de acordo com a gravidade da infração, os danos que dela provierem, as circunstâncias agravantes ou atenuantes e os antecedentes do infrator.

Art. 20. As sanções previstas nos arts. 17 e 18 desta Lei serão aplicadas pelo CONCEA, sem prejuízo de correspondente responsabilidade penal.

Art. 21. A fiscalização das atividades reguladas por esta Lei fica a cargo dos órgãos dos Ministérios da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, da Saúde, da Educação, da Ciência e Tecnologia e do Meio Ambiente, nas respectivas áreas de competência.

CAPÍTULO VI

DISPOSIÇÕES GERAIS E TRANSITÓRIAS

Art. 22. As instituições que criem ou utilizem animais para ensino ou pesquisa existentes no País antes da data de vigência desta Lei deverão:

I – criar a CEUA, no prazo máximo de 90 (noventa) dias, após a regulamentação referida no art. 25 desta Lei;

II – compatibilizar suas instalações físicas, no prazo máximo de 5 (cinco) anos, a partir da entrada em vigor das normas estabelecidas pelo CONCEA, com base no inciso V do **caput** do art. 5º desta Lei.

Art. 23. O CONCEA, mediante resolução, recomendará às agências de amparo e fomento à pesquisa científica o indeferimento de projetos por qualquer dos seguintes motivos:

I – que estejam sendo realizados sem a aprovação da CEUA;

II – cuja realização tenha sido suspensa pela CEUA.

Art. 24. Os recursos orçamentários necessários ao funcionamento do CONCEA serão previstos nas dotações do Ministério da Ciência e Tecnologia.

Art. 25. Esta Lei será regulamentada no prazo de 180 (cento e oitenta) dias.

Art. 26. Esta Lei entra em vigor na data de sua publicação.

Art. 27. Revoga-se a [Lei nº 6.638, de 8 de maio de 1979](#).

Brasília, 8 de outubro de 2008; 187º da Independência e 120º da República.

LUIZ INÁCIO LULA DA SILVA

Tarso Genro

Reinhold Stephanes

José Gomes Temporão

Miguel Jorge

Luiz Antonio Rodrigues Elias

Carlos Minc

Anexo B: Carta de aprovação da CAPPesq

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 10/03/2010, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **1226/09** intitulado: "**COMPARAÇÃO ENTRE DUAS TÉCNICAS CIRÚRGICAS PARA CORREÇÃO DE MENINGOMIELOCELE EM FETOS DE OVELHA**", apresentado pelo Departamento de **PATOLOGIA**.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: **DRA. DENISE ARAUJO LAPA PEDREIRA**

Pesquisador (a) Executante: **SILVIA REJANE FONTOURA HERRERA**

CAPPesq, 11 de Março de 2010

PROF. DR. EDUARDO MASSAD
Presidente

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

Anexo C: Solução de EDTA para descalcificação

EDTA 7% em tampão fosfato 0,2M pH=7,4

1 litro de tampão fosfato 0,2M.

70g de EDTA.

Misturar em agitador magnético.

Acrescentar 40ml de formaldeído.

Preparo da solução Tampão fosfato de sódio a 0,2M pH 7,4

Misturar:

19ml de solução A

81ml de solução B.

Solução A:

27,6g de Fosfato de sódio monobásico 0,2M ($\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{H}_2\text{O}$; PM=138,01).

1000ml de água destilada.

Solução B:

28,4g de Fosfato de sódio dibásico 0,2M (Na_2HPO_4 ; PM=141,98).

1000ml de água destilada.

8 REFERÊNCIAS

- 1- Larsen WJ. *Essentials of human embriology*. Ney York: Churchill Livingstone; 1998. p.394.
- 2- Laurence KM. The genetics and prevention of neural tube defects and “uncomplicated” hydrocephalus. In: Emery AEH, Rimoin DL. *Principles and practice of medical genetics*. London: Churchill Livingstone; 1992. p.323-46.
- 3- Northup H, Volcik KA. Spina bifida and other neural tube defects. *Curr Probl Pediatr*. 2000;30: 313-32.
- 4- Sadler TW. *Langman’s medical embryology*. 8^a ed. Philadelphia: Lippincott Williams e Wilkins; 2000. p.504.
- 5- Mitchell LE, Adzick NS, Melchionne J, Pasquariello PS, Sutton LN, Whitehead AS. Spina Bífida. *Lancet*. 2004;364:1885-95.
- 6- Rekate HL. *Coomprehensive management of spina bifida*. Boca Raton: CRC Press; 1991.
- 7- Melvin EC, George TM, Worley G, Franklin A, Mackeley J, Viles K et al. Genetics studies in neural tube defects: NTD Collaborative Group. *Pediatr Neurosurg*. 2000;32:1-9.
- 8- WHO- Word Health Organization. Word Atlas of birth defects. Geneva: 2003. Disponível em: <http://www.who.int/genomics/publications/en>.

-
- 9- Nascimento LF, Pinto CO, Proença FP, Gotlieb SL. Prevalência de anomalias congênitas em São José dos Campos, 2001. *Rev Paul Pediatría*. 2006;24:47-51.
 - 10- Pacheco SS, Souza AL, Vidal AS, Guerra GV, Batista-Filho M, Baptista EV et al. Neural tube defects prevalence in newborn infants in the women care Center of the Instituto materno Infantil Prof. Fernando Figueira. *Rev Bras Saúde Matern Infant*. 2006; 6(Suppl 1):535-42.
 - 11- Williamson EM. Incidence and familial aggregation of major congenital malformations of the central nervous system. *J Med Genet*. 1965; 2:161-72.
 - 12- Wald N. Folic acid and the prevention of neural tube defects. *Ann NY Acad Sci*. 1993;678:112-29.
 - 13- McLeod L, Ray JG. Prevention and detection of diabetic embryopathy. *Community Genet*. 2002;5:33-9.
 - 14- Koren G, Kennedy D. Safe use of valproic acid during pregnancy. *Can Fam Physician*. 1999;45:1451-3.
 - 15- Blencowe H, Cousens S, Modell B, Lawn Joy. Folic acid to reduce neonatal mortality from neural tube disorders. *Int J Epidemiol*. 2010; 39(Suppl 1):i110-21.
 - 16- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Spina bifida and anencephaly before and after folic acid mandate- United States, 1995-1996 and 1999-2000. *Morb Mortal Wkly*. 2004;53(17):362-365.
 - 17- Malakounides G, Lee F, Murphy F, Boddy SA. Single centre experience: long term outcomes in spina bifida patients. *J Pediatr Urol*. 2013;9(5):585-9.

-
- 18- Just M, Schwarz M, Ludwig B, Ermet J, Thelen M. Cerebral and spina MR- findings in patients with post repair myelomeningocele. *Pediatr Radiol.* 1990;20:262-6.
 - 19- Bruner JP, Tilipan N, Dabrowiak ME, Luker KS, Walters K, Burns P et al. Upper level of the spina bifida defect: how good are we? *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2004; 24:612-7.
 - 20- Chaoui R, Nicolaides KH. Detecting open spina bífida at the 11-13-week scan by assessing intracranial translucency and the posterior brain region: mid-sagittal or axial plane? *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2011; 38:609-12.
 - 21- Twickler DM, Magee KP, Caire J, Zaretsky M, Fleckenstein JL, Ramus RM. Second-opinion magnetic resonance imaging for suspected fetal central nervous system abnormalities. *Am J Obstet Gynecol.* 2003; 188(2):492-6.
 - 22- Chao TT, Dashe JS, Adams RC, Keefover-Hicks A, McIntire DD, Twickler DM. Fetal spine findings on MRI and associated outcomes in children with open neural tube defects. *AJR Am J Roentgenol.* 2011; 197(5):956-61.
 - 23- Meuli M, Meuli-Simmen C, Hutchins GM, Seller MJ, Harrison MR, Adzick NS. The spinal cord lesion in human fetuses with myelomeningocele: implications for fetal surgery. *J Pediatr Surg.* 1997;32(3):448-52.
 - 24- Adzick NS, Thom EA, Spong CY, Brock III JW, Burrows PK, Johnson MP et al. A randomized trial of prenatal versus postnatal repair of myelomeningocele. *N Engl J Med.* 2011;364:993-1004.

-
- 25- Lew SM, Kothbauer KF. Tethered cord syndrome: an updated review. *Pediatr Neurosurg*. 2007;43:236-48.
 - 26- Hudgins RJ, Gilreath CL. Tethered spinal cord following repair of myelomeningocele. *Neurosurg Focus*. 2004;16(2):E7.
 - 27- Kohl T, Tchatcheva K, Merz W, Wartenberg HC, Heep A, Muller A, et al. Percutaneous fetoscopic patch closure of human spina bifida aperta: advances in fetal surgical techniques may obviate the need for early postnatal neurosurgical intervention. *Surg Endosc*. 2009;23(4):890-5.
 - 28- Pedreira DA, Oliveira RC, Valente PR, Abou-Jamra RC, Araújo A, Saldiva PH. Gasless fetoscopy: a new approach to endoscopic closure of a lumbar skin defect in fetal sheep. *Fetal Diagn Ther*. 2008;23(4):293-8.
 - 29- Pedreira DA, Valente PR, Abou-Jamra RC, Pelarigo CL, Silva LM, Goldenberg S. Successful fetal surgery for the repair of a myelomeningocele-like defect created in the fetal rabbit. *Fetal Diagn Ther*. 2003;18(3):201-6.
 - 30- Abou-Jamra RC, Valente PR, Araújo A, Sanchez e Oliveira RC, Saldiva PH, Pedreira DAL. Simplified correction of meningomyelocele-like defect in the ovine fetus. *Acta Cir Bras*. 2009; 24(3):239-244.
 - 31- Eggink AJ, Roelofs LA, Feitz W, Wijnen RM, Mullaart RA, Grotenhuis JA, et al. In utero repair of an experimental neural tube defect in a chronic sheep model using biomatrices. *Fetal Diagn Ther*. 2005; 20 (5): 335-40.

-
- 32- Von Koch CS, Compagnone N, Hirose S, Yoder S, Harrisson MR, Farmer DL. Myelomeningocele: characterization of a surgically induced sheep model and its central nervous system similarities and differences to the human disease. *Am J Obstet Gynecol*. 2005; 193(4):1456-62.
- 33- Kohl T, Hartlage MG, Kiehitz D, Westphal M, Buller T, Achenbach S, et al. Percutaneous fetoscopic patch coverage of experimental lumbosacral full-thickness skin lesions in sheep. *Surg Endosc*. 2003; 17(8):1218-23.
- 34- Pedreira DAL, Sanchez e Oliveira RC, Valente PR, Abou-Jamra RC, Araújo A, Saldiva PH. Validation of the ovine fetus as an experimental model for the human myelomeningocele defect. *Acta Cirúrgica Brasileira*. 2007;22(3):168-73.
- 35- Rebello C, Almeida DA, Lima Jr EM, Dornelas MP. Biofill: um novo substituto de pele: nossa experiência. *Rev Bras Cir*. 1987;77(6):407-14.
- 36- Peixoto R, Santos DLN. Biofill: Uso e avaliação clínica de uma película celulósica em lesões cutâneas. *Rev Bras Cir*. 1988;78(2):141-5.
- 37- Mello LR, Feltrin LT, Fontes Neto PT, Ferraz FA. Duraplasty with biosynthetic cellulose: an experimental study. *J Neurosurg*. 1997; 86(1):143-50.
- 38- Sanchez e Oliveira RC, Valente PR, Abou-Jamra RC, Araújo A, Saldiva PH, Pedreira DA. Biosynthetic cellulose induces the formation of a neoduramater following pre-natal correction of meningomyelocele in fetal sheep. *Acta Cir Bras*. 2007;22(3):174-81.

-
- 39- Fontecha CG, Peiro JL, Sevilla JJ, Aguirre M, Soldado F, Fresno L et al. Fetoscopic coverage of experimental myelomeningocele in sheep using a patch with surgical sealant. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2011;156(2):171-176.
- 40- Broughton G 2nd, Janis JE, Attinger CE. Wound healing: a overview. *Plast Reconstr Surg.* 2006;117(7Suppl):1e-S-32e-S.
- 41- Eming SA, Krieg T, Davidson JM. Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms. *J Invest Dermatol.* 2007;127(3): 514-25.
- 42- Chettib S, Ferguson MWJ. Wound repair:an overview. In: *Inflammation: Basics principles and clinical correlates*. Second Edition. New York: Plenum Press; 1999, p.95-141.
- 43- Beanes SR, Dang C, Soo C, Ting K. Skin repair and scar formation: the central role of TGF-beta. *Expert Rev Mol Med.* 2003;5(8):1-22. Review.
- 44- Li J, Chen J, Kirsner R. Pathophysiology of acute wound healing. *Clin Dermatol.* 2007;25(1):9-18.
- 45- Baranoski S, Ayello EA. *Wound care essentials*. Pennsylvania: Lippincott Williams & Wilkins; 2004.
- 46- Karukonda SR, Flynn TC, Boh EE, McBurney EI, Russo GG, Millikan LE. The effects of drugs on wound healing: part 1. *Int J Dermatol.* 2000;39(4):250-7. Review.

-
- 47- McCallion RL, Ferguson MWJ. Fetal wound healing and the development of anti-scarring therapies for adult wound healing. In: Clark RAF. *The Molecular and Cellular Biology of Wound Repair*. 2nd ed. New York: Plenum Press; 1995. p. 561-600.
- 48- Junqueira LC, Carneiro J. Tecido conjuntivo. In: Junqueira LC, Carneiro J. *Histologia básica*. 11ª Edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008. p.91-123.
- 49- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. The extracellular matrix of animals. In: *Molecular biology of the cell*. 5th ed. New York: Garland Science; 2010.
- 50- Khoshnoodi J, Pedchenko V, Hudson BG. Mammalian collagen IV. *Microsc Res Tech*. 2008; 71(5):357-70.
- 51- Parry DA, Graig AS. Collagen fibrils during development and maturation and their contribution to the mechanical attributes of connective tissue. In: Nimni ME. *Collagen*. Boca Raton: CRC Press; 1988. v.2, p1-23.
- 52- Junqueira LC, Bignolas G, Brentani RR. Picrossirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem J*. 1979 Jul;11(4):447-55.
- 53- Junqueira LC, Montes GS, Toledo OM, Bexiga SR, Gordilho MA, Brentani RR. Evidence for collagen molecular orientation in basement membranes. *Histochem J*. 1983 Aug;15(8):785-94.
- 54- Pickering JG, Boughner DR. Quantitative assessment of the age of fibrotic lesions using polarized light microscopy and digital image analysis. *Am J Pathol*. 1991 May;138(5):1225-31.

-
- 55- Clore JN, Cohen IK, Diegelmann RF. Quantitation of collagen types I and III during wound healing in rat skin. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1979 Jul;161(3):337-40.
- 56- Bruner JP, Tulipan N, Paschall RL, Boehm FH, Walsh WF, Silva SR et al. Fetal surgery for myelomeningocele and the incidence of shunt-dependent hydrocephalus. *J Am Med Assoc*. 1999;282:1819-25.
- 57- Meuli M, Meuli-Simmen C, Yingling CD, Hutchins GM, Timmel GB, Harrison MR et al. In utero repair of experimental myelomeningocele saves neurological function at birth. *J Pediatr Surg*. 1996;31(3):397-402.
- 58- Tulipan N, Sutton LN, Bruner JP, Cohen BM, Johnson M, Adzick NS. The effect of intrauterine myelomeningocele repair on the incidence of shunt-dependent hydrocephalus. *Pediatr Neurosurg*. 2003;38:27-33.
- 59- Bouchard S, Davey MG, Rintoul NE, Walsh DS, Rorke LB, Adzick NS. Correction of hindbrain herniation and anatomy of vermis after in utero repair of myelomeningocele in sheep. *J Pediatr Surg*. 2003;38(3):451-58.
- 60- Copeland ML, Bruner JP, Richards WO, Sundell HW, Tulipan NB. A model for in utero endoscopic treatment of myelomeningocele. *Neurosurgery*. 1993;33(3):542-4.
- 61- George TM, Fagan LH. Adult tethered cord syndrome in patients with postrepair myelomeningocele: an evidence-based outcome study. *J Neurosurg*. 2005;102(2 Suppl):150-6.
- 62- Dias MS. Neurosurgical causes of scoliosis in patients with myelomeningocele: an evidence-based literature review. *J Neurosurg*. 2005;103(1 Suppl):24-35.

-
- 63- Danzer E, Adzick NS, Rintoul NE, Zarnow DM, Schwartz ES, Melchionni J, et al. Intradural inclusion cysts following in utero closure of myelomeningocele: clinical implications and follow-up findings. *J Neurosurg Pediatr.* 2008;2(6):406-13.
- 64- Verbeek RJ, Heep A, Maurits NM, Cremer R, Hoving EW, Brouwer OF, et al. Fetal endoscopic myelomeningocele closure preserves segmental neurological function. *Dev Med Child Neurol.* 2012;54(1):15-22.
- 65- Pedreira DA, Quintero RA, Acácio GL, Caldini ET, Saldiva PH. Neoskin development in the fetus with the use of a three-layer graft: an animal model for in utero closure of large skin defects. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2011;24(10):1243-8.
- 66- Haines DE. On the question of a subdural space. *Anat Rec.* 1991;230(1):3-21.
- 67- Palm SJ, Kirsch WM, Zhu YH, Peckham N, Kihara S, Anton R, et al. Dural closure with nonpenetrating clips prevents meningoneural adhesions: an experimental study in dogs. *Neurosurgery.* 1999;45(4):875-81.
- 68- Leme RJ, Chadi G. Distant microglial and astroglial activation secondary to experimental spinal cord lesion. *Arq Neuropsiquiatr.* 2001;59(3-A):483-92.