

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
UNIDADE ACADÊMICA DE MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E SAÚDE
ANIMAL

EMÍLIO LEITE DE SOUSA JÚNIOR

Avaliação clínica e histopatológica da cicatrização do nervo ciático de coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) submetidos à neurotmesa e neurorrafia periférica com duas técnicas, associado ao uso de implantes de quitosana.

PATOS/PB

2019

EMÍLIO LEITE DE SOUSA JÚNIOR

Avaliação clínica e histopatológica da cicatrização do nervo ciático de coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) submetidos à neurotme e neurorrafia periférica com duas técnicas, associado ao uso de implantes de quitosana.

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Saúde Animal, da Universidade Federal de Campina Grande, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência e Saúde Animal.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Jorge Cavalcanti de Sá

PATOS/PB

2019

S725a

Sousa Júnior, Emílio Leite de

Avaliação clínica e histopatológica da cicatrização do nervo ciático de coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) submetidos à neurotome e neurorrafia periférica com duas técnicas, associado ao uso de implantes de quitosana / Emílio Leite de Sousa Junior. – Patos, 2019.

41f.: il.; color.

Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Saúde e Tecnologia Rural, 2019.

“Orientação: Prof. Dr. Marcelo Jorge Cavalcanti de Sá.”

Referências.

1. Biomateriais. 2. Neurocirurgia. 3. Cicatrização. 4. Nervo ciático.
- I. Título.

CDU 616:636.92

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
UNIDADE ACADÊMICA DE MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E SAÚDE ANIMAL

EMÍLIO LEITE DE SOUSA JÚNIOR

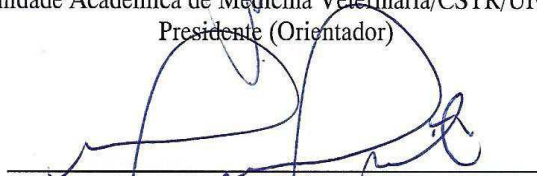
Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Saúde Animal, da Universidade Federal de Campina Grande, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência e Saúde Animal.

APROVADO EM 12/08/19.

EXAMINADORES:



Prof. Dr. Marcelo Jorge Cavalcanti de Sá
Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária/CSTR/UFMG
Presidente (Orientador)



Prof. Dr. Marcelo Weinstein Teixeira
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal
Universidade Federal do Pernambuco
(Examinador)



Prof. Dr. Gabriel Goetten de Lima
Pós doutorado do Programa Engenharia e Ciência dos Materiais
Universidade Federal do Paraná
(Examinador I)

Dedicatória

A Deus e aos meus pais que acreditaram, vivenciaram e me incentivaram na minha trajetória. Sem vocês nada disso seria possível!

AGRADECIMENTOS

Agradecimento é um gesto simples de se expressar, porém muito grandioso, podendo ser por meio de palavras, ações, gestos ou discursos. Não existe a possibilidade de falar de agradecimento sem mencionar e entender o amor de Deus! Sou muito grato a Ele por cada oportunidade que tenho tido ao longo de minha vida, principalmente por me encontrar em uma profissão tão linda e humana, ao qual me orgulho e me traz felicidade e paz! Entendo que o sucesso seja um ponto alto ao qual podemos chegar, fazendo uma analogia breve a uma escada, em que cada degrau é momento das nossas vidas aos quais precisamos passar por situações diversas (dificuldades, tristezas, alegrias, reflexões...) e subir de forma gradativa esses momentos para que seja possível compreender cada etapa.

O entendimento sobre onde e como tenho chegado nos meus objetivos, é bem amplo e com uma lista enorme de nomes que me ajudaram e me ajudam diariamente; eu costumo falar que sou movido por fé, esperança, amor e pessoas; resumido nas ações do dia a dia, que inicia com aquela que me recebem com um bom dia, que me servem um café com um sorriso no rosto para eu começar meu dia bem, fazem parte desta trajetória! Sou extremamente grato aqueles que me alegram com palavras motivadoras, que arrancam sorrisos e me corrigem quando necessário. Algumas pessoas são marcantes em minha vida, como minha mãe Mônica e meu pai Emílio aos quais foram e são minha base, nunca me falaram que eu não conseguiria, pelo contrário sempre me apoiaram e me incentivaram em TUDO, sendo meu agradecimento por eles eterno e diário! Agradeço também aos meus irmãos, e parentes por todo apoio! Ao meu orientador Prof. Marcelo Sá, aos graduandos Geovanny, Emanuel, Priscila, Ana Luiza por todo apoio; aos demais professores da instituição e do programa de pós graduação; e os amigos da residência, em especial as anestesistas Edla e Francicarla; e alunos da pós graduação por todo apoio, em especial a Francisco Alípio e Taynara! Assim como meus amigos pessoais de trabalho, a minha chefe Sara, e em especial a Júnior por toda paciência e incentivo. Deixo também meu agradecimento e homenagem a Erika Teixeira ao qual participou algumas vezes no projeto, ao qual hoje não se encontra mais no meio de nós (in memoriam). Gratidão é um gesto diário, ao qual não tem fim e não ficará limitado a uma descrição em um documento, diante mão, meu muito obrigado a vocês que fizeram ou fazer parte da minha vida e desse projeto!

...Viver, Amar e Servir...

SUMÁRIO

	Pag.
RESUMO.....	8
ABSTRACT.....	9
INTRODUÇÃO GERAL	13
REFERÊNCIAS.....	14
<u>CAPÍTULO I</u> REPARO DE NERVO PERIFERICO EM COELHOS, USANDO ENXERTO AUTÓLOGO DE NERVO CIÁTICO: Estudo clínico e histopatológico.....	15
RESUMO.....	16
ABSTRACT.....	17
INTRODUÇÃO.....	18
MATERIAL E MÉTODOS	19
RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	23
CONCLUSÃO.....	26
REFERÊNCIAS.....	27
<u>CAPÍTULO II</u> AVALIAÇÃO DE FILME A BASE DE QUITOSANA, USADO COMO CONDUTOR NA REPARAÇÃO DE NERVO CIÁTICO EM COELHOS: Estudo clínico e histopatológico.....	29
ABSTRACT.....	30
RESUMO.....	31
INTRODUÇÃO.....	32
MATERIAL E MÉTODOS.....	33
RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	37
CONCLUSÃO.....	41
REFERÊNCIAS.....	41

RESUMO

Os processos traumáticos são de grande importância na medicina veterinária, sendo as maiores casuísticas de atendimentos na clínica cirúrgica de pequenos animais, e dentro desses traumas, o envolvimento de lesões ao sistema nervoso é de grande preocupação devido a sua integridade conectiva com todos os outros sistemas. As lesões aos nervos periféricos podem trazer danos irreparáveis e comprometimento grave de funções dos membros quando não corrigidas adequadamente, principalmente devido a sua limitada capacidade de reparação. A reparação nervosa é um desafio na medicina, devido a isso algumas áreas da biologia e engenharia de materiais vem trabalhando em conjunto, para desenvolver produtos que possam promover a reparação de tecidos de difícil cicatrização. O primeiro capítulo do presente trabalho teve como objetivo avaliar técnicas cirúrgicas utilizadas na reparação de nervo periférico, e no segundo capítulo foi comparada a associação de implante a base de quitosana com a técnica com melhor resultado. Foram estudados dez coelhos (*Oryctolagus cuniculus* da família Leporidae, linhagem Nova Zelândia), hípidos, com idade aproximada de doze meses e peso entre 2,0 kg e 3,5 kg, submetidos à secção total do nervo ciático. Foram realizadas avaliações clínico-neurológicas e histopatológicas para avaliar o retorno funcional do membro e a progressão da cicatrização nervosa.

Palavras-chave: Biomateriais; neurocirurgia; cicatrização e nervo ciático.

ABSTRACT

Traumatic processes retain great importance in veterinary medicine, with the largest number of cases being attended at the surgical clinic of small animals; and within these processes the involvement of injuries to the nervous system is a great concern due to its connective integrity with all other systems. Peripheral nerve damage can cause irreparable damage and severe impairment of limb function when not properly corrected, mainly because of its limited repair capacity. Nerve repair is a challenge in medicine, and some areas of biology and engineering have been working together, such as materials engineering, to develop products that can promote difficult tissue repair. The first chapter of the present study aimed to evaluate surgical techniques used in the repair the peripheral nerve, in the second chapter the association of chitosan based implant with the best result technique was compared. Ten rabbits (*Oryctolagus cuniculus* of the Leporidae family, New Zealand line), healthy, aged approximately twelve months and weighing between 2.0 kg and 3.5 kg, submitted to the total sciatic nerve section were studied. Clinical-neurological and histopathological evaluations were performed to evaluate functional limb return and progression of nerve healing.

Keywords: Biomaterials; neurosurgery; cicatrization and sciatic nerve.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo I:	Pag.
Figura 1- Neurorrafia, sem aproximação das bordas, preservando uma distância de 5mm.....	20
Figura 2- Neurorrafia com inversão das bordas nervosas em 180°....	20
Figura 3- Incisão de n. ciático (neurotmeses).....	21
Figura 4- Neurorrafia de n. ciático (G1).....	21
Figura 5- Neurorrafia de nervo ciático com inversão de bordas (G2)....	22
Figura 6- Fotomicrografia obtida de corte histológico de segmento distal de nervo ciático de coelho; seta demonstrando células de Schwann, após 60 dias da neurotmesa (G1). HE. Objetiva 40x.....	25
Figura 7- Fotomicrografia obtida de corte histológico de segmento distal de nervo ciático de coelho; seta demonstrando degeneração Walleriana em lâmina de n. ciático, após 60 dias (G1). HE. Objetiva 40x.....	26
Figura 8- Fotomicrografia obtida de corte histológico de segmento distal de nervo ciático de coelho; seta demonstrando degeneração Walleriana (desmielinização) em lâmina de n. ciático, após 60 dias (G1). HE. Objetiva 40x.	26
Figura 9- Fotomicrografia obtida de corte histológico de segmento distal de nervo ciático de coelho; seta demonstrando degeneração da bainha de mielina em lâmina de n. ciático, após 60 dias (G2). HE. Objetiva 40x.....	26

LISTA DE FIGURAS

Capítulo II:	Pag.
Figura 1- Preparo do biomaterial com introdução de solução de ácido acético 1%.....	33
Figura 2- Preparo do biomaterial com introdução de solução de NaOH 1.25M..	33
Figura 3- Filme a base de quitosana produzidos no Material Research Institute do Athlone Institute of Technology – AIT, Irlanda.....	34
Figura 4- Neurrorrafia com técnica de tubulização com biomaterial de quitosana.	35
Figura 5- Introdução do biomaterial após neurotmese de ciático.....	36
Figura 6- Valores médios dos escores da avaliação clínica de membros de coelhos submetidos a correção de secção completa de nervo ciático com técnica de sutura epineural isolada(G1).....	37
Figura 7- Valores médios dos escores da avaliação clínica de membros de coelhos submetidos a correção de secção completa de nervo ciático com técnica de sutura associada a implante a base de quitosana (G2).....	38
Figura 8- Valores médios dos escores da avaliação histopatológica de nervos submetidos a neurotmese reparados com técnica de sutura epineural isolados (G1) ou associados a implante de quitosana (G2) em coelhos. Médias seguidas de letras diferentes diferiram estatisticamente no teste de Kruskall-Wallis com nível de significância de 5% quando comparados os grupos.....	39
Figura 9- Fotomicrografia obtida de corte histológico de segmento distal de nervo ciático de coelho; seta demonstrando macrófago fagocitando a bainha de mielina após 60 dias da neurotmese (G2). HE. Objetiva 40x.....	40
Figura 10- Fotomicrografia obtida de corte histológico de segmento distal de nervo ciático de coelho; seta demonstrando re mielinação do nervo ciático, com ação das células de Schwann HE (G1). Objetiva 40x.....	40

LISTA DE ABREVIACOES E SIMBOLOS

°	Grau
°C	Graus Celsius
%	Porcentagem
µm	Micrometro
mm	Milímetro
kg	Quilo
ml	Mililitro
mg/kg	Miligrama por quilo
G1	Grupo 1
G2	Grupo 2
GC	Grupo Controle
PRP	Plasma Rico em Plaqueta
CEAU	Comitê de Ética em Pesquisa no Uso de Animais
DMV	Departamento de Medicina Veterinária
UFMG	Universidade Federal de Campina Grande
CSTR	Centro de Saúde e Tecnologia Rural
AIT	Athlone Institute of Technology

INTRODUÇÃO GERAL

Os nervos são cordões cilíndricos, compostos por feixes de fibras nervosas, ou axônios, envolvido por tecido conjuntivo, e estas apresentam diferenças quanto ao diâmetro e espessura da bainha de mielina. As fibras nervosas são encapsuladas por três tipos de túnicas de tecido conjuntivo (endoneuro, perineuro e epineuro) que também armam a estrutura para vasos sanguíneos e algumas células, como as células de Schwann, responsáveis pela produção de mielina (FARONI et al., 2015).

A complexa constituição do tecido nervoso limita a sua capacidade em se regenerar, mesmo quando nos referimos a estruturas mais simples, como as lesões em nervos periféricos, ao qual apresentam melhores resultados reparativos, ainda são um desafio para a medicina (FOWLER et al., 2015).

Trauma, tumores e lesões iatrogênicas são as principais causas de lesões nervosas. Na medicina veterinária as lesões geradas aos sistema nervoso central, apresentam alta taxa de morbidade e mortalidade, quando o paciente não evolui ao óbito estão susceptíveis a sequelas graves, muitas delas comprometendo sua qualidade de vida (GAUDIN et al., 2016).

As lesões de nervos periféricos são comuns em cães e gatos, principalmente em decorrência de acidentes automobilísticos, sendo comum o envolvimento do nervo ciático, ao qual cumpre importantes funções. As lesões a este nervo podem ser em decorrência de fraturas e luxações pélvicas (articulações sacroilíaca ou fraturas de asa do sacro, face caudal do acetábulo, e ísquio, ou mesmo lesões tardias resultadas do processo de cicatrização óssea, pelo tecido conjuntivo em proliferação) (DAYER et al., 2017).

Atualmente a opção de escolha para reparo de lesões em nervos periféricos é o reparo através de microcirurgia para sutura dos segmentos, entretanto, na presença de distância significativa entre os segmentos, podem ser indicados enxertos autólogos ou uso de implantes em tubos a base de silicone ou polímeros biodegradáveis, os quais guiam a cicatrização dos segmentos (GORDON et al., 2011).

Diante da dificuldade da reparação do tecido nervoso, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o uso de técnicas cirúrgicas associadas ou não a implante a base de quitosana para reparação de nervo ciático em coelhos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- DAYER, T.; ROHRBACH, H.; FORTERRE, S.; STOFFEL, M.; FORTERRE, F. Investigation of sciatic nerve surgical anatomy in dogs and cats: A comparative cadaveric study. *International Journal of Veterinary Science*. v. 6, n. 3, p. 131-135, 2017.
- FARONI, A.; MOBASSERI, S.A.; KINGHAM, P.J.; REID, A.J. Peripheral nerve regeneration: Experimental strategies and future perspectives. *Advanced Drug Delivery Reviews*. v. 82, p. 160-167, 2015.
- FOWLER J.R.; LAVASANI, M.; HUARD, J.; GOITZ, R.J. Biologic strategies to improve nerve regeneration after peripheral nerve repair. *J. Reconstr. Microsurg*. v. 31, p. 243-248, 2015.
- GAUDIN, R.; KNIPFER, C.; HENNINGSSEN, A.; SMEETS, R.; HEILAND, M.; HADLOCK, T. Approaches to peripheral nerve repair: Generations of biomaterial conduits yielding to replacing autologous nerve grafts in craniomaxillofacial surgery. *BioMed Research International*. v. 2016, p. 1-18, 2016.
- GORDON, T.; TYREMAN, N.; RAJI, M.A. The basis for diminished functional recovery after delayed peripheral nerve repair. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci*. v. 31, p. 5325-5334, 2011.

CAPITULO I

**REPARO DE NERVO PERIFERICO EM COELHOS, USANDO ENXERTO
AUTÓLOGO DE NERVO CIÁTICO: Estudo clínico e histopatológico**

Artigo científico a ser submetido ao Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e
Zootecnia

REPARO DE NERVO PERIFERICO EM COELHOS, USANDO ENXERTO AUTÓLOGO DE NERVO CIÁTICO: Estudo clínico e histopatológico

Emílio Leite de Sousa Júnior¹, Francisco Alípio Sousa Segundo¹, Jefferson da Silva Ferreira¹ Marcelo Jorge Cavalcanti de Sá ¹.

¹ Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Campina Grande, 58708-110, Patos, PB, Brasil.

RESUMO

A incidência das lesões aos nervos periféricos são frequentes e graves em cães e gatos, existindo diversas causas estabelecidas, dentre elas a principal é traumática. O nervo ciático é um dos mais acometidos, devido sua extensão por ser um dos maiores nervos periféricos do corpo e sua neurolocalização. O presente estudo foi realizado em 10 coelhos (*Oryctolagus cuniculus*), hípidos, com idade aproximada de doze meses e peso entre 2,0 kg e 3,5 kg, aos quais foram divididos em dois grupos submetidos a intervenções cirúrgicas no nervo ciático G1 (neurtomese com neurorrafia simples) e G2 (neurottese com inversão do nervo em 180° com neurorrafia simples). A avaliação da função clínica e neurológica dos pacientes, ocorreram nos dias 0, 15, 30, 45 e 60 dias; em que foi observado no membro pélvico afetado dos grupos, déficits proprioceptivos, flexor, dor superficial e profunda ausente. Os dados histológicos demonstraram que a degeneração Walleriana no G1 > G2; a desmielinização G1 > G2; e a presença de células de Schwann no G1 > G2. Logo, a técnica cirúrgica de padrão simples, em que as bordas neurais ficam na mesma direção (G1) possui melhor grau regenerativo, comparado a técnica de inversão das bordas (G2).

Palavras-chaves: nervo-ciático; regeneração; auto-enxerto.

ABSTRACT

The incidence of lesions to the peripheral nerves are frequent and serious in dogs and cats, existing several established causes, among them the main being traumatic. The sciatic nerve is one of the most affected, due to its extension being one of the major peripheral nerves of the body and its neurolocalization. The present study was carried out on 10 healthy rabbits (*Oryctolagus cuniculus*), aged approximately 12 months and weighing between 2.0 kg and 3.5 kg, which were divided into two groups submitted to surgical interventions in the sciatic nerve G1 (neurotomy with simple neurorrhaphy) and G2 (neurotmesis with 180 ° nerve inversion with simple neurorrhaphy). The evaluation of the clinical and neurological function of the patients occurred on days 0, 15, 30, 45 and 60 days; where it was observed in the affected pelvic limb of the groups, proprioceptive deficits, flexor, superficial pain and absent deep pain. Histological data demonstrated that Wallerian degeneration in G1> G2; the demyelination G1> G2; and the presence of Schwann cells in G1> G2. Thus, the simple pattern surgical technique, in which the neural borders are in the same direction (G1), has a better regenerative degree compared to the edge inversion technique (G2).

Keywords: nerve-sciatic; regeneration; autografting

INTRODUÇÃO

Os nervos periféricos podem sofrer injúrias por lesões diretas ou lesões medulares que afetem as suas origens. Os processos traumáticos, neoplásicos e iatrogênicos são as principais causas de lesões dessas estruturas, sendo causa de grande morbidade, e mortalidade em animais (SHAPIRA et al., 2016).

Em humanos lesões nervosas causam custos significativos na sociedade, seja em caráter individual ou nacional, sendo estimada uma casuística de 2,8% de todos os pacientes que sofrem traumas (ASPLUND et al., 2009).

A capacidade regenerativa do nervo está relacionada diretamente a continuidade do endoneuro, perineuro e epineuro, a lesão mais grave presente nos nervos é denominada de neurotmeze, processo ao qual ocorre a secção completa de todas as estruturas nervosas, produzindo um intervalo entre as extremidades nervosas seccionadas (HOUSCHYAR et al., 2016).

Essa lesão gera degeneração walleriana, ao qual conduz à remoção e reciclagem axonal e do material mielínico, ocorrendo devido ao mau alinhamento das extremidades nervosas a possibilidade de recuperação espontânea é improvável, logo há necessidade de intervenção cirúrgica, como auxílio para que os axônios em processo de regeneração alcancem e reinervem os órgãos-alvo apropriados (DUBOVÝ et al., 2014).

A técnica cirúrgica mais empregadas no reparo de lesões de nervos periféricos é a microsutura do epineuro, devido sua constituição de tecido conjuntivo frouxo; esta técnica é indicada principalmente em casos em que não se observa defeito entre os segmentos nervosos e a sutura dos segmentos não provocará tensão, em alguns casos sendo observado retorno sensorial e motor (DUBOVÝ et al., 2014).

Quando grandes segmentos nervosos são perdidos e a coaptação das extremidades não é possível sem tensão, técnicas alternativas podem ser utilizadas, as quais incluem o uso de enxertos autólogos. Um dos principais pontos negativos dessa técnica é a necessidade de coleta do enxerto, muitas vezes sacrificando a função de um nervo não lesionado e causando a perda e sensação do sítio doador (SCHAAKXS et al., 2017).

Diante disso, o presente estudo teve como objetivo avaliar a influência de técnicas de sutura epineural e enxerto autólogo sobre o retorno funcional e reparação de nervo periférico em coelhos submetidos a secção completa das estruturas nervosas, denominado neurotmeze.

MATERIAL E MÉTODOS

Local do experimento

O experimento foi desenvolvido no biotério do Centro de Saúde e Tecnologia Rural (CSTR), no setor de Cirurgia de Pequenos Animais, e no Laboratório de Patologia Animal do Hospital Veterinário da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Paraíba, no período compreendido entre agosto de 2018 e maio de 2019. Após o encaminhamento e aprovação do projeto pela Comissão de Ética do Departamento de Medicina Veterinária (DMV) da UFCG, Protocolo CEP/CEUA nº097-2018.

Animais

No estudo foram utilizados 10 coelhos (*Oryctolagus cuniculus* da família Leporidae, linhagem Nova Zelândia), hípidos, com idade aproximada de 12 meses e peso entre 2,0 kg e 3,5 kg, aos quais foram confinados em gaiolas plásticas acarpetadas individuais, receberam ração sólida e água potável à vontade e foram mantidos em ambiente climatizado com temperatura controlada à aproximadamente 23 °C e humidade relativa por volta de 70%, o ciclo de luz-escuridão foi de 12 horas, foi realizado ainda período de adaptação ao manejo de 15 dias.

Desenho experimental

Todos os animais foram submetidos à neurotmesa de nervo ciático, em seguida foram distribuídos de forma aleatória em dois grupos experimentais com cinco animais cada, os animais pertencentes ao G1 foram submetidos a sutura epineural direta (Figura 1) e os animais do G2 foram submetidos a técnica de enxerto autólogo com inversão de nervo ciático (Figura 2). O membro contralateral, ao qual não passou por intervenção cirúrgica foi definido como grupo controle (GC).

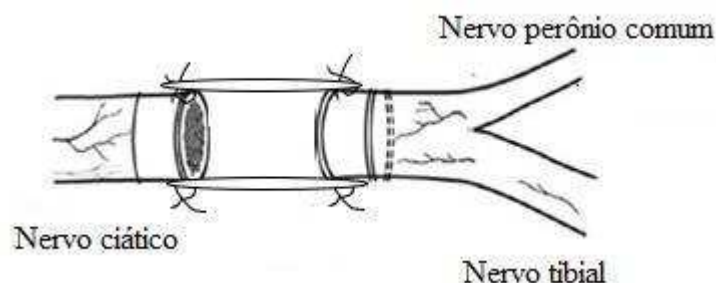


Figura 1- Neurotmesa, sem aproximação das bordas, preservando uma distância de 5mm.

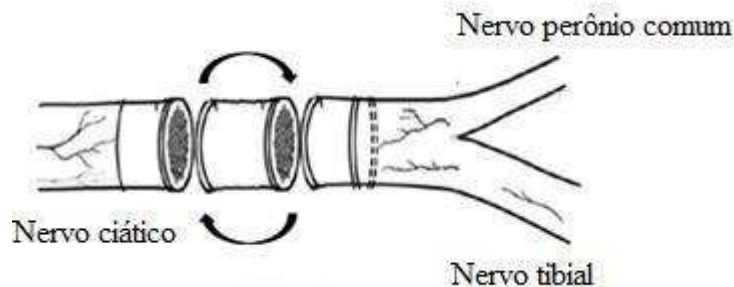


Figura 2- Neurorafia com inversão das bordas nervosas em 180°.

Protocolo anestésico

Os animais foram submetidos anestesia geral com protocolo a base de cetamina na dose de 50 mg/kg, associada a xilazina na dose de 4 mg/kg, ambos por via intramuscular, receberam ainda bloqueio local a base de lidocaína 2% com vasoconstrictor na dose de 0,3 ml/kg associada ao tramadol na dose de 1mg/kg, ambos por via epidural. O membro esquerdo foi preparado para cirurgia através de tricotomia em toda a região da coxa esquerda e lombar. Foram considerados anestesiados quando os animais apresentarem ausência de resposta plantar após estimulação digital feita por anestesista.

Procedimento cirúrgico

Após realização antissepsia com clorexidine a 0,5% e preparação com panos de campo, foi realizado intervenção cirúrgica através de incisão linear de aproximadamente 5 cm nos planos tegumentar e subcutâneo na superfície lateral da coxa esquerda, do trocanter maior ao epicôndilo lateral. O procedimento foi continuado com dissecação romba com pinça hemostática para separação dos músculos bíceps femoral e semitendinoso para exposição do nervo ciático. No momento da exposição do nervo foi realizada a sua secção completa (Figura 3), e após afastamento das bordas, foi realizado os padrões de intervenções cirúrgicas nos grupos (G1 e G2).

Grupo 1 (G1): Após a neurotome do nervo ciático as bordas neurais receberam suturas com fio de polyglactin 910 6-0 em padrão simples separado englobando epineuro de cada segmento, preservando a distância de 5mm entre as bordas (Figura 4).

Grupo 2 (G2): Foi removido um segmento de 5mm do nervo ciático, em seguida esse segmento foi invertido 180° e suas bordas foram suturadas com fio polyglactin 910 6-0 em padrão simples separado (Figura 5).

O acesso cirúrgico foi fechado através de redução do espaço morto com polyglactin 910 3-0, em padrão vai e vem; e dermorrafia em padrão simples separado com nylon 3.0. Todos os animais receberam a administração de tramadol na dose de 10 mg/kg pela via intramuscular e meloxicam na dose de 0,1 mg/kg pela via subcutânea, a cada 24 horas durante cinco dias após o procedimento cirúrgico.



Figura 3- Incisão de n. ciático (neurotmeses).

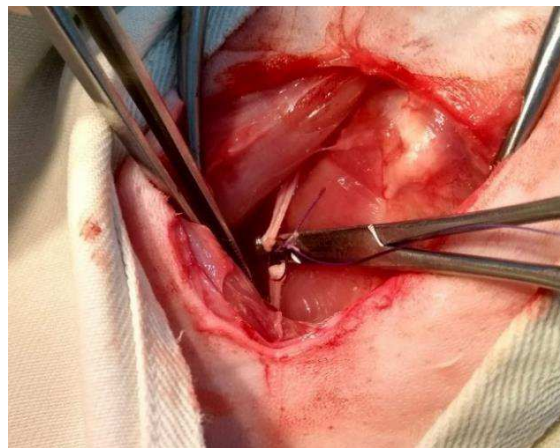


Figura 4- Neurorrafia de n. ciático (G1)



Figura 5- Neurorrafia de nervo ciático com inversão de bordas (G2).

Avaliação funcional do membro

A avaliação funcional do membro foi realizada a cada 15 dias, desde o pré-operatório até 60 dias após a cirurgia, através do exame neurológico, por meio da marcha, integridade da propriocepção, e saltitar, os quais estão envolvidos nas vias neurológicas relacionadas ao caminhar. Para cada parâmetro avaliado foi atribuído um escore de 0 - quando ausente, 1 - reduzido, 2 - normal ou 3 - aumentado.

Avaliação histopatológica

Após o período experimental de 60 dias, foi realizada a eutanásia dos animais, seguindo os protocolos éticos, com a administração de cetamina 50mg/kg e xilazina 4mg/kg por via intramuscular, seguida da administração de propofol na dose 5mg/kg por via endovenosa, por último administrado cloreto de potássio na dose de 0,5ml/kg por via endovenosa.

Após a eutanásia, foi realizada a dissecação do segmento de nervo ciático estudado, seguida de coleta de amostras para exame histopatológico. As amostras dos nervos coletadas foram submetidas a fixação com formol a 10%. As amostras então foram lavadas com água destilada e incluídas em parafina. Foram realizados cortes com 1 μ m espessura na interface nervo/implante para confecção das lâminas, coradas com hematoxilina e eosina.

A análise histopatológica levou em consideração aspectos como hiperplasia das células de Schwann, degeneração Walleriana e degeneração da bainha de mielina. Para cada parâmetro foi atribuído escore de acordo com a sua intensidade, sendo 0 - para ausente, 1 - discreta, 2 - moderada e 3 - intensa.

Análise estatística

Foi realizado teste de Kruskal-Wallis para comparação de dados não-paramétricos sobre nível de significância de 5% entre os grupos, os dados obtidos foram apresentados de forma descritiva em gráficos através de médias.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos resultados não foram observadas diferenças significativas entre os grupos ou entre os momentos. A avaliação funcional do membro foi realizada a cada 15 dias, desde o pré-operatório até 60 dias após a cirurgia, através do exame neurológico, por meio da marcha, integridade da propriocepção, e saltitar, os quais estão envolvidos nas vias neurológicas relacionadas ao caminhar. Para cada parâmetro avaliado foi atribuído um escore de 0 - quando ausente, 1 - reduzido, 2 - normal ou 3 - aumentado.

A avaliação locomotora é a continuidade do entendimento postural, integrando componentes visuais, proprioceptivos, funcionais e de equilíbrio, presentes no SNC (cérebro, cerebelo, tronco-encefálico e medula espinhal) e SNP (gânglios e nervos periféricos), aos quais proporcionam um bom funcionamento motor.

A propriocepção é a capacidade da qual o corpo reconhece o posicionamento do membro no espaço, avaliada com o paciente em estação quadrupedal, de forma que o mesmo permaneça com um posicionamento simétrico. Em seguida, deve ser rotacionado a parte distal da falange dorsal, para a superfície, sentido caudal; nestes animais avaliados a resposta foi negativa, não havendo retorno posicional em ambos os grupos.

O reflexo flexor foi avaliado posteriormente com um simples toque sobre os dígitos do paciente, em que nesta situação não foram responsivos no G1 e G2.

A nocicepção avaliada está relacionada a neurônios receptivos as sensações dolorosas, em nível medular e encefálico, principalmente em pacientes sem nenhuma atividade motora. O teste foi realizado manualmente e com pinça hemostática nos membros pélvicos lateral e medial, devido inervação sensorial do ciático e femoral respectivamente. A ausência de dor superficial (sensibilidade cutânea) e dor profunda (sensibilidade óssea), foram fatores determinantes de uma lesão nervosa acentuada.

Na avaliação neurológica dos pacientes do grupo 1 (G1) e grupo 2 (G2), nos dias 0, 15, 30, 45 e 60 dias não houve diferença clínica entre os grupos, sendo observado após o procedimento cirúrgico déficits neurológicos de todos os parâmetros avaliados no membro estudado. O membro contralateral, ao qual não passou por intervenção cirúrgica foi definido como grupo controle (GC), observando respostas normais.

A avaliação clínico-neurológica é pouco empregada na rotina experimental de animais submetidos a reparo de nervo periférico quando comparada a outros métodos de avaliação (LASSO et al., 2015). Entretanto esse é um método seguro de avaliação funcional de estruturas nervosas que é utilizado amplamente na rotina experimental e clínica há anos (DRUMMOND & MOORE, 1989).

O baixo índice de retorno funcional de membro encontrado no presente trabalho, corrobora os resultados apresentados por Yamasaki et al., (2015), o qual avaliou o uso de ressonância magnética no diagnóstico de lesões produzidas e tratadas com tubo conduíte em nervo periféricos. Os autores observaram que em até 60 dias após o procedimento 5 dos 6 animais estudados apresentaram déficits neurológicos significativos.

De acordo com Mekaj et al., (2016), o qual avaliou os efeitos do ácido hialurônico e tacrolimus na prevenção de formação de cicatriz perineural em coelhos, a secção completa do nervo ciático nessa espécie leva a dificuldade de andar e fraqueza de membro mesmo após 90 dias de correção cirúrgica, o mesmo foi observado no presente estudo, o que evidencia a dificuldade de reparação funcional do nervo.

As técnicas utilizadas em ambos os grupos são consideradas “padrão ouro”, sendo indicadas em situações que estejam presentes defeitos nervosos, como o apontado por Bhangra et al., (2016), essas técnicas possuem pontos negativos e resultados clínicos limitados, fazendo com que a necessidade pelo desenvolvimento de tecnologias ou uso de terapias celulares fossem necessárias.

Durante a avaliação macroscópica, não foi observada nenhuma complicação ou formação de cicatriz, essa última pode provocar problemas pós-operatórios significativos devido ao seu efeito deletério a cicatrização nervosa (MEKAJ et al., 2016).

No presente estudo não foi observada relação entre o aspecto macroscópico e a funcionalidade do nervo, o mesmo foi encontrado por Ikumi et al., (2017), ao estudar o efeito da administração de plasma rico em plaquetas (PRP) sobre a reparação de nervo periférico em coelhos, os autores relatam que apesar de não serem observadas diferenças significativas na avaliação macroscópica, o grupo com uso de PRP revelou reparação histológica superior quando comparada ao grupo controle.

Os dados de escore da avaliação histopatológica de ambos os grupos estão dispostos na figura 6. Apesar de não ser observada diferença significativa entre os grupos, escores discretamente maiores foram observados no G1.

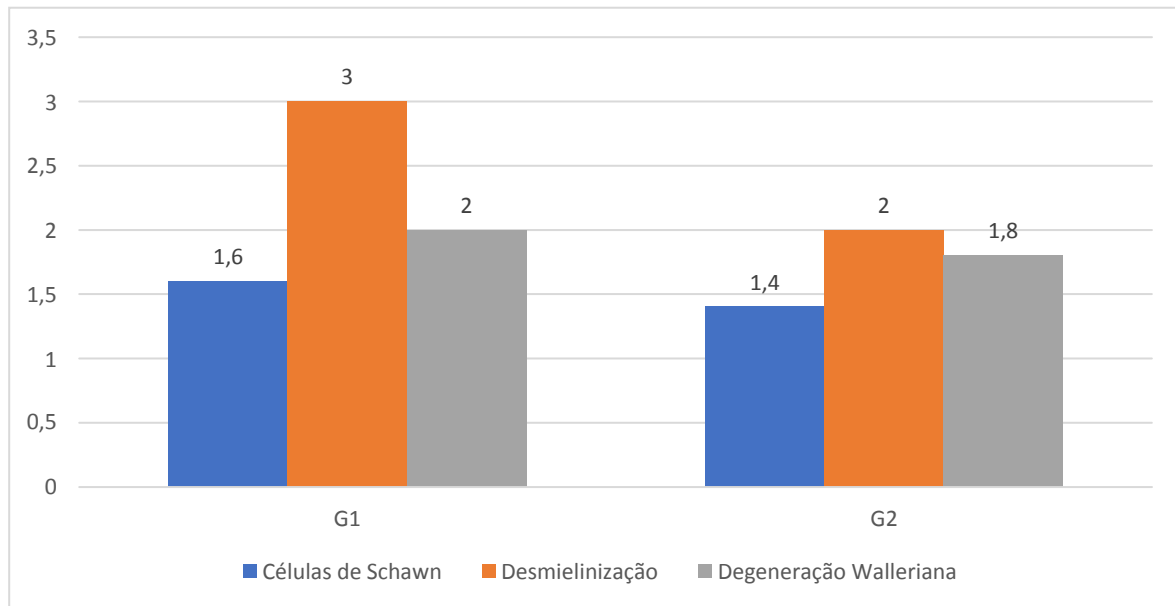


Figura 6– Valores médios dos escores da avaliação histopatológica de nervos submetidos a neurotmeses reparados com técnica de sutura epineural (G1) e enxerto autólogo (G2) em coelhos.

Os processos de desmielinização e câmara de digestão dizem respeito as primeiras etapas da reparação nervosa, sendo associados a remoção de debris celulares e manutenção de ambiente adequado para crescimento e organização de axônios. Como relatado por Yamasaki et al., (2015), altos escores de demielinização e degeneração Walleriana são observados durante a regeneração nervosa, o mesmo foi observado no presente trabalho.

A presença das células de Schwann são importantes no suporte aos axônios através da liberação de fatores de crescimento e formação da bainha de mielina (Figura 9), no presente estudo ambos os grupos apresentaram escores entre discreto a moderado, o mesmo foi encontrado por Salles et al., (2015), ao usar um composto antioxidante para reparo de nervo periférico, sugerindo um processo de reparação difícil e lento.

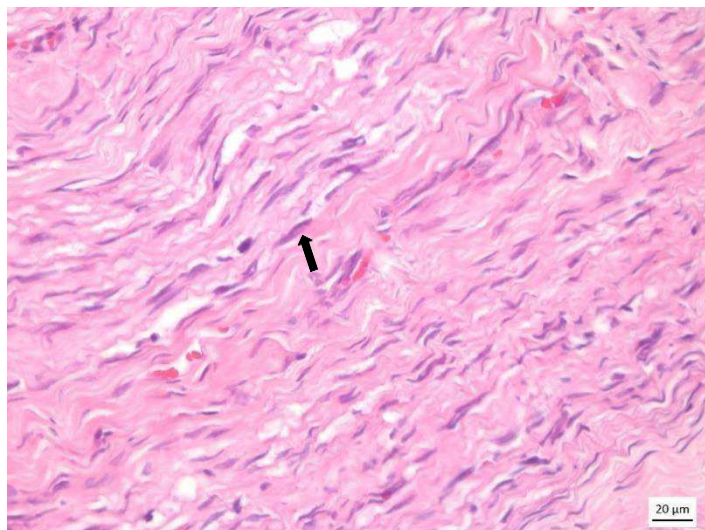


Figura 7- Fotomicrografia obtida de corte histológico de segmento distal de nervo ciático de coelho, seta indicando células de Schwann, após 60 dias da neurotomese (G1).

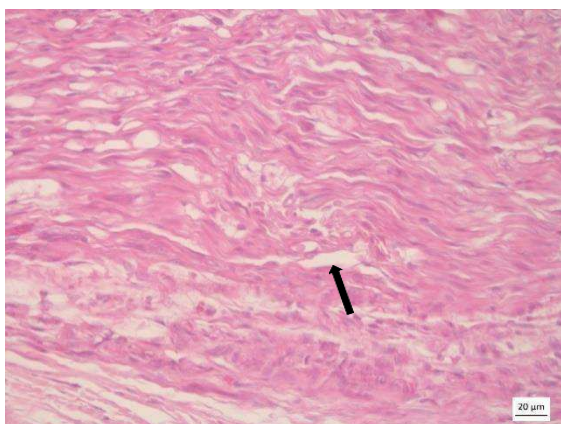


Figura 8- Fotomicrografia obtida de corte histológico de segmento distal de nervo ciático de coelho; seta demonstrando degeneração Walleriana (desmielinização) em lâmina de n. ciático, após 60 dias (G1). HE. Objetiva 40x.

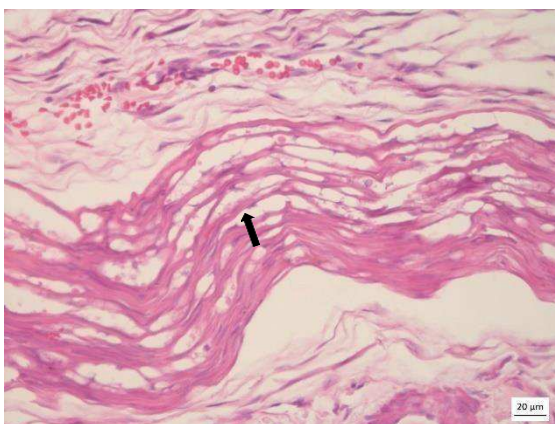


Figura 9- Fotomicrografia obtida de corte histológico de segmento distal de nervo ciático de coelho; seta demonstrando degeneração da bainha de mielina em lâmina de n. ciático, após 60 dias (G2). HE. Objetiva 40x.

CONCLUSÃO

Conclui-se que as técnicas de reparo de nervo periférico de sutura epineural e enxerto autólogo em coelhos apresentam uma baixa taxa de recuperação funcional em período de 60 dias, sugerindo-se associação de técnicas ou tecnologias que acelerem o processo de reparação.

REFERENCIAS

- ASPLUND, M.; NILSSON, M. JACOBSSON, A.; VON HOLST, H. Incidence of traumatic peripheral nerve injuries and amputations in Sweden between 1998 and 2006. *Neuroepidemiology*. v. 32, p. 217–228, 2009.
- BHANGRA, K.S.; BUSUTTIL, F.; PHILLIPS, J.B.; RAHIM, A.A. Using stem cells to grow artificial tissue for peripheral nerve repair. *Sem Cells international*. v. 2016, p. 1-18, 2016.
- DRUMMOND, J.C. & MOORE, S.S. The influence of dextrose administration on neurological outcome after temporary spinal cord ischemia in the rabbit. *Anesthesiology*. v. 70, n. 1, p. 64-70, 1989.
- DUBOVÝ, P.; KLUSÁKOVÁ, I.; SVIZENSKÁ, H. Inflammatory profiling of Schwann cells in contact with growing axons distal to nerve injury. *Bio. Med. Research International*. v. 2014, p. 1-7, 2014.
- HOUSCHYAR, K.S.; MOMENT, A.; PYLES, M.N.; CHA, J.Y.; MAAN, Z.N.; DUSCHER, D.; JEW, O.S.; SIEMERS, F.; VAN SCHOONHOVEN, J. The role of current techniques and concepts in peripheral nerve repair. *Plastic Surgery International*. p. 1-8, 2016.
- IKUMI, A.; HARA, Y.; YOSHIOKA, T.; KANAMORI, A.; YAMAZAKI, M. Effect of local administration of platelet-rich plasma (PRP) on peripheral nerve regeneration: An experimental study in the rabbit model. *Microsurgery*. p. 1-10, 2017.
- LASSO, J.M.; CANO, R.P.; CASTRO, Y.; ARENAS, L.; GARCIA, J.; FERNÁNDEZ-SANTOS, M.E. Xenotransplantation of human adipose-derived stem cells in the regeneration of rabbit peripheral nerve. *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery*. v. xx, p. 1-9, 2015.
- MEKAJ, A.Y.; MANXHUKA-KERLIU, S.; MORINA, A.A.; DUCL, S.B.; SHAHINI, L.; MEKAJ, Y.H. Effects of hyaluronic acid and tacrolimus on the prevention of perineural scar formation and on nerve regeneration after sciatic nerve repair in a rabbit model. *Eur. J. Trauma Emerg. Surg*. v. 43, n. 4, p. 497-504, 2017.
- SCHAAKXS, D.; KALBERMATTEN, D.F.; PRALONG, E.; RAFFOUL, W.; WIBERG, M.; KINGHAM, P.J. Poly-3-hydroxybutyrate strips seeded with regenerative cells are effective promoters of peripheral nerve repair. *J. Tissue Eng. Regen. Med*. v. 11, n. 3, p. 812-821, 2011.
- SHAPIRA, Y.; TOLMASOV, M.; NISSAN, M.; REIDER, E.; KOREN, A.; BIRON, T.; BITAN, Y.; LIVNAT, M.; RONCHI, G.; GEUNA, S.; ROCHKIND, S. Comparison of results between chitosan hollow tube and autologous nerve graft in reconstruction of peripheral nerve defect: An experimental study. *Microsurgery*. v. 36, n. 8, p. 664-671, 2016.

YAMASAKI, T.; FUJIWARA, H.; ODA, R.; MIKAMI, Y.; IKEDA, T.; NAGAE, M.; SHIRAI, T.; MORISAKI, S.; IKOMA, K.; TOKITA-MASUGI, M.; YAMADA, K.; KAWATA, M.; KUBO, T. *In vivo* evaluation of rabbit sciatic nerve regeneration with diffusion tensor imaging (DTI): correlations with histology and behavior. *Magnetic Resonance Imaging*. v. 33, p. 95-101, 2015.

CAPITULO II

**AVALIAÇÃO DE FILME A BASE DE QUITOSANA, USADO COMO
CONDUTOR NA REPARAÇÃO DE NERVO CIÁTICO EM COELHOS: Estudo
clínico e histopatológico**

Artigo científico a ser submetido a Pesquisa Veterinária Brasileira

**AVALIAÇÃO DE FILME A BASE DE QUITOSANA, USADO COMO
CONDUTOR NA REPARAÇÃO DE NERVO CIÁTICO EM COELHOS: Estudo
clínico e histopatológico**

Emílio Leite de Sousa Júnior¹, Francisco Alípio Sousa Segundo¹, Jefferson da Silva Ferreira¹ Marcelo Jorge Cavalcanti de Sá ¹.

¹ Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Campina Grande, 58708-110, Patos, PB, Brasil.

ABSTRACT

The repair of injured peripheral nerves is one of the great challenges and object of studies in engineering and medicine, mainly due to the great difficulty in nervous healing, having as main causes the traumatic processes. The surgical techniques applied in nerve repair involves several patterns, and due to their limitations, the need arises for the association of techniques and / or technologies, such as the use of biomaterials. The present study was carried out on 10 healthy rabbits (*Oryctolagus cuniculus*), aged approximately 12 months and weighing between 2.0 kg and 3.5 kg, which were divided into two groups submitted to surgical interventions in the sciatic nerve G1 (neurorrhaphy without biomaterial) and G2 (neurorrhaphy with biomaterial). The evaluation of the clinical and neurological function of the patients occurred on days 0, 15, 30, 45 and 60 days; where it was observed in the affected pelvic limb of the groups, absence of proprioceptive deficits, absence of flexor, superficial pain; diverging only in the onset of deep pain in G2 after 30 days of procedures. Histological data demonstrated that Wallerian degeneration in G1 > G2; the demyelination G1 > G2; and the presence of Schwann cells in G1 < G2. Therefore, the application of the chitosan-based biomaterial has a better influence on the regenerative degree of the sciatic nerve.

Keywords: Biomaterial, sciatic nerve, regeneration.

RESUMO

O reparo de nervos periféricos lesionados é um dos grandes desafios e objetos de estudos na engenharia e medicina, principalmente devido à grande dificuldade em cicatrização nervosa, tendo como principais causas os processos traumáticos. As técnicas cirúrgicas aplicadas na correção de nervo envolvem diversos padrões, e devidos suas limitações, surge a necessidade da associação de técnicas e/ou tecnologias, como o uso de biomateriais. O presente estudo foi realizado em 10 coelhos (*Oryctolagus cuniculus*), hígdos, com idade aproximada de doze meses e peso entre 2,0 kg e 3,5 kg, aos quais foram divididos em dois grupos submetidos a intervenções cirúrgicas no nervo ciático G1 (neurorrafia sem biomaterial) e G2 (neurorrafia com biomaterial). A avaliação da função clínica e neurológica dos pacientes, ocorreu nos dias 0, 15, 30, 45 e 60 dias; em que foi observado no membro pélvico afetado dos grupos, ausência de propriocepção, ausência do flexor, dor superficial; divergindo apenas no surgimento de dor profunda no G2 após 30 dias do procedimento. Os dados histológicos demonstraram que a degeneração Walleriana no G1 > G2; a desmielinização G1 > G2; e a presença de células de Schwann no G1 < G2. Logo, a aplicação do biomaterial a base de quitosana, possui melhor influência no grau regenerativo do nervo ciático.

Palavras-chaves: Biomaterial, nervo ciático, regeneração nervosa.

INTRODUÇÃO

A capacidade regenerativa de nervos periféricos está relacionada diretamente a continuidade do endoneuro, perineuro e epineuro, a lesão mais grave presente nos nervos é denominada de neurotme, processo ao qual ocorre a secção completa de todas as estruturas nervosas, produzindo um intervalo entre as extremidades nervosas seccionadas (HOUSCHYAR et al., 2016).

O tratamento muitas vezes é cirúrgico, utilizando técnicas como microsutura do epineuro ou enxerto autólogo, sendo indicadas na ausência ou presença de grandes defeitos, respectivamente, contudo estas técnicas apresentam limitações na recuperação dos pacientes, surgindo a necessidade de associação de técnicas e/ou tecnologias, como o uso de biomateriais (DUBOVÝ et al., 2014).

Os biomateriais são todos os materiais não vivos usados em dispositivos médicos ou biomédicos, que interagem com um sistema biológico. Entre os materiais sintéticos mais utilizados na medicina, temos como destaque os polímeros, como a quitosana (AZEVEDO et al., 2013a).

Os biomateriais devem apresentar propriedades que permitam sua implantação no organismo, o polímero da quitosana apresenta adequada biocompatibilidade, baixa citotoxicidade, é um material bioabsorvível e possui características mecânicas que facilitam sua manipulação em diferentes apresentações e favorecem a associação com outros componentes ou biomateriais (AZEVEDO et al., 2013b)

As características desejáveis da quitosana fazem com que esse biomaterial seja amplamente utilizado na regeneração de tecidos (SOUSA SEGUNDO et al., 2018), como sistema de liberação controlada de medicamentos (ABARRATEGI et al., 2010) e tratamento de água (HUIJUN et al., 2018), sobre diferentes formulações, incluindo gel, filmes, fibras e esponjas (CHEN et al., 2006).

Diante do apresentado, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a associação de implante a base de quitosana como tubo condutor no reparo de nervo periférico submetido a secção completa em coelhos.

MATERIAL E MÉTODOS

Aquisição/Desenvolvimento de implante a base de quitosana

Os filmes a base de quitosana foram produzidos no Material Research Institute do Athlone Institute of Technology – AIT, Irlanda. Para a fabricação dos filmes foi preparada solução com 2 gramas de quitosana dissolvidas em 100 ml de ácido acético a 1% (Figura 1), então o preparado foi submetido a agitação magnética até total dissolução da quitosana, após isso a solução foi filtrada para remoção de debris. A solução foi então depositada em placas de Petri até a total cobertura da superfície das placas e formação de filme, a secagem foi realizada em estufa a 50 °C. Após a secagem dos filmes, foi adicionada solução de NaOH (5 gramas de NaOH em 100 ml de água destilada) sobre os filmes, gerando reação entre os produtos por duas horas (Figura 2). Após isso os filmes foram lavados com água destilada e secos em superfície plana, envelopados e esterilizados com oxido de etileno (Figura 3).

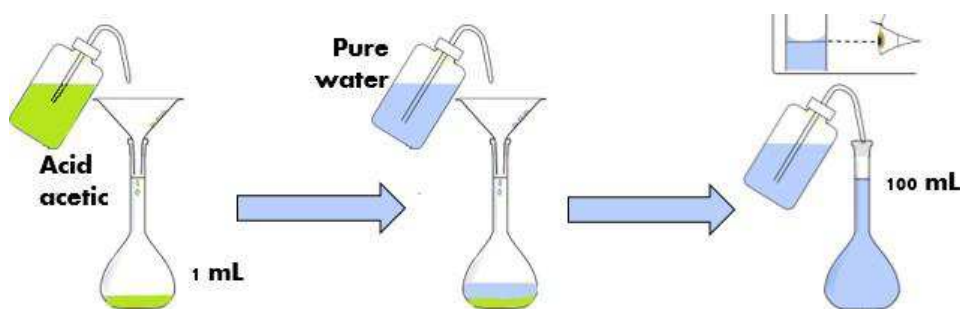


Figura 1- Preparo do biomaterial com introdução de solução de ácido acético 1%.

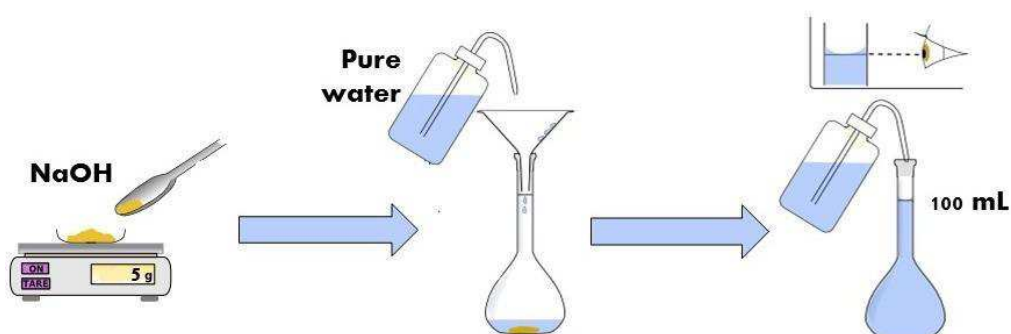


Figura 2 - Preparo do biomaterial com introdução de solução de NaOH 1.25M

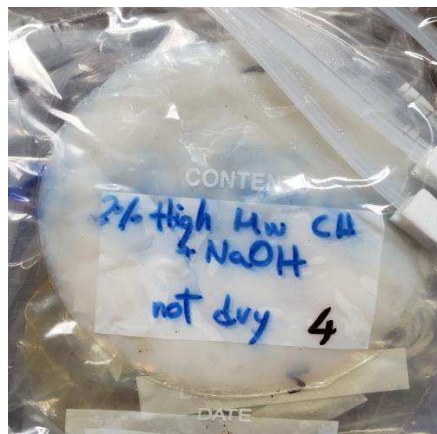


Figura 3- Filme a base de quitosana produzido no Material Research Institute do Athlone Institute of Technology – AIT, Irlanda.

Local do experimento

O experimento foi desenvolvido no biotério do Centro de Saúde e Tecnologia Rural (CSTR), no setor de Cirurgia de Pequenos Animais, e no Laboratório de Patologia Animal do Hospital Veterinário da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Paraíba, no período compreendido entre agosto de 2018 e maio de 2019. Após o encaminhamento e aprovação do projeto pela Comissão de Ética do Departamento de Medicina Veterinária (DMV) da UFCG, Protocolo CEP/CEUA n°097-2018.

Animais

No estudo foram utilizados 10 coelhos (*Oryctolagus cuniculus* da família Leporidae, linhagem Nova Zelândia), hípidos, com idade aproximada de 12 meses e peso entre 2,0 kg e 3,5 kg, aos quais foram confinados em gaiolas plásticas acarpetadas individuais, receberam ração sólida e água potável à vontade e foram mantidos em ambiente climatizado com temperatura controlada à aproximadamente 23 °C e umidade relativa por volta de 70%, o ciclo de luz-escuridão foi de 12 horas, foi realizado ainda período de adaptação ao manejo de 15 dias.

Desenho experimental

Todos os animais foram submetidos à secção completa do nervo ciático, em seguida foram distribuídos de forma aleatória em dois grupos experimentais com cinco animais cada; os pertencentes ao G1 foram submetidos a sutura epineural direta e os animais do G2 foram submetidos a mesma técnica associada ao uso de implante a base de quitosana como tubo condutor (figura 3). O membro contralateral, ao qual não passou por intervenção cirúrgica foi definido como grupo controle (GC).

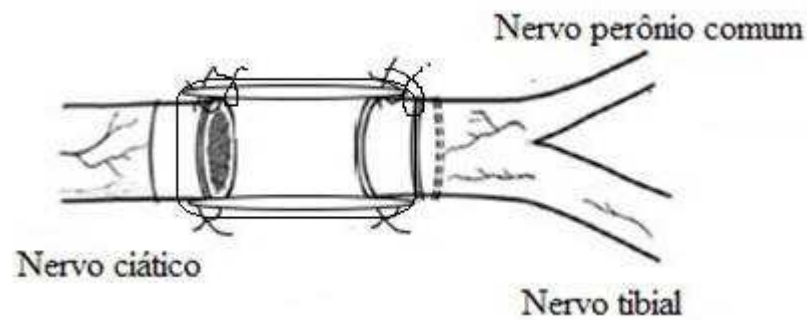


Figura 4-Neurorrafia com técnica de tubulização com biomaterial de quitosana, respeitando o espaço de 5mm entre as bordas.

Protocolo anestésico

Os animais foram submetidos anestesia geral com protocolo a base de cetamina na dose de 50 mg/kg, associada a xilazina na dose de 4 mg/kg, ambos por via intramuscular, receberam ainda bloqueio local a base de lidocaína 2% com vasoconstrictor na dose de 0,3 ml/kg associada a tramadol na dose de 1mg/kg, ambos por via epidural. O membro esquerdo foi preparado para cirurgia através de tricotomia em toda a região da coxa esquerda e lombar. Foram considerados anestesiados quando os animais apresentarem ausência de resposta plantar após estimulação digital feita por anestesista.

Procedimento cirúrgico

Após realização antisepsia com clorexidine a 0,5% e preparação com panos de campo, foi realizado intervenção cirúrgica através de incisão linear de aproximadamente 5 cm nos planos tegumentar e subcutâneo na superfície lateral da coxa esquerda, do trocanter maior ao epicôndilo lateral, para isso foi utilizado lâmina de bisturi nº 15. O procedimento foi continuado com dissecação para separação dos planos tegumentar e subcutâneo nas superfícies lateral e medial da coxa, a musculatura então dissecada de forma romba, com auxílio de pinça hemostática de 12 cm entre os músculos bíceps femoral e semitendinoso para exposição do nervo ciático.

No momento da exposição do nervo foi realizada a secção completa, e após afastamento das bordas, foi realizado os padrões de intervenções cirúrgicas nos grupos (G1 e G2). Grupo 1 (G1): Após a secção completa do nervo ciático as bordas neurais receberam suturas com fio de polyglactin 910 6-0 em padrão simples separado

englobando epineuro de cada segmento, deixando a distância de 5mm entre os bordos. Grupo 2 (G2): Após a secção completa do nervo ciático foi deixado um espaço de 5 mm entre os segmentos, e os mesmos foram fixados com implante a base de quitosana, formando um tubo condutor entre os segmentos nervosos, para a fixação foi usado fio polyglactin 910 6-0 em padrão simples separado (Figura 4).

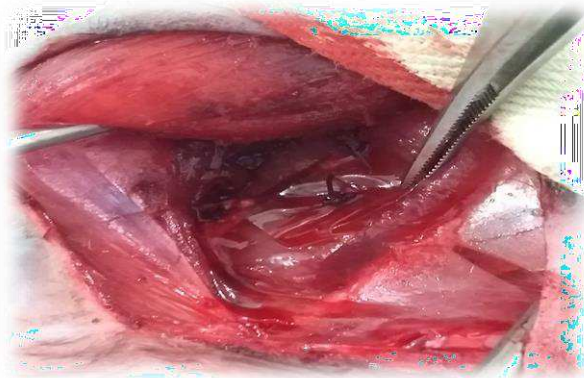


Figura 5- Introdução do biomaterial após neurotome de ciático.

O acesso cirúrgico foi fechado através de redução do espaço morto com polyglactin 910 3-0, em padrão vai e vem; e dermorrafia em padrão simples separado com nylon 3.0. Todos os animais receberam a administração de tramadol na dose de 10 mg/kg pela via intramuscular e meloxicam na dose de 0,1 mg/kg pela via subcutânea, a cada 24 horas durante cinco dias após o procedimento cirúrgico.

Avaliação funcional do membro

A avaliação funcional do membro foi realizada a cada 15 dias, desde o pré-operatório até 60 dias após a cirurgia, através do exame neurológico, por meio da marcha, e integridade da propriocepção, saltitar e posicionamento tátil, os quais estão envolvidos nas vias neurológicas relacionadas ao caminhar. Para cada parâmetro avaliado foi atribuído um escore de 0 - quando ausente, 1 - reduzido, 2 - normal ou 3 - aumentado.

Avaliação histopatológica

Após o período experimental de 60 dias, foi realizada a eutanásia dos animais, seguindo os protocolos éticos, com a administração de cetamina 50mg/kg e xilazina 4mg/kg por via intramuscular, seguida da administração de propofol na dose 5mg/kg por via endovenosa, por último administrado cloreto de potássio na dose de 0,5ml/kg por via endovenosa.

Após a eutanásia, foi realizada a dissecação do segmento de nervo ciático estudado, seguida de coleta de amostras para exame histopatológico. As amostras dos nervos coletadas foram submetidas a fixação com formol a 10%. As amostras então foram lavadas com água destilada e incluídas em parafina. Foram realizados cortes com 1 μm espessura na interface nervo/implante para confecção das lâminas. As lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina.

A análise histopatológica levou em consideração aspectos como hiperplasia das células de Schwann, degeneração Walleriana, degeneração da bainha de mielina e a interação implante/nervo. Para cada parâmetro foi atribuído escore de acordo com a sua intensidade, sendo 0 - para ausente, 1 - discreta, 2 - moderada e 3 - intensa.

Análise estatística

Foi realizado teste de Kruskal-Wallis para comparação de dados não-paramétricos sobre nível de significância de 5% entre os grupos, os dados obtidos foram apresentados de forma descritiva em gráficos através de médias.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da avaliação clínico-neurológica de ambos os grupos nos diferentes momentos estão expressos na figura 6 e 7. Não houve diferença significativa entre os grupos.

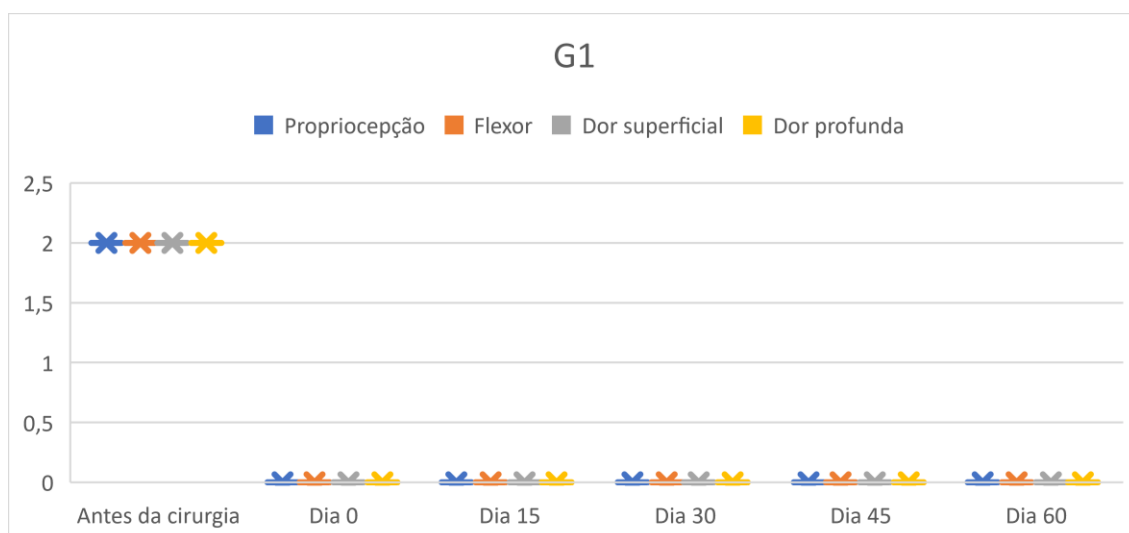


Figura 6- Valores médios dos escores da avaliação clínica de membros de coelhos submetidos a correção de secção completa de nervo ciático com técnica de sutura epineural isolada(G1).

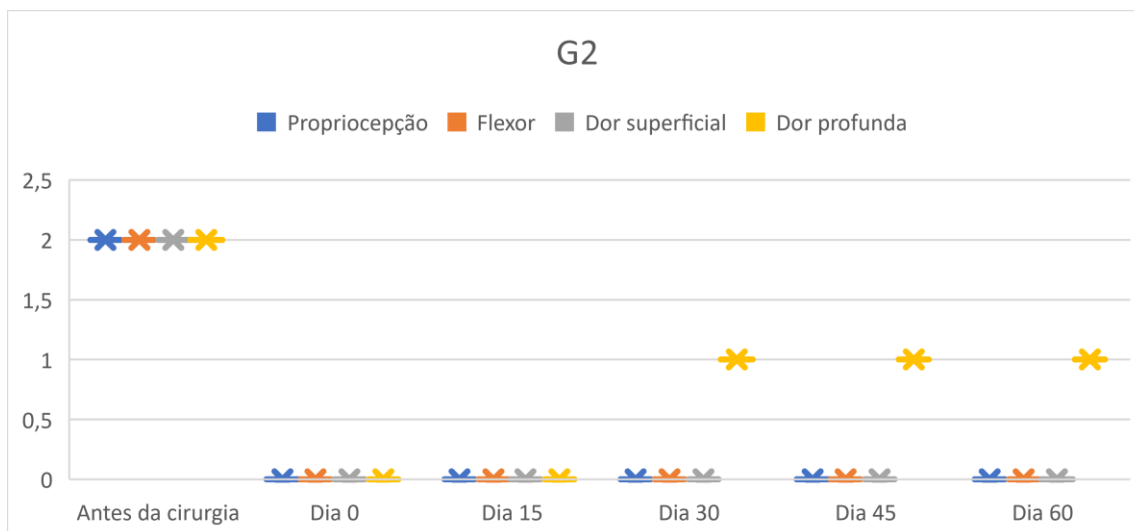


Figura 7– Valores médios dos escores da avaliação clínica de membros de coelhos submetidos a correção de secção completa do nervo ciático com técnica de sutura associada a implante a base de quitosana (G2).

Na avaliação neurológica dos pacientes do grupo 1 (G1) e grupo 2 (G2), nos dias 0, 15, 30, 45 e 60 dias não houve diferença clínica entre os grupos, sendo observado após o procedimento cirúrgico déficits neurológicos de todos os parâmetros avaliados no membro estudado. Uma discreta resposta de percepção dolorosa profunda foi observada a partir de 30 dias após o procedimento cirúrgico no G2, permanecendo assim até os 60 dias após o procedimento. Os membros contralaterais permaneceram com parâmetros neurológicos normais durante todo o experimento.

A avaliação funcional e da percepção de dor do membro é um teste seguro, não invasivo e pode ser reproduzido diversas vezes em diversas espécies, assim como apresentado por Gonzalez-Perez et al., (2015), ao avaliar técnica de tubulização com implante a base de quitosana no reparo de nervo periférico em ratos, o autor observou uma relação do retorno sensorial à dor com o grau de reparação nervosa.

O autor ainda relata que os animais pertencentes ao grupo com uso de tubo de quitosana apresentaram déficit sensorial até 30 dias após o procedimento, os mesmos dados foram obtidos no presente estudo.

Na avaliação macroscópica aos 60 dias, foi possível observar reação local nos animais do G2, causada provavelmente pela presença do implante, tal achado corrobora autores como Gnavi et al., (2013) que ao avaliar implantes a base de quitosana utilizados na reparação nervosa, observou que o polímero apresenta características biocompatíveis e não provoca resposta inflamatória que prejudique o processo de regeneração tecidual.

A avaliação histológica confirmou essa hipótese, como apresentado na figura 8, é possível observar que a presença do implante acelerou o processo de reparação com maior ação de células de Schwann e menor grau de degeneração Walleriana no G2 quando comparado com o G1. Houve diferença significativa entre os grupos (0,05%) quando comparados os parâmetros de desmielinização e degeneração Walleriana.

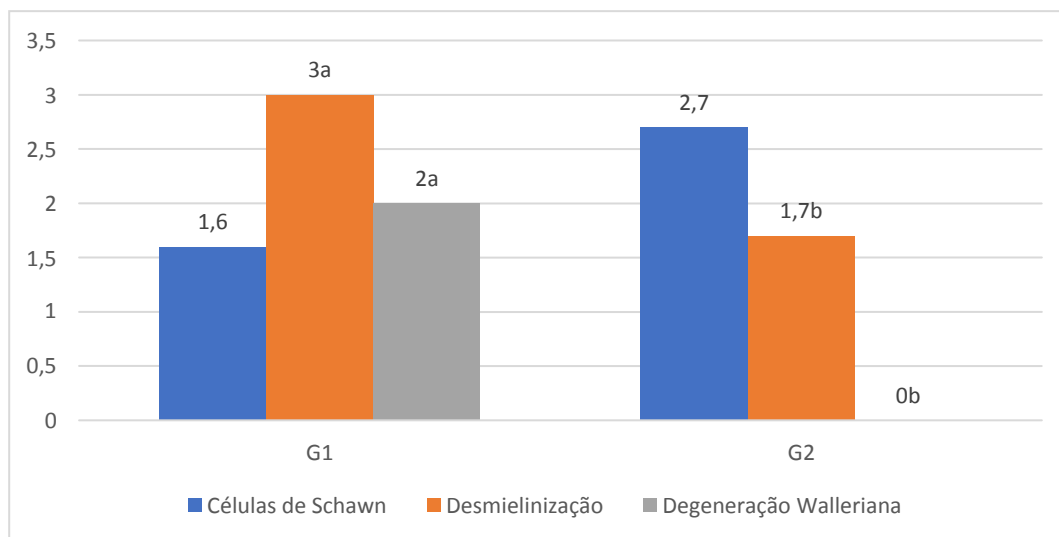


Figura 8– Valores médios dos escores da avaliação histopatológica de nervos submetidos a neurotmesa reparados com técnica de sutura epineural isolados (G1) ou associados a implante de quitosana (G2) em coelhos. Médias seguidas de letras diferentes diferiram estatisticamente no teste de Kruskal-Wallis com nível de significância de 5% quando comparados os grupos.

De acordo com Yamasaki et al., (2015), os processos de desmielinização e câmara de digestão dizem respeito as primeiras etapas da reparação nervosa, sendo associados a remoção de debris celulares (Figura 9) e manutenção de ambiente adequado para crescimento e organização de axônios, o que sugere que no presente estudo o G2 estava em processo mais avançado de reparação quando comparado com o G1.

Resultados diferentes são relatados por Shapira et al., (2015), o qual não observou diferença entre a técnica de enxerto autólogo e uso de tubos a base de quitosana para reparo de defeitos de nervo periférico em ratos, no presente estudo os achados histopatológicos sugerem reparação mais rápida no G2, mesmo com resultados funcionais semelhantes entre os grupos.

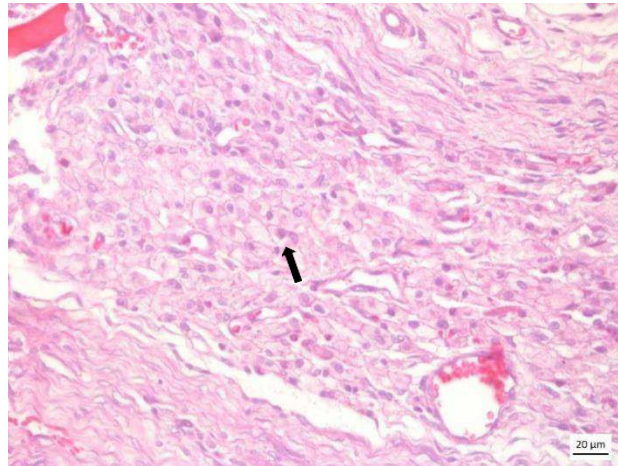


Figura 9- Fotomicrografia obtida de corte histológico de segmento distal de nervo ciático de coelho; seta demonstrando macrófago fagocitando a bainha de mielina após 60 dias da neurotmeze (G2). HE. Objetiva 40x.

O maior escore de atividade de células de Schwann (Figura 10) encontrado no grupo G2 confirma o proposto por Konofaos & Ver Halen, (2013), que ao estudarem a tubulização como técnica de reparação de nervos periféricos, observaram que a quitosana influenciou benéficamente sobre os fatores envolvidos na sobrevivência e regulação dessas células.

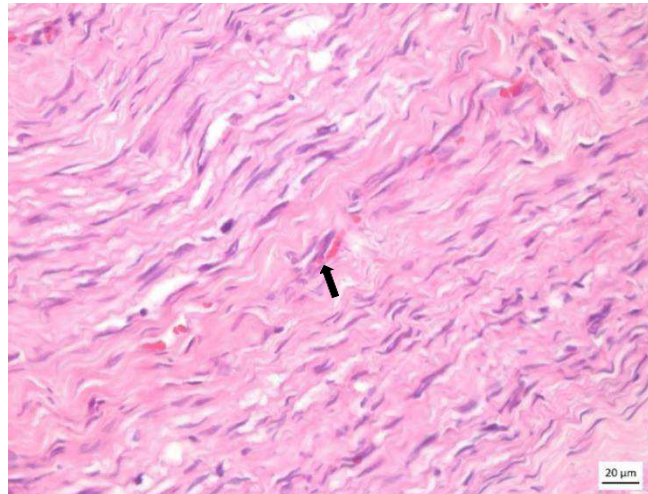


Figura 10- Fotomicrografia obtida de corte histológico de segmento distal de nervo ciático de coelho; seta demonstrando re mielinação do nervo ciático, com ação das células de Schwann (G1). HE. Objetiva 40x.

O estímulo de reparação da quitosana parece estimular tanto defeitos nervosos agudos, como o visualizado no presente estudo, como em defeitos crônicos, como o relatado Stöbel et al., (2018), o qual obteve resultados satisfatórios com defeitos

produzidos em nervos periféricos de ratos tratados com tubos de quitosana após 45 dias.

O uso de tubos a base de quitosana ainda possibilitam a associação desse biomaterial com outras modalidades terapêuticas, como relatado por SOUSA SEGUNDO et al., (2018) esse biomaterial apresentou boa interação com plasma rico em plaquetas na reparação de defeito troclear em coelhos.

De acordo com Bhangra et al., (2016), o uso de células tronco para crescimento artificial de células de Schwann se mostra uma alternativa promissora, essa terapia associada a capacidade da quitosana em promover manutenção e proliferação dessas células fazem com que a associação dessas modalidades terapêuticas seja promissora.

CONCLUSÃO

Conclui-se que apesar de não ser observada diferença significativa funcional entre a sutura epineural com ou sem implantes a base de quitosana, os achados histopatológicos sugerem que o implante favorecem o processo de reparação de nervos periféricos nesta espécie no tempo estudado.

REFERENCIAS

ABARRATEGI, A.; LÓPIZ-MORALES, Y.; RAMOS, V.; CIVANTOS, A.; LÓPEZ-DURÁN, J. Chitosan scaffolds for osteochondral tissue regeneration. *Biomed. Mater. Res. A*. v. 95, n. 4, p. 1132 -1141, 2010.

AZEVEDO, A.S.; SÁ, M.J.C.; FOOK, M.V.L.; NÓBREGA NETO, P.I.; SOUSA, O.B.; AZEVEDO, S.S. Hidroxiapatita e quitosana isoladas e associadas à medula óssea no reparo do tecido ósseo em coelhos. Estudo histológico e morfométrico. *Ciência Rural (UFSM. Impresso)*. v. 43, p. 1265-1270, 2013a.

AZEVEDO, A.S.; SÁ, M.J.C.; FOOK, M.V.L.; NÓBREGA NETO, P.I.; SOUSA, O.B.; AZEVEDO, S.S.; TEIXEIRA, M.W.; COSTA, F.S.; ARAÚJO, A.L. Use of chitosan and β -tricalcium phosphate, alone and in combination, for bone healing in rabbits. *Journal of Materials Science. Materials in Medicine*, v. 25, p. 481-486, 2013b.

BHANGRA, K.S.; BUSUTTIL, F.; PHILLIPS, J.B.; RAHIM, A.A. Using stem cells to grow artificial tissue for peripheral nerve repair. *Stem Cells International*, v. 2, p. 1-18, 2016.

CHEN, X.; LIU, C.; LIU, C.; MENG, X.; LEE, C.M.; PARK, H. Preparation and biocompatibility of chitosan microcarriers as biomaterials. *Biochem. Eng. J.* v. 27, p. 269 -274, 2006.

DUBOVÝ, P.; KLUSÁKOVÁ, I.; SVIZENSKÁ, H. Inflammatory profiling of Schwann cells in contact with growing axons distal to nerve injury. *Bio. Med. Research International*. v. 2014, p. 1-7, 2014.

GNAVI, S.; BARWIG, C.; FREIER, T.; HAASTERT-TALINI, K.; GROTHE, C.; GEUNA, S. The use of Chitosan-based scaffolds to enhance regeneration in the nervous system. *Int. Rev. Neurobiol.* v. 109, p. 1-62, 2013.

GONZALEZ-PEREZ, F.; COBIANCHI, S.; GEUNA, S.; BARWIG, C.; FREIER, T.; UDINA, E.; NAVARRO, X. Tubulization with chitosan guides for the repair of long gap peripheral nerve injury in the rat. *Microsurgery*. v. 35, n. 4, p. 300-308, 2015.

HOUSCHYAR, K.S.; MOMENT, A.; PYLES, M.N.; CHA, J.Y.; MAAN, Z.N.; DUSCHER, D.; JEW, O.S.; SIEMERS, F.; VAN SCHOONHOVEN, J. The role of current techniques and concepts in peripheral nerve repair. *Platic Surgery International*. p. 1-8, 2016.

HUIJUN, L.; HU, C.; YU, H.; CHEN, C. Chitosan composite scaffolds for articular cartilage defect repair: a review. *RSC Advances*. v. 8, n. 7, p. 3736-3749, 2018.

KONOFAOS, P. & VER HALEN, J. Nerve repair by means of tubulization: Past, present, future. *J. Reconstruct. Microsurg.* v. 29, p. 149–164, 2013.

SEGUNDO, F.A.S.; COSTA, E.I.S.; AZEVEDO, A.S.; ARAÚJO, A.L.; SILVA, A.C.F.; DE LIMA, G.G.; DE SÁ, M.J.C. Platelet-Rich Plasma, Hydroxyapatite, and Chitosan in the Bone and Cartilaginous Regeneration of Femoral Trochlea in Rabbits: Clinical, Radiographic, and Histomorphometric Evaluations. *Journal of Healthcare Engineering*, v. 2018, p. 1-6, 2018.

SHAPIRA, Y.; TOLMASOV, M.; NISSAN, M.; REIDER, E.; KOREN, A.; BIRON, T.; BITAN, Y.; LIVNAT, M.; RONCHI, G.; GEUNA, S.; ROCHKING, S. Comparison of results between chitosan hollow tube and autologous nerve graft in reconstruction of peripheral nerve defect: An experimental study. *Microsurgery*. v. 36, n. 8, p. 664-671, 2016.

STÖBEL, M.; WILDHAGEN, V.M.; HELMECKE, O.; METZEN, J.; PFUND, C.B.; FREIER, T.; HAASTERT-TALINI, K. Comparative evaluation of chitosan nerve guides with regular or increased bendability for acute and delayed peripheral nerve repair: A comprehensive comparison with autologous nerve grafts and muscle-in-vein grafts. *Anat. Rec. (Hoboken)*, v. 301, n. 10, p. 1697-1713, 2018.

YAMASAKI, T.; FUJIWARA, H.; ODA, R.; MIKAMI, Y.; IKEDA, T.; NAGAE, M.; SHIRAI, T.; MORISAKI, S.; IKOMA, K.; TOKITA-MASUGI, M.; YAMADA, K.; KAWATA, M.; KUBO, T. *In vivo* evaluation of rabbit sciatic nerve regeneration with diffusion tensor imaging (DTI): correlations with histology and behavior. *Magnetic Resonance Imaging*. v. 33, p. 95-101, 2015.