ANNA CAROLINA RATTO TEMPESTINI HORLIANA

**ANÁLISE FUNCIONAL E HISTOLÓGICA DA UTILIZAÇÃO DA
HIALURONIDASE DURANTE A ANESTESIA LOCAL EM NERVO
CIÁTICO DE RATOS**

São Paulo

2008

Anna Carolina Ratto Tempestini Horliana

**Análise funcional e histológica da utilização da hialuronidase
durante a anestesia local em nervo ciático de ratos**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia
da Universidade de São Paulo, para obter o
título de Doutor, pelo Programa de Pós-
Graduação em Ciências Odontológicas.

Área de Concentração: Clínica Integrada

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Maria Aparecida Borsatti

São Paulo

2008

Horliana, Anna Carolina Ratto Tempestini

Análise funcional e histológica da utilização da hialuronidase durante a anestesia local em nervo ciático de ratos / Anna Carolina Ratto Tempestini Horliana; orientador Maria Aparecida Borsatti. -- São Paulo, 2008.

78p. : fig., tab., graf.; 30 cm.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas. Área de Concentração: Clínica Integrada) -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

1. Anestesia local – Hialuronoglucosaminidase – Análise 2.
Anestesia Local (Odontologia)

CDD 617.96

BLACK D91

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE E COMUNICADA AO AUTOR A REFERÊNCIA DA CITAÇÃO.

São Paulo, ____/____/____

Assinatura:

E-mail:

FOLHA DE APROVAÇÃO

Horliana ACRT. Análise funcional e histológica da utilização da hialuronidase durante a anestesia local em nervo ciático de ratos [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2008.

São Paulo: ____/____/____

Banca Examinadora

1) Prof(a). Dr(a).

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

2) Prof(a). Dr(a).

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

3) Prof(a). Dr(a).

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

4) Prof(a). Dr(a).

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

5) Prof(a). Dr(a).

Titulação: _____

Assinatura _____
Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

A Deus por existir.

Ao meu marido Ricardo pelo amor em todo o seu significado.

Aos meus pais Osvaldo e Elisabete, pelo exemplo de vida e conduta. E aos meus irmãos Luiz Carlos e João Paulo pela amizade sincera.

A todos os professores, amigos, colegas, técnicos, que, de alguma forma, contribuíram com a elaboração deste trabalho, o qual me permite dar um passo importante na minha realização pessoal e profissional.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À **Profª Maria Aparecida Borsatti**, por todos os ensinamentos, por todos os momentos que passamos juntas, por me acompanhar em todas as fases do trabalho, por todas as dificuldades e alegrias encontradas neste período, por confiar em mim e me apoiar sempre. Mais uma vez, foi uma honra ter uma pessoa tão competente e ao mesmo tempo tão companheira e amiga como orientadora. Muito obrigada!

À **Profª Marinilce Fagundes dos Santos**, pela confiança em mim depositada, pelo apoio em todos os momentos, pelos ensinamentos sem os quais este trabalho nunca estaria completo, por abrir as portas do seu laboratório durante todo o período de realização do trabalho, por todos os conselhos e acima de tudo pela amizade e carinho, Muito obrigada!

Ao **Prof. Nicolau Tortamano** (*in memoriam*) minha admiração pelo seu comprometimento com a Odontologia

Ao **Prof. Rodney Garcia Rocha** por todos os ensinamentos, atenção, dedicação por me apoiar e incentivar em todos os momentos do curso e na realização do meu trabalho. O senhor é um verdadeiro mestre! Muito obrigada!.

Aos queridos professores da Disciplina de Clínica Integrada **Prof. Flávio Eduardo Guillin Perez, Prof. Carlos Alberto Adde Prof. Mario Sérgio Soares Prof. José Leonardo Simone Prof. Waldyr Antônio Jorge, Prof. Marcelo M. Romano** e às queridas professoras da urgência **Prof^a Isabel P. Tortamano Prof^a Sibeles Sarti Penha, Prof^a Inês A. Buscariollo**, obrigada por entenderem a minha ausência todas as vezes que precisei estar no ICB-USP para a realização da parte experimental deste trabalho, agradeço o carinho e atenção que sempre recebi de cada um de vocês e por todos os ensinamentos recebidos nestes anos de convivência.

À minha querida amiga **Vilma A. Vieira** que entendeu minha ausência na Disciplina durante a realização deste trabalho, mas que em momento algum deixou de prestar apoio, suporte e acima de tudo oferecer um ombro amigo.

Aos meus queridos amigos da pós-graduação **Andréia, Estevam, Irineu, Kazue, Mayara, Marcelo, Maurício, Wuo** com quem convivi durante todos esses anos e tive a oportunidade de estreitar laços de amizade que com certeza não serão desfeitos.

À todos os novos amigos do laboratório da **Prof^a Marinilce** e em especial ao **Marcelo Lamers** pela competente revisão do projeto de pesquisa, por todos os ensinamentos, pela fotos do painel e pela paciência. E também à **Talyta** pelo companheirismo, pelo apoio em todos os momentos e pela amizade.

À **Cleusa e Emília** pela amizade, carinho e apoio técnico e presteza durante toda a realização do trabalho, sem os quais este jamais estaria completo.

À **Profª Dânia Hamassaki-Britto** e todo o pessoal do seu laboratório pelo apoio e amizade e ao **Prof Bauer** pela padronização na dissecação do nervo ciático e pela atenção. Também à **Profª Telma Zorn** pelo carinho que me recebeu todas as vezes que necessitei e a todo o pessoal do seu laboratório, em especial à Fernanda e o Rodolfo. E finalmente ao **Prof Sartier** e sua gentil assistente **Guiomar** pelo empréstimo do Analgesímetro para a realização da Fase I deste trabalho.

Aos funcionários do **Biotério do ICB-USP** pelo carinho e recepção, e em especial ao **Fernando**.

Aos **funcionários do Departamento de Estomatologia** pelo apoio e carinho sempre dispensados em especial à **Verinha**, pelo apoio e amizade.

Ao **serviço de pós-graduação** pela eficiência e agilidade com as quais pude contar durante todo este período.

A **todos os funcionários do SDO – FOUSP** (Biblioteca) pela atenção carinho e eficiência com que realizaram o atendimento durante todo o período de realização do curso, seria injusta se citasse nomes, pois com certeza esqueceria de alguém. E às **bibliotecárias do SDO** pelo carinho e em especial à **Vânia e Glauci** pela competente revisão do trabalho quanto às normas da FOUSP e pela amizade.

Ao **Aldo** pelos painéis impressos na Tese e pela amizade e ao **Sérgio** pelo competente trabalho de impressão e pela atenção sempre prestada.

À **Apsen Farmacêutica S/A**, pelo material cedido para a realização da pesquisa.

À **CAPES** pela bolsa cedida e à **FAPESP** pelo apoio financeiro.

Aos **pacientes do consultório** e a minha secretária **Lucia** que mais uma vez me apoiaram e entenderam minha ausência.

Finalmente um agradecimento especial aos **animais** utilizados nesta pesquisa, que através de suas vidas permitiram a realização deste trabalho.

Horliana ACRT. Análise funcional e histológica da utilização da hialuronidase durante a anestesia local em nervo ciático de ratos [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2008.

RESUMO

O uso concomitante da enzima hialuronidase (H) ao anestésico local (AL) é muito utilizado para melhorar a eficácia anestésica em oftalmologia; em odontologia, no entanto, não mostrou vantagens. Um novo protocolo foi testado com o objetivo de prolongar a anestesia local sem a realização de complementação anestésica. Esta possibilidade seria especialmente interessante para pacientes que apresentam restrição de dose máxima recomendada de AL ou vasoconstritor (ex. cardiopatas). Utilizou-se cloridrato de lidocaína 2% com epinefrina para bloqueio sensitivo, motor e proprioceptivo no nervo ciático em ratos (Truant, 1958). Hialuronidase 75 UTR (unidade de turbidez reduzida) foi injetada no mesmo local 30 minutos após o início da analgesia (antes do término do efeito anestésico), utilizando-se a pata contralateral como controle (injeção de solução anestésica e veículo da hialuronidase – solvente). A duração do bloqueio sensitivo foi avaliada através da ausência do reflexo de retirada da pata, utilizando-se um analgesímetro. O bloqueio motor foi avaliado pela duração da claudicação e da ausência do reflexo de estiramento da pata, enquanto o bloqueio proprioceptivo foi avaliado pela perda dos reflexos de salto e do reposicionamento da pata (Thalhammer et al., 1995). Foi também estudada a alteração tecidual induzida pela hialuronidase nos períodos de 1 h, 24 h, 48 h e 72 h pós-injeção. Foram avaliados os grupos: (1) falso operado (*Sham*); (2)

AL +H; (3) AL+ solvente (Solv) e (4) Solv+Solv. Concluiu-se que a hialuronidase prolonga a duração de ação anestésica local quando injetada isoladamente antes da regressão do bloqueio de condução do nervo ciático de rato. Em todos os grupos analisados, exceto o grupo falso-operado, observou-se reação inflamatória após as injeções. Esta inflamação foi mais acentuada no grupo hialuronidase, que mostrava sinais de regressão após 72 horas. É possível que o mecanismo de ação da hialuronidase envolva a desorganização do tecido conjuntivo na região da injeção, facilitando a difusão da solução anestésica residual até o nervo.

Palavras-Chave: anestésicos locais, ácido hialurônico, morfologia, reparo tecidual, nervo ciático, hialuronogluconaminidase

Horliana ACRT. Functional and histological analysis of hyaluronidase use during local anesthesia of the rat sciatic nerve [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2008.

ABSTRACT

The concomitant use of the enzyme hyaluronidase (H) and local anesthetics (LA) is widely employed in ophthalmology in order to improve the effectiveness of anesthesia; in dentistry, however, this association did not seem advantageous. A new protocol was tested with the aim of drawing out local anesthesia without supplementary anesthesia. This possibility is especially interesting for patients with restriction of maximum recommended dose of LA or vasoconstrictor due to pathological conditions (e.g. heart disease). We used 2% lidocaine hydrochloride with epinephrine for sensitive, motor and proprioceptive blockade of the sciatic nerve in rats (Truant, 1958). Hyaluronidase 75 UTR was injected 30 minutes after the beginning of the anesthesia (before the recovery of the sensory function), using the contralateral limb as control (injection of LA plus the H vehicle – solvent). The duration of the sensitive blockade was evaluated through the absence of the paw withdrawal reflex, using an analgesymeter. The motor blockade was evaluated by the duration of claudication (complete absence of extensor postural thrust) and by the absence of the paw stretching reflex, while the proprioceptive blockade was evaluated by the absence of hopping and tactile placing response (Thalhammer et al., 1995). Histological changes induced by H were analyzed 1h, 24h, 48h, and 72 h

after the injection in the following groups: (1) Sham; (2) LA + H; (3) LA + H solvent (solv) and (4) Solv + Solv. We concluded that H draws out local anesthesia when injected before the recovery of the sciatic nerve blockade in the rat. In all groups studied, with the exception of the Sham, there was an inflammatory reaction after the injections. Inflammation was more intense after H injection, showing signs of regression after 72 hours. It is possible that the mechanism of action of H involves disorganization of the connective tissue, thus facilitating the diffusion of the residual anesthetic solution to the nerve.

Keywords: local anesthetic, hyaluronic acid, morphology, tissue repair, sciatic nerve, hyaluronoglicosaminidase

SUMÁRIO

	p.
1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DA LITERATURA	15
3 PROPOSIÇÃO	26
4 CASUÍSTICA- MATERIAL E MÉTODOS	27
5 RESULTADOS	48
6 DISCUSSÃO	63
7 CONCLUSÕES	72
REFERÊNCIAS.....	73
ANEXOS.....	77

1 INTRODUÇÃO

A hialuronidase (H) é uma enzima que atua sobre o ácido hialurônico (ou hialuronam) presente na matriz extracelular, através da quebra da ligação β 1-4 entre o ácido glucurônico e a N-acetilglucosamina (HYNES; WALTON, 2000).

Em anestesiologia oftalmológica, a hialuronidase tem sido utilizada há mais de 40 anos concomitante ao anestésico local (AL), a fim de facilitar a difusão deste através do tecido periocular. Contudo, em odontologia, seu uso concomitante ao anestésico local foi contra-indicado por Ridenour et al. (2001), por não melhorar o índice de sucesso do bloqueio nervoso e induzir alguns efeitos indesejáveis.

Nosso grupo de pesquisa desenvolveu um protocolo alternativo, testado em nervo ciático de ratos (BORSATTI et al., 2004) e posteriormente em humanos (HORLIANA et al., 2008), no qual a hialuronidase não foi injetada concomitantemente ao anestésico local, mas antes da regressão do efeito anestésico, resultando no aumento da duração do bloqueio nervoso.

Tal protocolo vislumbra prolongar a anestesia local quando não for aconselhável realizar complementação anestésica em pacientes com algum comprometimento sistêmico (ex. com algumas cardiopatias), que apresentam restrição de dose máxima recomendada de anestésico local ou vasoconstritor.

Ainda não foi estudada a influência da hialuronidase na concentração de 75 UTR no bloqueio nervoso sensitivo, motor e proprioceptivo em nervo ciático de rato, visto que para estes dois últimos ocorrerem seria necessária uma maior quantidade de anestésico local (bloqueio nervoso diferencial) (MALAMED, 2001).

Do mesmo modo, não existem estudos analisando morfolologicamente as reações teciduais frente à aplicação da enzima hialuronidase após o anestésico local.

2 REVISÃO DA LITERATURA

O ácido hialurônico consiste em uma seqüência linear repetida de até 25 mil unidades dissacarídicas idênticas não sulfatadas de ácido glucurônico e N-acetilglucosamina unidas alternadamente pelas ligações glicosídicas β -1,3 e β -1,4 (β =beta) Não é uma molécula sulfatada como a maioria dos glicosaminoglicanos. Conseqüentemente, são moléculas com carga negativa elevada, que atraem uma nuvem de cátions (consequentemente atraem água), o que explica a alta hidrofília destes compostos e a formação de um gel na matriz extracelular. Os grupamentos ácidos destes compostos interagem com os radicais básicos do colágeno contribuindo para a firmeza (turgor) da matriz extracelular (ALBERTS et al., 2004; HYNES; WALTON, 2000; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2000; SALMEN, 2003; WATSON, 1993).

O ácido hialurônico é encontrado em todos os tecidos e fluidos de animais adultos, como por exemplo tecidos cartilaginosos, cérebro, fluido sinovial, músculos e em grande quantidade na pele (ALBERTS et al., 2004; HYNES; WALTON, 2000). Foi demonstrada sua presença na superfície pericelular de condrócitos, células de fibrossarcomas e células musculares (COHEN et al., 2003), mas ainda não o foi na superfície de fibras nervosas. O ácido hialurônico é o maior componente da matriz extracelular especialmente em tecido conjuntivo frouxo, apresentando a capacidade de interagir com diferentes receptores incluindo proteínas da superfície celular e proteoglicanos (ALBERTS et al., 2004; HYNES; WALTON, 2000; SALMEN, 2003).

Hoje se sabe que o ácido hialurônico é liberado diretamente da superfície celular por um complexo enzimático embebido na membrana plasmática, enquanto outras glicosaminoglicanas são sintetizadas dentro da célula e liberadas por exocitose (ALBERTS et al., 2004).

A degradação do ácido hialurônico é mediada principalmente pela enzima hialuronidase. Esta enzima, também chamada de hialuronoglucosaminidase, quebra a barreira intersticial presente entre as células ao clivar a ligação glicosídica β -1,4 entre o N-acetilglucosamina e o ácido glucurônico (Figura 2.1).

Figura 2.1 - Estrutura do ácido hialurônico. O retângulo mostra a subunidade (dissacarídeo) que se repete formando uma longa cadeia polissacarídica

Esta ação é reversível pois a estrutura do tecido começa a ser restabelecida de 2 a 4 dias segundo uma revisão de literatura (FARR et al., 1997). Seifter (1950) estudou o efeito tecidual em vários órgãos (fígado, rins, adrenais, pulmões, timo, coração) ao injetar doses tóxicas de hialuronidase (2.000.000 UTR/Kg) (UTR = unidade de turbidez reduzida) por via intravenosa em 17 ratos (n=17 - amostra

composta por 17 ratos) variando-se os veículos, solução fisiológica e água destilada. No grupo no qual foi injetada como veículo (solvente) a solução fisiológica, 4 animais morreram em 5 minutos. No grupo com diluição em água destilada, 2 animais morreram *overnight*. Não existiu diferença no comportamento dos ratos sobreviventes. Estes foram sacrificados em 10 (n=11), 24 (n=7), 48 (n=6) e 72 horas (n=2) e ao final de 7 dias (n=2) e 10 dias (n=1). Os achados histopatológicos mais intensos (destrutivos) foram encontrados nas 48 horas após a injeção. Em 72 horas as alterações foram menos severas e em 1 semana nenhum dos animais mostrou efeitos significantes nos órgãos examinados.

As alterações morfológicas no local de injeção para a avaliação do feixe nervoso e tecidos adjacentes induzidas pela hialuronidase e o tempo de demora para a recuperação tecidual após seu uso ainda não foram plenamente estudadas.

Apenas Hechter (1948), utilizando parâmetros subjetivos de inspeção visual (a área era examinada até que se tornasse totalmente plana vista de um ângulo de 90 graus) avaliou o tempo necessário para o desaparecimento da tumefação após a injeção intradérmica de hialuronidase nas concentrações: 20, 2, 0.2, 0.02, 0.002 UTR e solvente em áreas separadas na pele do braço de seres humanos. Em seguida injetou NaCl 0,85% no mesmo local. Vinte e quatro horas após a administração da hialuronidase, a barreira dérmica da área injetada exibia sinais de tumefação (considerado pelo autor como permeabilidade alterada) proporcional à dose da enzima e, depois de 48 horas, a permeabilidade da barreira em todas as áreas tratadas já estava normal. Ainda que o autor tenha considerado que após 48 horas houve reconstrução da barreira dérmica (sem tumefação), não foi feita a avaliação histológica dos tecidos.

O uso de hialuronidase em soluções de anestésicos locais para uso odontológico foi discutido durante muitos anos na década de 50 indicando vantagens, mas nos últimos anos poucos trabalhos foram publicados (RIDENOUR et al., 2001; HORLIANA et al., 2008).

A hialuronidase foi identificada pela primeira vez por Duran (1929), ao perceber que quando injetava subcutaneamente certas vacinas, tinturas e toxinas, a difusão era facilitada por uma substância conhecida inicialmente como um “fator de difusão” de substâncias através dos tecidos e, depois, foi identificada como uma enzima. Posteriormente, outros autores constataram que este fator de difusão se devia a quebra do ácido hialurônico (FARR et al., 1997; HYNES; WALTON, 2000; SALMEN, 2003, WATSON, 1993), e não de fibras colágenas (FARR et al., 1997; WATSON, 1993).

Similares da enzima hialuronidase foram detectados em um grande número de tecidos, especialmente em extratos de testículos, e em outros tecidos como: olhos, pele, fígado, rins, baço, musculatura esquelética, útero, placenta, ovário, secreção nasal, líquido lacrimal e na parte posterior da hipófise, entre outros (FARR et al., 1997; WATSON, 1993). Também está presente nos espermatozóides exercendo um importante papel na fertilização de muitos mamíferos, inclusive de humanos (FARR et al., 1997; SALMEN, 2003).

Existem diferentes grupos de hialuronidase que quando isolados diferem quanto ao peso molecular e pH (SALMEN, 2003). Estas enzimas com seqüências homólogas podem ser classificadas segundo Meyer (1971) em três grandes grupos de acordo com o seu mecanismo catalítico: (1) Hialuronato-4-glicanohidrolase (tipo testicular) é encontrada em mamíferos e degrada o ácido hialurônico pela quebra da ligação 1,4- β -glicosídica sendo os tetrassacarídeos o principal produto

(CRAWFORD; KERR, 1994). (2) Hialuronato-3-glicanohidrolase (ou hialuronidase sanguínea) é produzida por algumas espécies de sanguessugas e por alguns vermes. Também formam tetrassacarídeos, porém a enzima quebra a ligação 1,3- β -glicosídica (FARR et al., 1997; SALMEN, 2003). (3) O terceiro grupo é o da hialuronidase bacteriana a qual degrada o ácido hialurônico através de uma reação de eliminação de todas as ligações glicosídicas β 1-4. Como consequência, ocorre a produção de dissacarídeos não saturados os quais tem a finalidade de facilitar a difusão de suas toxinas através dos tecidos e está sendo estudada a possibilidade das bactérias quebrarem a molécula para obterem nutrientes. (HYNES; WALTON, 2000; SALMEN, 2003; WATSON, 1993).

A determinação das características farmacocinéticas da hialuronidase não é simples, pois é uma enzima que coexiste no corpo humano. A faixa eficaz da hialuronidase humana é constatada com um pH ótimo de 3,7 a 4,0. Em testes com hialuronidase obtida de animais, constatou-se atividade mesmo com pH de 7,5. Ao ser aplicada pela via subcutânea, é inativada por inibidores tanto localmente como através da absorção pelo sistema circulatório. Com a administração de 500 UTR de hialuronidase /kg de peso por via intravenosa, a enzima distribui-se pelos rins, fígado, trato gastrointestinal e nas demais partes do organismo. A meia vida da atividade sérica enzimática foi de 3 minutos. Sua eliminação ocorre primeiramente por uma rápida queda da atividade sérica, depois uma segunda fase na qual ocorre a passagem da enzima do ambiente intra vascular para o extravascular (com duração de 1 a 2 horas). Em uma terceira fase, a hialuronidase é inativada e respectivamente eliminada (1 a 3 horas) (FARR et al., 1997).

Apenas no estudo pioneiro de Seifter (1950) foi citada a toxicidade aguda (LD_{50}) que ocorre após a injeção intravenosa de 10 mg/kg de peso corpóreo de 2×10^6 UTR de hialuronidase e que não foram constatados efeitos mutagênicos em pesquisas *in vivo* e *in vitro*.

Por não haver muitos estudos laboratoriais e clínicos, são necessárias mais investigações para demonstrar a eficácia e segurança da hialuronidase antes que o seu uso seja disseminado em odontologia (MALAMED, 2001).

Sob a ação da hialuronidase a alta viscosidade e habilidade lubrificante do ácido hialurônico ficam temporariamente diminuídas, o que aumenta a difusão das substâncias injetadas pelos planos teciduais. A hialuronidase é utilizada em cirurgias oftalmológicas como adjuvante ao anestésico local para melhorar a eficácia dos bloqueios retrobulbares (KALLIO; PALOHEIMO; MAUNUKSELA, 2000; SARVELA; NIKKI, 1992;) e peribulbares (BARR et al., 1995; GAO; BUDD, 1996; HAMADA et al., 2005; NICOLL et al., 1986; SOARES et al., 2002), além de reduzir a latência do bloqueio nervoso (NICOLL et al., 1986; SARVELA; NIKKI, 1992), diminuir a pressão intra-ocular (SOARES et al., 2002) e promover ação protetora contra a injúria muscular causada por anestésicos locais de longa duração (bupivacaína) (HAMADA et al., 2005). A hialuronidase facilitaria a difusão do anestésico local através dos tecidos perioculares (CRAWFORD; KERR, 1994; DEMPSEY; BARRET; KIRBY, 1997; MANTOVANI; BRYANT; NICHOLSON, 2001; NATHAN et al., 1996; SOARES et al., 2002; WATSON, 1993) nos bloqueios retrobulbares e peribulbares.

Nicoll et al. (1986) provou que a associação de hialuronidase (75 UTR/ml) em uma dose de 3,5ml por paciente de 3ml bupivacaína (0,5%) e 2ml de lidocaína (2%) melhorou a eficácia do bloqueio retrobulbar. A porcentagem de

sucesso (completo bloqueio retrobulbar) foi de aproximadamente 49% para o grupo que recebeu apenas bupivacaína/lidocaína (n=50), enquanto que para o grupo anestesiado com bupivacaína/lidocaína e hialuronidase (n=50) foi de 81%, evidenciando que a hialuronidase melhora a eficácia da anestesia.

Sarvela e Nikki (1992) associaram hialuronidase (7,5 UTR/ml) e etidocaína 1,5% no bloqueio peribulbar em 70 pacientes submetidos à cirurgia de catarata de modo duplo-cego. Concluiu-se que a adição de hialuronidase à etidocaína diminuiu o volume necessário e melhorou a qualidade do bloqueio comparada com a etidocaína isolada. Em uma segunda parte do estudo compararam a utilização de etidocaína associada à hialuronidase na dose de 7,5 UTR/ ml com o mesmo anestésico associado a hialuronidase na dose de 15 UTR/ ml. Concluíram que ao aumentar a concentração de hialuronidase não houve melhora da efetividade do bloqueio.

Nenhuma diferença na latência, necessidade de suplementação, falha anestésica e condições cirúrgicas foi observada por Crawford e Kerr, (1994) após bloqueios peribulbares em 60 pacientes utilizando a hialuronidase 50 UTR injetada concomitantemente a mistura dos anestésicos locais na proporção de 2:1 de lidocaína 2% e bupivacaína 0,75%.

Nathan et al. (1996), objetivaram comparar a farmacocinética da associação de 5,5 ml de lidocaína 2% e 5,5 ml de bupivacaína 0,5% administrado no bloqueio peribulbar com hialuronidase 100 UTR (n=10) ou água destilada (n=11) como grupo controle. Foi medido o nível sérico de anestésico local dos pacientes através da cromatografia líquida de alta performance em um intervalo de tempo entre o final da injeção anestésica até o 360º minuto. A absorção dos anestésicos locais foi acelerada com o uso da hialuronidase, uma vez que o

tempo de alcance da concentração plasmática máxima (T_{max}) para a lidocaína foi de 17 min no grupo com hialuronidase e de 32 min no grupo controle, e para a bupivacaína, de 16 min para o grupo com hialuronidase e 26 min para o grupo controle. Entretanto, a concentração plasmática máxima (C_{max}) não foi afetada de forma significativa com a adição de hialuronidase, uma vez que para a lidocaína esta concentração foi de $1,31 \pm 0,12$ mg/L no grupo com hialuronidase e de $0,98 \pm 0,13$ mg/L no grupo controle, e para a bupivacaína, $0,32 \pm 0,04$ mg/L no grupo com hialuronidase e de $0,27 \pm 0,03$ mg/L no grupo controle. Tanto a meia vida plasmática quanto o volume de distribuição final não se alteraram significativamente com hialuronidase ou grupo controle para ambos os anestésicos locais. Estes autores concluíram que a hialuronidase pode acelerar a difusão do AL de seu local de administração para a corrente sanguínea, porém, que este fato não altera a concentração plasmática máxima dos anestésicos, consideradas abaixo da concentração tóxica.

Dempsey, Barrett e Kirby (1997) analisaram os efeitos de duas concentrações de hialuronidase na qualidade do bloqueio peribulbar em três grupos, sendo que no primeiro foi utilizando 5ml de uma mistura de 1:1 de bupivacaína 0,5% de lidocaína 2% ($n=50$), e nos demais grupos com os mesmos anestésicos, mas acrescentada a hialuronidase 50 UTR ($n=75$) ou 300 UTR ($n=75$). As duas concentrações da enzima aumentaram a qualidade do bloqueio peribulbar aos 5 minutos e a concentração de 300 UTR diminuiu a latência do bloqueio. Os autores afirmaram que por causa destes benefícios, além da fácil administração, baixos níveis de toxicidade e efeitos adversos, indicam o uso da hialuronidase em uma concentração de 300 UTR.

A adição de hialuronidase (3,75 ou 7,5 UTR/ml) a uma mistura de 1:1 de bupivacaína 0,75% e lidocaína 2% em 714 pacientes, reduziu a latência dos bloqueios retrobulbar e peribulbar e ainda diminuiu da necessidade de bloqueios complementares quando comparadas com o grupo controle (sem hialuronidase). Observaram que o resultado obtido não foi concentração-dependente (KALLIO; PALOHEIMO; MAUNUKSELA, 2000).

Em odontologia, Ridenour et al. (2001) avaliaram a eficácia anestésica da lidocaína 2% com epinefrina (1:100.000) injetada concomitantemente a hialuronidase 150 UTR/ml ministradas em uma mesma solução no bloqueio do nervo alveolar inferior em humanos. Neste trabalho, a associação de hialuronidase ao anestésico local não aumentou a incidência do sucesso da anestesia local e aumentou a ocorrência de efeitos indesejáveis como dor e trismo, levando a contra-indicação de seu uso.

Considerando esses resultados, Borsatti et al. (2004) levantaram a hipótese de que possivelmente a hialuronidase injetada concomitantemente ao anestésico local tenha sido a principal causa dos efeitos indesejáveis. Se injetada no momento inicial da anestesia, a hialuronidase dispersaria as moléculas anestésicas que estão ainda em maior quantidade, para tecidos adjacentes pela sua capacidade difusora. Isto poderia resultar em dificuldade para prolongar a duração da anestesia bem como facilitar a indução de trismo e retorno da dor. Para manobrar esta situação, foi sugerido um novo protocolo no qual a hialuronidase seria injetada não concomitantemente, mas, imediatamente antes do término do bloqueio nervoso, afim de prolongar o efeito anestésico por facilitar o acesso de moléculas AL residuais para os arredores da fibra nervosa. Após testar esta hipótese, foi observado que a hialuronidase 800 UTR (determinação

empírica da concentração) prolongou a duração do bloqueio nervoso ciático com anestésico de longa duração quando injetada antes do término do bloqueio.

Utilizando este mesmo protocolo em humanos, a hialuronidase 75 UTR (n=20) ou placebo (água destilada) (n=20) foram injetados de modo duplo-cego aos 40 minutos do início da anestesia com mepivacaína a 2% associada à epinefrina em bloqueio pterigomandibular em 40 cirurgias bilaterais de terceiros molares inferiores. Houve aumento da duração do bloqueio avaliado em tecido pulpar (estímulo elétrico) e gengival (picada). No tecido pulpar houve aumento de 27,5 minutos e na gengiva, de 25 minutos na duração de ação ($p<0,01$) no grupo com hialuronidase em relação ao placebo (HORLIANA et al., 2008). É possível que o aumento da duração anestésica tenha ocorrido devido ao redirecionamento das moléculas para o feixe nervoso.

Esta possibilidade foi aventada baseada nos resultados de Popitz-Bergez et al. (1995) de que bastam 1,6% do volume injetado para que o bloqueio nervoso seja efetivo (completo). Tal resultado foi obtido pela relação intraneural de cloridrato de lidocaína 1% marcada com ^{14}C (0,1ml de cloridrato de lidocaína marcado com isótopo de Carbono), avaliado em nervo ciático de rato.

Em vista dos resultados promissores com a hialuronidase neste protocolo, (BORSATTI et al., 2004; HORLIANA et al., 2008), presume-se futuramente a sua utilização em pesquisas com pacientes com comprometimento sistêmico no qual há restrição do número de tubetes anestésicos com vasoconstritor, evitando-se complementação anestésica.

Do mesmo modo que em anestesia oftalmológica, não há consenso quanto à concentração e volume ideal de hialuronidase, também não há em odontologia,

necessitando mais investigações para a determinação da concentração, volume e momento da injeção para cada técnica anestésica. Embora se saiba que sua ação é reversível, ainda não foi estudado o grau de injúria tecidual e a latência da resposta regenerativa em nervo periférico com a concentração de 75 UTR.

3 PROPOSIÇÃO

- Verificar se a hialuronidase 75 UTR prolonga a duração do bloqueio nervoso (ciático) se injetada antes do regresso do efeito anestésico;
- Avaliar as alterações morfológicas teciduais num período de 72 horas após a injeção de hialuronidase.

4 CASUÍSTICA- MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Casuística - material

4.1.1 Casuística (animais)

Este estudo foi realizado de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotados pelo colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), com as normas do Conselho Canadense de cuidados com animais (1993) e do Congresso Nacional Brasileiro, (1995) e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do ICB-USP registrado sob nº 045 do livro 2 (Anexo A), e pela subcomissão de Bioética de animais da FOU SP sob protocolo nº 10/07 (Anexo B). Foram utilizados 93 ratos Wistar aclimatados no Biotério do Departamento de Biologia Celular do Desenvolvimento do ICB-USP sob temperatura constante de 20-25 graus centígrados e ciclos claro/escuro de 12/12 h (alterada 6 e 18h) e ventilação controlada artificialmente. Foi utilizada ração para ratos e água *ad libitum*. Os animais foram ambientados por um período mínimo de 2 semanas e submetidos à condição experimental duas vezes antes do ensaio e os experimentos foram realizados sempre no período da tarde.

4.1.2 Critérios de inclusão

Foram incluídos:

1. Ratos heterogêneos saudáveis machos, adultos com peso médio de 404 gramas e aproximadamente 12 semanas,
2. Nascidos no Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

4.1.3 Critérios de exclusão

Foram excluídos:

1. Ratos em que houvesse sido realizado qualquer outro tipo de experimento mesmo que fosse a utilização prévia da hialuronidase.
2. Ratos doentes ou com qualquer problema sistêmico que inviabilizasse a pesquisa,
3. Ratos fora da faixa de peso de 300 a 460 gramas,
4. Ratos que durante o experimento necessitassem de volume anestésico local maior que o padronizado no experimento.

4.1.4 material de consumo e permanente:

1. Biossegurança: avental, luvas de procedimento, óculos, e forramento da bancada com papel descartável.
2. Procedimento cirúrgico (Fase II): pinça Mosquito, pinça cirúrgica, gaze, cabo para bisturi, espátula de cera 7, tesoura de ponta romba, tesoura com ponta fina, prancha de cortiça, alfinete, cronômetro, lâmina de bisturi número 15, espátula, soro fisiológico (Figuras 4.1 e 4.2)

Figura 4.1 e 4.2 – Instrumental cirúrgico (esquerda) e material utilizado durante as cirurgias (direita)

3. Assepsia e tricotomia: Álcool 70% lâmina Gillete® e gaze (Fase II).
4. Anestesia geral: Os animais foram anestesiados pela injeção intraperitoneal de 0,1 ml/100 g de peso corporal com o anestésico geral cloridrato de Ketamina (Dopalen®, Vetbrands, São Paulo, 1,6g/ 10ml de solução), e relaxante muscular cloridrato de xilasina (Anasedan®, Vetbrands, contém 2,3g/100ml de solução) e sacrificados com

deslocamento cervical antes de iniciar a cirurgia (Figuras 4.3 e 4.4).

Figura 4.3 – Cloridrato de Ketamina (Dopalen®, Vetbrands, São Paulo)

Figura 4.4 – Relaxante muscular cloridrato de Xilasina (Anasedan®, Vetbrands)

5. Material para fixação: Methacarn (60% de álcool metílico, 30% de clorofórmio, 10% de ácido acético glacial).
6. Anestesia local: Seringas hipodérmicas de insulina BD ultra-fine™ II de 1 ml com 8 mm de comprimento (5/16”) e calibre 30G (0,3mm), solução anestésica cloridrato de lidocaína 2% com adrenalina 1:100.000 em tubetes de 1,8 ml para seringa carpule (DFL Ind. Com. - lote:0612D24 – validade:dezembro/2008).

Assim, cada 1,0 ml de solução contém:

Composição	Quantidade
Cloridrato de Lidocaína	20mg
Epinefrina Base	10µg
Excipientes q.s.p. (Bissulfito de sódio, Cloreto de sódio)	1,0ml

Quadro 4.1 – Composição de 1,0 ml de solução anestésica

O soluto (Hialuronidase - Apsen Farmacêutica S/A) foi manipulado com 5 ml do solvente/veículo da H (água destilada) (Figura 4.5). Assim, cada 1,0 ml de solução continha 400 UTR/ml. Para a aplicação da injeção de 75 UTR retirou-se com seringa de insulina 0,18 ml.

Composição	Quantidade
Hialuronidase	75UTR
Água destilada para injetáveis q.s.p. (manitol injetável, cloreto de benzalcônio, cloreto de sódio e água para injetáveis)	0,18ml

Quadro 4.2 – Composição de 0,18 ml de solução de hialuronidase

Solução de água destilada para injetáveis (Apsen Farmacêutica S/A) do grupo controle (solvente/veículo da H) foi colocada em frascos codificados (Figura 4.5). Para padronizar a quantidade de solução injetada, utilizou-se 0,18 ml de solução e durante o período de realização do trabalho a solução foi armazenada a 4⁰C.

Composição	Quantidade
Água destilada para injetáveis q.s.p.(manitol injetável, cloreto de benzalcônio, cloreto de sódio e água para injetáveis)	0,18ml

Quadro 4.3 – Composição de 0,18 ml de solvente

Figura 4.5 - Frascos de Hyalozima[®] vendidos comercialmente contendo o solvente e o soluto de hialuronidase envasadas em frascos de 5,0 ml pela Apsen Farmacêutica S/A. Concentração 400 UTR/ml

4.1.5 Material permanente

4.1.5.1 Avaliação do bloqueio sensitivo

Analgesímetro fotoelétrico ref: 37215 (Ugo Basile:Biological Research Apparatus, Italia).

Figura 4.4 - Analgesímetro fotoelétrico (Ugo Basile: Biological Research Apparatus, Italia)

4.1.5.2 Microscópio Aristoplan (Leica) com câmera CCD (MTI).

4.2 Métodos

4.2.1 Fase I

4.2.1.1 técnica de bloqueio do nervo ciático

Segundo a técnica de Truant (1958), as drogas foram administradas unilateralmente na região periarticular do membro posterior, no espaço poplíteo (região que abrange um dos acessos ao trajeto do nervo ciático e dos vasos responsáveis pela inervação e irrigação sanguínea da pata traseira do animal), sendo que a perna contra-lateral serviu como controle. Foi utilizado o AL cloridrato de lidocaína (2%) com epinefrina (1:100.000) (Lidocaína 100[®] com adrenalina, DFL) e a administração de 0,14 ml (baseando-se na dose máxima recomendada para a lidocaína de 7 mg/kg segundo a ANVISA (2007) e Hass (2003). Os bloqueios foram realizados sempre pelo mesmo operador.

4.2.1.2 avaliação funcional do bloqueio nervoso periférico

Os animais foram divididos em 4 grupos

F1G1 (n=4) - Anestésico local (AL) com vasoconstritor (VC)

(determina T_H – estudo piloto);

F1G2 (n=25) - AL com VC + H à 75 UTR;

F1G3 (n=25) - AL com VC + Solv

F1G4 (n=4) - somente H à 75 UTR (para provar que a hialuronidase não tem efeito anestésico *per se*);

O protocolo deste estudo pretendia injetar a hialuronidase 10 min antes do término do efeito anestésico. Para tal, foi necessário realizar um estudo piloto em 4 ratos (F1G1) para obter a média aritmética do tempo de duração do bloqueio nervoso ciático apenas com a solução anestésica e posteriormente determinar o momento em que a hialuronidase seria injetada. Como a duração da ação anestésica desse grupo foi de 40 minutos, a hialuronidase foi injetada aos 30 minutos (T_H) do início da anestesia local (referência para o bloqueio sensitivo) no grupo experimental. O T_H também foi utilizado no grupo controle (Solv). Em outras palavras, foi avaliada a duração do bloqueio nervoso induzido pelo anestésico como piloto (n=4) no grupo F1G1. A partir destes dados, foi determinado o momento da administração da hialuronidase (T_H) (dez minutos antes do término do efeito do anestésico local) e posteriormente observado o efeito da hialuronidase no bloqueio anestésico em nervo ciático nos grupos F1G2 e F1G3.

No grupo experimental F1G2, após a instalação do bloqueio nervoso foi injetada no T_H através da mesma técnica anestésica, 0,18 ml de hialuronidase 75 UTR/ ml. No grupo F1G3, foi injetado nas mesmas condições o solvente da hialuronidase (água destilada para injetáveis), com o pH similar ao da

solução que contém o respectivo princípio ativo. Foi avaliado o bloqueio nervoso até o retorno aos valores basais de RRP em cada animal.

No grupo F1G4, foi realizada a injeção de 0,18 ml de hialuronidase a 75 UTR (Apsen Farmacêutica, Brasil) pela mesma via e técnica da anestesia local. Após a administração, a avaliação do bloqueio nervoso periférico foi realizada com o intuito de demonstrar que a hialuronidase não tem efeito anestésico *per se*.

Os valores médios (em minutos) de duração do bloqueio sensitivo dos grupos experimentais F1G2 e F1G3 foram comparados entre si e com os do grupo F1G4 em função do tempo.

Enquanto o bloqueio nervoso foi realizado em uma pata, a contralateral foi utilizada como controle sempre que necessário para a avaliação da eficácia do bloqueio sensitivo, motor e proprioceptivo. Aqueles animais que apresentaram falha do bloqueio nervoso ou necessidade de complementação foram excluídos da pesquisa.

Como o nervo ciático é um nervo misto, a avaliação do bloqueio nervoso foi realizada através de avaliação neurológica de propriocepção, função motora e sensitiva (THALHAMMER et al., 1995) foi iniciada tão logo houvesse terminado a administração do AL na pata traseira. Cada teste (motor, sensitivo e proprioceptivo) foi realizado com 1 minuto de intervalo até que as funções estivessem totalmente bloqueadas e a cada 5 minutos ao longo da recuperação destas funções. Os animais se movimentaram livremente em uma caixa aberta de fundo liso (50cm x 30cm) durante o teste.

4.2.1.2.1 *postura e andar (claudicação)*

O início do bloqueio nervoso foi avaliado observando-se a atividade locomotora espontânea, a anormalidade no andar e a dificuldade de guiar-se sozinho e claudicando, além da postura de descanso anormal da perna anestesiada (pata com plantar invertido) comparada com a maneira como o animal andava antes da administração do AL. O grau de dificuldade no andar foi avaliado através de uma escala numérica: (1) andar normal, (2) movimentação parcial (3) dificuldade de se guiar sozinho e claudicando. Foi considerada a claudicação somente com o escore 3.

O tempo de claudicação foi considerado em minutos.

4.2.1.2.2 *função motora*

Foi avaliado quando as pernas dianteiras do animal são erguidas como se quisesse alcançar algo com a pata dianteira, sem qualquer superfície para se sustentar, e a articulação tibiotarsal das patas traseiras é estendida para manter a postura (THALHAMMER et al., 1995). Neste estudo, o completo bloqueio da função motora foi definido como a ausência completa do reflexo extensor. O grau de resposta do reflexo extensor foi avaliado pela escala de valores: (1) normal (2) parcial (3) ausente e também em minutos.

4.2.1.2.3 *propriocepção*

4.2.1.2.3.1 *resposta do salto e da localização tátil*

A propriocepção foi avaliada através de dois testes utilizados em neurologia veterinária.

O rato foi mantido em postura normal e descansada, porém com o plantar dos dedos da pata flexionados com seu dorso colocado sobre a mesa. Com a propriocepção intacta, o animal imediatamente re-posiciona seus dedos do pé. Se a propriocepção está prejudicada, esta correção postural é ausente. O outro teste utilizado para testar a resposta proprioceptiva foi o teste do salto, no qual o rato foi suspenso pela parte superior do corpo e o seu peso descansou sobre o membro testado. Como seu corpo inteiro foi movido lateralmente, a resposta normal esperada do animal seria pular com o membro que sustenta o peso na direção do movimento para evitar a queda. Com o bloqueio da propriocepção, este reflexo foi ausente e a perna foi arrastada sobre a mesa. O grau de resposta ao salto será avaliado pela escala de valores: (1) normal (2) parcial (3) ausente e em minutos. Estes dados foram anotados em tabelas.

4.2.1.2.3.2 avaliação da nocicepção (hiperalgesia – teste de pressão na pata)

Para a avaliação da hiperalgesia mecânica, foi utilizado o teste de pressão na pata do rato (Analgesy-meter for Rat Paw[®], Ugo Basile, Itália) realizado de acordo com o método descrito por Randall-Selitto (1957). Neste teste, uma força em gramas (g), de magnitude crescente (16g/s), é continuamente aplicada sobre o dorso de uma das patas posteriores do rato e interrompida quando o animal apresenta reação de retirada do membro. Esse equipamento apresenta um cone com ponta romba que é colocado sobre a pata do animal (lateral da pata é innervada n. ciático). Neste modelo, o limiar de dor é representado como a força (g) necessária para a indução da reação. Com a dor induzida pelo estímulo pressórico, o animal tem o reflexo de retirada da pata (RRP) que representa o seu limiar de dor. O RRP é utilizado como indicativo do grau de tolerância do animal ao estímulo nódico (RANDALL;SELITTO, 1957) e foi considerado em gramas. Portanto o estímulo pressórico aplicado à pata dos animais aumentou em uma intensidade constante até o aparecimento do RRP, ou até o limite máximo de 250 g (cut-off) para evitar lesão tecidual, que significa que o animal está anestesiado. O membro posterior contra-lateral não anestesiado serviu como controle. Os valores obtidos no RRP antes da injeção do anestésico local foram utilizados como valores basais e como referência do término do bloqueio sensitivo.

Para reduzir o estresse, os animais foram habituados ao teste em dias anteriores ao experimento. O estímulo pressórico foi realizado e a cada

minuto até a instalação do bloqueio nervoso (latência) e a cada 5 minutos até o retorno da sensação dolorosa ao estímulo.

Para se certificar de que a ausência de retirada da pata possa ser considerada como bloqueio sensorial e não motor, o estímulo pressórico foi aplicado similarmente na face medial da pata (inervada pelo nervo safeno). Pelo uso do flexor do quadril (inervação femural), o animal poderá retirar sua perna mesmo que o nervo ciático esteja bloqueado. A resposta da porção aferente ao estímulo doloroso será considerada ausente se o animal conseguir retirar sua perna depois de aplicação do estímulo do lado medial (nervo safeno) da pata, mas não do lado lateral, innervado pelo nervo ciático (Popitz Bergez et al., 1995).

4.2.2 Fase 2 - Avaliação morfológica

Os animais foram divididos em 4 grupos:

F2G1 (n=4)- Controle - Sol da H;

F2G2 (n=4) - AL com VC + H à 75 UTR;

F2G3 (n=4) - AL com VC + Sol da H

F2G4 (n=4) – Sham - somente puntura com a agulha.

Os animais de todos os grupos foram sacrificados em quatro tempos distintos (1h, 24h, 48h e 72h, num total de 64 ratos: foram 4 grupos distintos

com 4 animais em cada um sacrificados em 4 tempos diferentes). Os animais foram sacrificados tomando-se como referencia a injeção da hialuronidase.

Os procedimentos de dissecação e extração do nervo ciático foram realizados logo após a anestesia geral. Os animais foram anestesiados pela injeção intraperitoneal de 0,4 ml de peso corporal com o anestésico geral cloridrato de Ketamina (Dopalen[®], Vetbrands) e 0,4 ml de relaxante muscular cloridrato de Xilasina (Anasedan[®], Vetbrands). Apesar destas serem as doses recomendadas, ao fazer os testes de sensibilidade, percebíamos que o animal normalmente ainda sentia dor, por isso injetávamos o dobro da dose na hora do sacrifício, e ainda assim, fazíamos o deslocamento cervical para nos certificarmos de que o animal estava morto, para que pudéssemos iniciar a cirurgia.

4.2.2.1 procedimento cirúrgico para a dissecação do nervo ciático e tecidos adjacentes

Após tricotomia na parte posterior da pata traseira dos ratos, efetuava-se um corte transversal imediatamente acima no calcanhar. A pele era divulsionada e os músculos glúteo máximo e bíceps femural eram expostos. Fazíamos um corte lateral e um medial para liberar os músculos gastrocnêmio e flexor longo; estes eram então rebatidos e o nervo tibial, uma ramificação do nervo ciático, era exposto. Um fragmento tecidual de aproximadamente 15 mm contendo a parte proximal do nervo tibial e tecidos associados (logo abaixo da fossa poplítea) era coletado para análise

morfológica. A obtenção das amostras foi realizada num período de aproximadamente 10 minutos, na presença de solução fixadora.

Previamente à seleção deste fragmento, foram realizados experimentos preliminares com injeção de solução de azul de metileno, no mesmo volume empregado para a solução anestésica, para determinação da distância de difusão da solução.

Figura 4.5 – A- Tricotomia e divulsão pela parte posterior da pata do rato. B- Tecido muscular exposto. C- Descolamento da musculatura e exposição do nervo ciático. D- corte integral da musculatura com nervo ciático exposto e suas ramificações. E- nervo ciático aparado mostrando porção a ser incluída longitudinalmente e transversalmente.

4.2.2.2 fixação, inclusão e corte do material

Os espécimes foram fixados em solução methacarn (metanol 60%, ácido acético 10% e clorofórmio 30%) durante 4 horas a 4°C. Após a fixação os espécimes foram desidratados em etanol absoluto (4 banhos de 30 minutos), diafanizados em xilol (3 banhos de 15 minutos), infiltrados (3 x 30 minutos) e incluídos em Paraplast® a 56°C (Oxford, St. Louis, Mo., USA). Foram feitos cortes de 5 µm de espessura, aderidos às lâminas utilizando-se 1% de poli-L-lisina (Sigma) e desidratados à temperatura ambiente (TA). Foram realizados cortes semi-seriados longitudinais e transversais dos espécimes, e a análise morfológica foi feita em diferentes profundidades.

4.2.2.2.1 *hematoxilina-eosina*

Para a coloração com hematoxilina e eosina (HE) foi realizada a desparafinização e re-hidratação dos cortes. Os cortes foram corados na solução de hematoxilina (30 seg), lavados em água (5 min), corados com eosina (1 min), lavados em água, desidratados em ordem crescente de etanol, diafanizados em xilol e montados em resina.

4.2.2.3 análise dos resultados

A análise morfológica foi efetuada por pelo menos um observador experiente e o grau de alteração, particularmente inflamação e lesão tecidual, foi avaliado de forma semi-quantitativa, por meio da atribuição de escores: (0)- Ausência de inflamação; (1)- Leve inflamação; (2)- Inflamação moderada e (3) – Inflamação severa (Figura 1).

4.2.3 Estudo das variáveis

- DS: duração da ação do bloqueio sensitivo (avaliação da duração em minutos e ao longo do tempo através do RRP)
- DC: duração da claudicação (duração em minutos)
- AM: avaliação do bloqueio motor (avaliação da duração em minutos e escore ao longo do tempo)
- AP: avaliação do bloqueio proprioceptivo (avaliação da duração em minutos e score ao longo do tempo)
- AI: Avaliação do grau de inflamação tecidual (escore segundo item 4.2.2.3)

Figura 1 – Alterações morfológicas decorrentes dos diferentes tratamentos – atribuição de pontos (score). (A) Pontuação 0 (zero) - fotomicrografia mostrando corte transversal de uma ramificação do nervo ciático (n), o tecido conjuntivo circunjacente (tc) e fibras musculares em corte transversal (m); (B) Pontuação 1 (um) - pequeno aumento do número de células inflamatórias no tecido conjuntivo (setas), inclusive entre as fibras musculares; (C) Pontuação 2 (dois) aumento significativo do número de células inflamatórias no tecido conjuntivo (asteriscos), ao redor do nervo e também entre as fibras musculares e da matriz extracelular. Frequentemente foi observada lesão de fibras musculares, com grande número de macrófagos associados às fibras danificadas.

DS: Foi cronometrado em minutos o tempo decorrido entre a ausência do reflexo de retirada da pata cut-off de 250g até a retirada da pata (sensação dolorosa) e valores de RRP ao longo do tempo.

DC: Foi cronometrado o tempo decorrido entre o início da claudicação (escore 3) até a volta do andar normal (escore 1)

AM: Foram anotados os escores para o teste motor a cada 5 minutos até o seu término (valor menor que 3) e cronometrada a sua duração.

AP: Foram anotados os escores para o teste proprioceptivo do salto a cada 5 minutos até o seu término (valor menor que 3) e cronometrada a sua duração.

AI: Avaliação do grau de inflamação tecidual encontrados conforme a descrição na Figura 1.

4.3 Dinâmica da experiência

4.3.1 Fase I

4.3.1.1 fase pré-anestésica

- Pesagem dos animais;
- Teste de sensibilidade (RRP) para anotação do valor basal correspondente a pressão na pata do rato sem anestesia.

4.3.1.2 fase anestésica

- Administração da anestesia local sempre na pata direita na primeira parte do experimento;
- Realização do teste segundo Randall e Selito (1957) até a ausência de sensibilidade (250g-cut off) testado a cada minuto na pata direita;
- Cronometragem dos 30 minutos após o início do bloqueio sensitivo para a aplicação da solução experimental sendo que, neste intervalo era realizado teste sensitivo, motor e proprioceptivo a cada 5 minutos;
- Após 15 dias foram realizados os mesmos procedimentos, variando-se somente o grupo testado (solvente) e a pata (esquerda).

4.3.2 Fase II

4.3.2.1 fase pré-anestésica

- Pesagem dos animais;

4.3.2.2 fase anestésica

- Aplicação da anestesia local ou do solvente;
- Aplicação da hialuronidase ou solvente ou somente a punção - dependendo do grupo testado) aos 30 minutos após início do efeito anestésico.
- Aplicação do anestésico geral, sacrifício dos ratos e retirada da peça cirúrgica a ser processada.
- Fixação, diafanização, inclusão corte dos blocos confecção e análise das lâminas.
- Todos os dados foram anotados em ficha elaborada para a pesquisa.

4.4 Estudo estatístico

Fase 1 – (Duração do bloqueio nervoso) Os valores de tempo de duração do bloqueio nervoso para cada estímulo aplicado (sensitivo, propriocepção, motor e claudicação) foram comparados através de médias $\pm$ SE, e foi realizado o teste t de Student não pareado ou ANOVA com teste auxiliar de Tukey, pois a distribuição dos dados amostrais foi normal e homogênea e o nível de significância adotado foi de 1%.

Fase 2 – (Análise morfológica) Os dados obtidos através da escala de escores foram submetidos ao teste não paramétrico Kruskal Wallis para comparação entre os grupos e o nível de significância adotado foi de 1%.

5 RESULTADOS

5.1 Dados demográficos

As médias aritméticas e os desvios padrão dos dados demográficos (idade, gênero, peso) estão dispostos na Tabela 5.1.

Tabela 5.1 – Média aritmética e desvio padrão dos dados demográficos dos 93 ratos

Dados demográficos	Média aritmética	Desvio Padrão
Idade	12 semanas (mesma ninhada)	0
Gênero	♂ ^{*1}	-----
Peso	404g	± 44g

¹ Machos

5.2 Duração do bloqueio sensitivo

Os valores absolutos da duração do efeito anestésico em nervo ciático de rato utilizando a lidocaína com adrenalina seguida da hialuronidase estão dispostos na Tabela 5.2.

Tabela 5.2 – Valores absolutos do tempo de duração anestésica (min) para o Bloqueio sensitivo

Ratos	Duração anestésica (Bloqueio sensitivo)	
	AL + Solv	AL + H
1.	66	55
2.	35	76
3.	56	100
4.	25	104
5.	30	50
6.	25	110
7.	35	75
8.	50	75
9.	65	70
10.	60	80
11.	45	70
12.	47	85
13.	46	70
14.	40	70
15.	22	80
16.	61	85
17.	40	85
18.	66	85
19.	50	75
20.	45	85
21.	60	90
22.	55	70
23.	45	85
24.	50	85
25.	50	75

*¹AL = Anestésico Local (lidocaína 2% com adrenalina 1:100. 000)

*²H = Hialuronidase

* Solv = solvente da hialuronidase

Os valores médios e o desvio-padrão estão apresentados na Tabela 5.3

Tabela 5.3 – Média aritmética e desvio padrão da duração AL para o bloqueio sensitivo (min)

	Duração do Bloqueio Sensitivo
AL	46 ± 12 min
AL + hialuronidase	79 ± 13 min

O histograma abaixo (Figura 5.1) representa os valores da média aritmética e desvio padrão da variável duração do bloqueio sensitivo com o resultado estatístico no qual se observou aumento significativo ($p < 0,01$) da duração do bloqueio sensitivo entre os grupos testados.

Gráfico 5.1 - Valores médios e desvio padrão da duração do bloqueio sensitivo utilizando anestesia local seguida de solvente (AL/Solv) ou Hialuronidase (AL/H), no qual * $p < 0,01$

A análise do bloqueio sensitivo do reflexo de retirada da pata (RRT) ao longo do tempo (gráfico 5.2) após estímulo nociceptivo demonstra que os valores obtidos apresentam comportamento paralelo do início da anestesia até o momento t (40), correspondente a 10 minutos após a injeção da hialuronidase ou solvente, e entre os tempos t(50) e t(95), houve diferença significativa ($p < 0,01$) entre os grupos. Os resultados dos valores absolutos foram submetidos ao teste ANOVA não pareado a 1% de significância para os valores de duração do bloqueio sensitivo, pois a amostra se comportou de maneira normal e homogênea.

Gráfico 5.2 - Valores médios da intensidade do Reflexo de Retirada da Pata (RRP) para análise do bloqueio sensitivo com uso da anestesia local seguida da hialuronidase (AL/H) ou Solvente (AL/Solv), ou hialuronidase isolada (H), avaliado ao longo do tempo no qual * $p < 0,01$

5.3 Duração do bloqueio motor

O histograma a seguir (gráfico 5.3), representa a duração do bloqueio motor (claudicação) no qual se observa diferença entre as médias de duração do bloqueio motor entre os grupos controle e experimental (74 ± 15 vs 58 ± 16 min, respectivamente).

Gráfico 5.3 - Valores médios e desvio padrão da Duração da Claudicação com uso da Anestesia Local seguida do Solvente (AL/Solv) ou hialuronidase (AL/H), no qual * $p < 0,01$

No gráfico 5.4, estão expostos os valores da média e desvio padrão da duração do bloqueio motor (ausência de Reflexo Extensor) no qual se observa diferença significativa entre os grupos controle e experimental (40 ± 12 vs 55 ± 14 min, respectivamente). No gráfico 5.5, a recuperação do bloqueio motor do grupo com hialuronidase apresentou tendência a ser mais lenta do que com o solvente, apresentando diferença entre os tempos t (55) a t (85). Os resultados dos valores absolutos foram submetidos ao teste t de Student (duração do bloqueio motor) e para a comparação entre os escores de intensidade de reflexo do salto utilizou-se Mann-Whitney não pareado a 1% de significância.

Gráfico 5.4 - Valores médios e desvio padrão da Duração do Bloqueio Motor (ausência do Reflexo extensor) com uso da Anestesia Local seguida do Solvente (AL/Solv) ou hialuronidase (AL/H), no qual * $p < 0,01$

Gráfico 5.5 - Valores médios do índice da ausência do reflexo extensor (bloqueio motor) após uso de anestésico local seguido de solvente (AL/Solv) ou hialuronidase (AL/H) (n=49) no qual * $p < 0,01$

5.4 Duração do bloqueio proprioceptivo

O histograma a seguir (Figura 5.6) representa os valores das médias aritméticas e desvio padrão (72 ± 17 vs 54 ± 16 min, respectivamente) do reflexo do salto (bloqueio proprioceptivo) com diferença entre os grupos testados ($p < 0,01$). O gráfico representado pela Figura 5.7, representa os valores das médias aritméticas e desvio padrão da variável reflexo do salto ao longo do tempo no grupo experimental e no grupo controle. Houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0.01$) entre os tempos t (45) e t (70). Os resultados dos valores absolutos foram submetidos ao teste t de Student (duração do bloqueio proprioceptivo) e a comparação entre os escores de intensidade de reflexo do salto utilizou-se Mann-Whitney não pareado a 1% de significância.

Gráfico 5.6 - Valores médios de desvio padrão da Duração do bloqueio proprioceptivo (ausência do Reflexo do Salto) após uso de anestésico local seguido de solvente (AL/Solv) ou hialuronidase (AL/H) (n=49) no qual * $p < 0,01$

Gráfico 5.7 - Valores médios do índice da Intensidade da ausência do Reflexo do Salto (bloqueio proprioceptivo) após uso de anestésico local seguido de solvente (AL/Solv) ou hialuronidase (AL/H) (n=49), no qual * $p < 0,01$

5.5 Descrição dos resultados morfológicos

Na análise morfológica dos tecidos observou-se a integridade das fibras musculares estriadas esqueléticas presentes na região da injeção, a integridade da ramificação do nervo ciático e o aspecto do tecido conjuntivo que circundava o nervo e as fibras musculares (Figura 2 e 3). As alterações estruturais observadas receberam uma pontuação, de acordo com o grau de inflamação e de lesão tecidual (ver Material e Métodos item 4.2.2.3).

Em todos os grupos, todos os animais apresentaram tecidos com aspecto morfológico normal, ausência de inflamação e de lesão tecidual no primeiro tempo analisado (1 h após a injeção).

Figura 2 – Alterações teciduais promovidas pelos diferentes tratamentos ao longo do período analisado (72 h). (A-D) Fotomicrografias representativas das alterações observadas em animais falso-operados (grupo *Sham*); (E-H) animais injetados apenas com a solução veículo; (I-L) animais injetados com anestésico local + solução veículo da hialuronidase e (M-P) animais injetados com solução anestésica + hialuronidase. Decurso temporal: (A, E, I, M) amostras obtidas uma hora após administração das diferentes soluções; (B, F, J, N) amostras obtidas 24 h após administração das soluções; (C, G, K, O) amostras obtidas 48 h após administração das soluções e (D, H, L, P) amostras obtidas 72 h após administração das soluções. (m) fibras musculares, (n) ramificação do nervo ciático e (tc) tecido conjuntivo. As setas apontam células inflamatórias e as cabeças de setas apontam fibras musculares em degeneração. Barra = 50 μ m.

Figura 3 – Alterações teciduais (musculares) promovidas pelos diferentes tratamentos ao longo do período analisado. (A-D) Fotomicrografias representativas das alterações observadas em animais falso-operados (grupo Sham); (E-H) animais injetados apenas com a solução veículo; (I-L) animais injetados com anestésico local + solução veículo da hialuronidase e (M-P) animais injetados com solução anestésica + hialuronidase. Decurso temporal: (A, E, I, M) amostras obtidas uma hora após administração das diferentes soluções; (B, F, J, N) amostras obtidas 24 h após administração das soluções; (C, G, K, O) amostras obtidas 48 h após administração das soluções e (D, H, L, P) amostras obtidas 72 h após administração das soluções. (m) fibras musculares e (tc) tecido conjuntivo. As setas apontam células inflamatórias e as cabeças de setas apontam fibras musculares em degeneração. Barra = 50 μ m.

No grupo falso-operado (*sham*) os tecidos apresentaram aspecto normal, com integridade preservada, em todos os períodos analisados (1 h, 24 h, 48 h e 72 h) (Figura 2 A-D, Figura 3 A-D). Ocasionalmente, um extravasamento de células sanguíneas, especialmente hemácias, foi observado, provavelmente devido ao trauma provocado pela penetração da agulha. O número de células inflamatórias observadas no tecido conjuntivo foi considerado normal e a pontuação atribuída foi 0 (zero).

No grupo injetado com o solvente da hialuronidase (Figura 2 e Figura 3 E-H) observou-se um grande aumento do número de células inflamatórias no tecido conjuntivo após 24 h, declinando progressivamente após 48 h e 72 h. O grau de lesão tecidual acompanhou o grau de inflamação, e 24 h após a injeção foram observadas fibras musculares lesadas associadas a macrófagos, plasmócitos, neutrófilos e linfócitos. Após 72 h os tecidos já apresentavam aspecto quase normal, com integridade restaurada.

No grupo injetado com solução anestésica e solvente da hialuronidase observou-se a presença de uma inflamação moderada no período entre 24 e 72 h pós-injeção. A inflamação foi observada a partir de 24 h, alcançando seu pico em 48 h (pontuação 2) e declinando ligeiramente após 72 h. As células inflamatórias mais freqüentemente observadas foram plasmócitos, linfócitos e macrófagos. A presença de neutrófilos foi pequena.

No grupo injetado com solução anestésica e hialuronidase (Figura 2 M-P) observou-se grande acúmulo de células inflamatórias e lesão tecidual a partir de 24 h após a injeção (pontuação 3). Em geral, os locais de maior dano tecidual apresentavam grande quantidade de macrófagos, principalmente associados às fibras musculares em degeneração. Observou-se também

grande quantidade de neutrófilos e poucos plasmócitos, caracterizando uma inflamação aguda. Observou-se alteração do aspecto da matriz extracelular no tecido conjuntivo, com desorganização dos feixes de fibras colágenas. Em alguns animais observou-se também extravasamento de hemácias no tecido conjuntivo. O mesmo quadro foi observado após 48 h, mas com redução do número de neutrófilos. Após 72 h observou-se redução significativa da reação inflamatória (pontuação 2) e da lesão de fibras musculares, sugerindo um progresso da reparação tecidual. Mesmo nos períodos em que a reação inflamatória foi mais intensa, não foi observada lesão de fibras nervosas ou rompimento do tecido conjuntivo denso que envolvia o nervo. Sendo assim, considerou-se que não houve lesão neural, e que a lesão tecidual ficou restrita ao tecido muscular e tecido conjuntivo.

Os resultados da mediana dos valores de escore para o índice de alteração morfológica induzida foram submetidos ao teste Mann-Whitney não pareado a 1% de significância.

Tabela 5.4 Resultado da moda e da mediana do Índice de alteração morfológica induzida pelos tratamentos Sham, Sol/Sol, AL/Sol e AL/H ao longo do tempo

Tratamento	Animal	T ₀	T ₂₄	T ₄₈	T ₇₂
Sham	1	0	0	0	0
	2	0	0	0	0
	3	0	0	0	0
	4	0	0	0	0
Moda		0	0	0	0
Mediana		0	0	0	0
Sol /SolL	1	0	3	2	1
	2	0	3	1	1
	3	0	3	1	1
	4	0		2	3
Moda		0	3	1	1
Mediana		0	3	1,5	1
AL / Sol	1	0	1	2	3
	2	0	1	1	1
	3	0	2	2	1
	4	0	3	3	2
Moda		0	1	2	1
Mediana		0	1,5	2	1,5
AL / H	1	0	3	3	2
	2	1	2	3	2
	3	0	2	1	3
	4	0		3	2
Moda		0	2	3	2
Mediana		0	2	3	2

3

tratamentos ao longo do tempo, no qual * $p < 0,01$; tratamentos: Sham; solvente/ solvente (Solv/ Solv); anestésicos locais seguido de solvente (AL/Solv); anestésicos locais seguido de hialuronidase (AL/H)

Gráfico 5.9 - Valores de Mediana do Índice de alteração morfológica pelos tratamentos ao longo do tempo, no qual * $p < 0,01$; tratamentos: Sham; solvente/ solvente (Solv/ Solv); anestésicos locais seguido de solvente (AL/Solv); anestésicos locais seguido de hialuronidase (AL/H)

	Sham imed	Sham 24 h	Sham 48 h	Sham 72 h	Sol / Sol imed	Sol / Sol 24 h	Sol / Sol 48 h	Sol / Sol 72 h	AL / Sol imed	AL / Sol 24 h	AL / Sol 48 h	AL / Sol 72 h	AL / H imed	AL / H 24 h	AL / H 48 h	AL / H 72 h
Sham imed	-	ns	ns	ns	ns	*	*	*	ns	*	*	*	ns	*	*	*
Sham 24 h		-	ns	ns	ns	*	*	*	ns	*	*	*	ns	*	*	*
Sham 48 h			-	ns	ns	*	*	*	ns	*	*	*	ns	*	*	*
Sham 72 h				-	ns	*	*	*	ns	*	*	*	ns	*	*	*
Sol / Sol imed					-	*	*	*	ns	*	*	*	ns	*	*	*
Sol / Sol 24 h						-	*	*	*	ns	ns	ns	*	ns	ns	ns
Sol / Sol 48 h							-	ns	*	ns	ns	ns	*	*	*	ns
Sol / Sol 72 h								-	*	ns	ns	ns	*	ns	*	ns
AL / Sol imed									-	*	*	*	ns	*	*	*
AL / Sol 24 h										-	ns	ns	*	ns	ns	ns
AL / Sol 48 h											-	ns	*	ns	ns	ns
AL / Sol 72 h												-	*	ns	ns	ns
AL / H imed													-	*	*	*
AL / H 24 h														-	ns	ns
AL / H 48 h															-	ns
AL / H 72 h																-

Quadro 5.1 - Resultado das comparações múltiplas entre os tratamentos nos tempos analisados obtidas a partir da análise do Kruskal-Wallis para $p < 0,001$ (*)

6 DISCUSSÃO

Neste estudo, a injeção de hialuronidase 75 UTR antes do término do efeito anestésico promoveu aumento da duração do bloqueio nervoso ciático em ratos (Gráficos 5.1 e 5.2). O mesmo foi observado em estudo anterior do nosso grupo de pesquisa, por Horliana et al. (2008), em modelo humano, utilizando o mesmo protocolo porém em bloqueio pterigomandibular. Isto demonstra reprodutibilidade dos resultados com esta metodologia em outro modelo experimental.

Como a única diferença entre o grupo controle (anestésico local seguido de solvente) e o experimental (anestésico local seguido de hialuronidase) era a presença da enzima e houve aumento da duração do bloqueio nervoso funcional, demonstrou-se que a hialuronidase foi a responsável pelo resultado. A explicação baseia-se no mecanismo de ação desta enzima, ao promover a digestão da matriz extracelular pela hidrólise do ácido hialurônico e possivelmente facilitar a difusão das moléculas remanescentes de anestésico local à membrana axonal (SARVELA; NIKKI, 1992; RIDENOUR et al., 2001; SOARES et al., 2002; HYNES; WALTON, 2000).

Esses resultados favoráveis com a hialuronidase se opõem à possibilidade aventada na literatura (BRYDON, BASTER, KERR, 1995; NATHAN et al., 1996; NICOLL et al., 1986; SARVELA; NIKIKI, 1992), de que o seu uso melhoraria somente a eficácia do anestésico local nos bloqueios peribulbares e retrobulbares (SARVELA; NIKKI, 1992;) e que, possivelmente, não teria eficácia em outro lugar do organismo (SARVELA; NIKIKI, 1992; NATHAN et al., 1996). Sarvela e Nikiki (1992) e

Nathan et al. 1996, discutiram que o uso de hialuronidase associado ao anestésico local somente seria eficaz em técnicas anestésicas indicadas para o globo ocular porque este é localizado anatomicamente em local fechado (cavidade orbital), que facilita a permanência da solução anestésica local próximo ao nervo. Já para os nervos periféricos localizados em espaço anatômico mais aberto, tal associação reduziria a duração de ação anestésica, além de difundi-lo para os tecidos adjacentes.

A primeira discussão sobre a possibilidade de utilizar hialuronidase em odontologia surgiu em 1949, e até 2001 não havia outra citação na literatura odontológica sobre o assunto. Foram Ridenour et al. (2001) que primeiramente avaliaram a eficácia anestésica da lidocaína 2% com epinefrina (1:100.000) injetada concomitantemente à hialuronidase 150 UTR/ml, ministradas numa mesma solução no bloqueio do nervo alveolar inferior em humanos. Naquele estudo, a associação de hialuronidase ao anestésico local não aumentou a incidência do sucesso da anestesia local e aumentou a ocorrência de efeitos indesejáveis como dor e trismo, levando à contra-indicação de seu uso.

É provável que no estudo de Ridenour et al. (2001), tenha ocorrido diminuição da duração da anestesia local, não somente porque a região do bloqueio do nervo alveolar inferior é mais aberta (espaço pterigóideo), mas porque a hialuronidase foi injetada concomitantemente ao anestésico local. No momento inicial da anestesia havia maior quantidade de anestésico no local, podendo se espalhar para tecidos circunvizinhos, com redução da eficácia do anestésico local, dor e trismo muscular. Foi este fato que estimulou a idéia para o novo protocolo de injetar hialuronidase não concomitantemente ao anestésico local (BORSATTI et al., 2004).

Tanto em nosso trabalho quanto no de Borsatti et al. (2004), o anestésico local e a hialuronidase foram injetados na fossa poplítea (técnica de Truant, 1958 para bloqueio no nervo ciático), considerado espaço mais aberto que a cavidade orbital, e mesmo assim o efeito anestésico foi prolongado, evidenciando que é importante o momento da injeção.

A administração de hialuronidase na concentração de 75 UTR, cerca de 10 vezes menor que a concentração de 800 UTR utilizada por Borsatti et al. (2004), ainda foi capaz de promover aumento da eficácia do bloqueio funcional, provavelmente por ser capaz de facilitar suficientemente o acesso de moléculas remanescentes de anestésico local para o feixe nervoso. Ainda há necessidade de esclarecer qual a concentração mínima eficaz de hialuronidase nesse protocolo para prolongar a ação anestésica.

Na literatura em anestesiologia oftalmológica fica evidente que ainda não há consenso quanto à concentração e volume de hialuronidase a ser administrado (BRYDON; BASLER; KERR, 1995; DEMPSEY; BARRETT; KIRBY, 1997; KALLIO; PALOHEIMO; MAUNUKSELA, 2000). Em nosso estudo, foi empírica a determinação da concentração, do volume de solução de hialuronidase e o momento da sua injeção, próximo ao término do efeito anestésico. Sendo assim, a variação destes parâmetros poderá ser testada futuramente.

Para obter resultado favorável, este protocolo pressupõe que a hialuronidase deva ser injetada enquanto houver um número suficiente de moléculas de anestésico próximo ao feixe nervoso, devido à relação intraneural de anestésico ditar o efeito intrínseco da droga e ter proporção inversa ao longo do tempo (Poptiz-Bergez et al., 1995).

Segundo Poptiz-Berger et al. (1995), a quantidade intraneural de anestésico local (lidocaína à 1%) durante o bloqueio completo do nervo ciático de ratos foi três vezes aquela do momento da recuperação do bloqueio funcional (bloqueio parcial). Para o bloqueio completo ocorrer, seria necessária uma concentração intraneural correspondente a aproximadamente 1,6% do volume injetado; os autores afirmam que existe muito anestésico local ao redor das fibras nervosas durante o bloqueio parcial.

Em nosso estudo, a hialuronidase injetada ainda durante o bloqueio completo, provavelmente teve tempo hábil (latência de ação) para facilitar a redistribuição anestésica e manter o nível intraneural mínimo necessário para ocorrer o bloqueio nervoso. Há necessidade de estudos diretos da relação intraneural de anestésico local após o uso da hialuronidase para comprovar esse redirecionamento molecular, uma vez que o bloqueio anestésico foi prolongado.

Os resultados promissores do bloqueio sensitivo encontrados nesse estudo e no de Horliana et al. (2008) têm implicações clínicas, uma vez que a hialuronidase facilita o reaproveitamento das moléculas residuais da injeção inicial do anestésico local, assim sendo, evitam-se injeções adicionais que poderiam induzir complicações sistêmicas.

Em nosso estudo, a presença de hialuronidase também aumentou a duração do bloqueio motor (Gráficos 5.3, 5.4 e 5.5) e o proprioceptivo (Gráficos 5.6 e 5.7) com a lidocaína em nervo ciático de ratos. Segundo Gokin, Phillip e Strichartz (2001) e Malamed (2001), a concentração de anestésico local necessária para ocorrer o bloqueio de condução varia com o calibre das fibras nervosas. Pelo bloqueio nervoso diferencial, devido ao maior calibre das fibras motoras ($A\alpha$ larga; $A\beta$ e $A\gamma$, fina; mielinizadas) há necessidade de maior quantidade de anestésicos locais que

em fibras sensitivas (C, amielínica; A delta, fina, mielínica) para se obter o bloqueio de condução. Embora o bloqueio sensitivo-motor seja uma característica mais evidente de anestésico de ação prolongada (ex. bupivacaína) (Malamed, 2001), em nosso estudo foi observado também com a lidocaína 2% (ação intermediária). Isto indica que a hialuronidase provavelmente facilitou a difusão do anestésico local suficientemente para prolongar o bloqueio de condução também em fibras nervosas mais calibrosas.

A recuperação do bloqueio do nervo ciático foi completa em todos os animais estudados, sem qualquer sinal aparente de toxicidade neuronal ou manifestação de toxicidade sistêmica, analisada até 24 horas após a realização da pesquisa.

Conforme esperado, a ausência de bloqueio sensitivo no grupo em que foi injetada apenas hialuronidase sem prévia injeção de anestésico local demonstra que esta não induz ao bloqueio da condução nervosa.

Pelo fato da hialuronidase agir sobre as barreiras anatômicas, facilitando a difusão do anestésico local, altera, portanto, a farmacocinética e farmacodinâmica do agente anestésico local.

Em nosso estudo, assim como no de Horliana et al. (2008), foi utilizado anestésico local associado ao vasoconstritor epinefrina, a fim de reduzir a difusão do anestésico para a circulação sangüínea e reduzir a possibilidade de toxicidade sistêmica (MALAMED, 2001; NAFTALIN; YAGIELA, 2002). É importante ressaltar que, embora a epinefrina e a hialuronidase pareçam ter efeitos opostos, já que uma impede a difusão do anestésico local e a outra facilita, os locos de ação desses agentes são diferentes, determinando o primeiro, maior dificuldade da entrada do fármaco na circulação geral, pelo seu efeito vasoconstritor local (NAFTALIN;

YAGIELA, 2002), ao passo que a hialuronidase determina maior permeabilidade do tecido conjuntivo (WATSON, 1993).

Permanece incerta a ação da hialuronidase sobre a permeabilidade capilar, mas é preciso salientar que o efeito mais importante da hialuronidase refere-se a um aumento da difusão das drogas pelos tecidos (WATSON, 1993). Portanto, surgiu a dúvida se com a hialuronidase ocorre difusão excessiva do AL para a circulação, aumentando o risco de toxicidade. No estudo de Nathan et al. (1996), foi demonstrado em humanos que a hialuronidase (em bloqueio peribulbar) não aumentou a concentração plasmática de anestésico local, mas apenas reduziu a latência desse pico de concentração (T_{max}).

Até o momento, apenas o estudo de Seiffer (1950) realizou uma análise toxicológica, pela avaliação morfológica de algumas vísceras de coelhos (fígado, rins, etc.) após utilização de dose tóxica da hialuronidase. Contudo, não existem estudos para comparação com nossos resultados, analisando histologicamente as reações teciduais frente à aplicação da enzima hialuronidase 75 UTR após o anestésico local.

Quanto à alteração morfológica induzida pelos tratamentos no local da injeção, em todos os grupos, todos os animais apresentaram tecidos com aspecto morfológico normal, ausência de inflamação e de lesão tecidual no primeiro tempo analisado (1 h após a segunda injeção). Da mesma maneira, em todos os períodos analisados os animais do grupo falso-operado (*Sham*) apresentaram integridade tecidual. Ocasionalmente observou-se um extravasamento de células sanguíneas, especialmente hemácias, devido ao trauma provocado pela penetração da agulha. Este trauma, no entanto, não foi suficiente para promover uma reação inflamatória.

No grupo injetado com solução veículo para hialuronidase observou-se um grande aumento do número de células inflamatórias no tecido conjuntivo após 24 h, declinando progressivamente após 48 h e 72 h. O grau de lesão tecidual acompanhou o grau de inflamação, e 24 h após a injeção foram observadas fibras musculares lesadas associadas a macrófagos, plasmócitos, alguns neutrófilos e linfócitos. Após 72 h os tecidos já apresentavam aspecto quase normal, com integridade restaurada, sugerindo que a lesão inicial não foi extensa. A causa desta reação inflamatória pode ter sido o trauma promovido pela injeção de um volume líquido no tecido, ou a composição do veículo (cloreto de benzalcônio, manitol, etc.), ou ambos.

No grupo injetado com solução anestésica e solução veículo para hialuronidase observou-se a presença de uma inflamação moderada no período entre 24 e 72 h pós-injeção. A inflamação foi observada a partir de 24 h, alcançando seu pico em 48 h e declinando ligeiramente após 72 h. As células inflamatórias mais freqüentemente observadas foram plasmócitos, linfócitos e macrófagos. A presença de neutrófilos, que caracterizam inflamação aguda, foi pequena. Estes resultados corroboram os resultados obtidos por Kalichman et al. (1993) que já haviam relatado lesão tecidual promovida pela injeção de lidocaína isolada próximo ao nervo ciático de rato, havendo redução da injúria tecidual em tecido perineural em cerca de 2 dias.

Os animais que receberam solução anestésica e hialuronidase apresentaram lesão tecidual e grande acúmulo de células inflamatórias, principalmente macrófagos e neutrófilos, a partir de 24 h após a injeção. A presença de neutrófilos sugere um prolongamento da fase de inflamação aguda, provavelmente devido a uma maior

lesão tecidual promovida pela enzima. Observou-se alteração do aspecto da matriz extracelular no tecido conjuntivo, com desorganização dos feixes de fibras colágenas. Em alguns animais observou-se também extravasamento de hemácias no tecido conjuntivo. Estes resultados sugerem que a hialuronidase promoveu uma digestão parcial da matriz extracelular, promovendo uma desorganização estrutural do tecido. É possível que esta digestão possa ter proporcionado acesso da solução anestésica residual à fibra nervosa. Nos períodos subseqüentes (48 e 72 h) houve redução gradual da reação inflamatória e da lesão tecidual, caracterizando um progresso da reparação tecidual.

De maneira geral, sabe-se que após lesão da musculatura esquelética ocorre um influxo de neutrófilos para a região no período de 1 a 6 horas pós-injúria (TIDBALL, 1995). Estas células promovem a inflamação por liberação de citocinas que podem atrair e ativar outras células inflamatórias, podendo também amplificar a injúria muscular devido à liberação de radicais livres de oxigênio, que danificam membranas celulares e promovem morte celular. No período de 24 a 72 horas após a injúria ocorre influxo de macrófagos, que fagocitam restos de fibras musculares em degeneração. Há ainda uma outra população de macrófagos que são recrutados mais tardiamente para a região e que aparentemente estão associados à regeneração muscular. Durante os primeiros dias após a lesão observa-se, portanto, a presença do infiltrado inflamatório, espaços vazios gerados pela degeneração celular e fibras musculares hipercontraídas, em processo de degeneração (TIDBALL, 1995).

É importante ressaltar que, mesmo nos períodos em que a reação inflamatória foi mais intensa, não foi observada lesão de fibras nervosas ou rompimento do tecido conjuntivo denso que envolvia o nervo. Sendo assim, considerou-se que não houve lesão neural, e que a lesão tecidual ficou restrita ao tecido muscular e tecido conjuntivo. O fato de que sempre houve recuperação funcional plena dos animais após anestesia local com ou sem hialuronidase comprova a ausência de lesão neural.

Pelo exposto, a hialuronidase utilizada antes da recuperação do bloqueio nervoso da lidocaína com epinefrina em nervo periférico, utilizada neste estudo, mostrou-se vantajosa quanto à propriedade noceptiva e poderá vir a ser uma alternativa racional para procedimentos que requerem complementação analgésica, como demonstrado clinicamente no estudo de Horliana et al. (2008).

7 CONCLUSÕES

Nestas condições experimentais, pode-se concluir que:

- A hialuronidase 75 UTR prolonga a duração de ação anestésica local quando injetada isoladamente antes da regressão do bloqueio de condução do nervo ciático de rato;
- Em todos os grupos analisados, exceto o grupo falso-operado, observou-se reação inflamatória após as injeções. Esta inflamação foi mais acentuada no grupo hialuronidase, que mostrava sinais de regressão após 72 horas. É possível que o mecanismo de ação da hialuronidase envolva a desorganização do tecido conjuntivo na região da injeção, facilitando a difusão da solução anestésica residual até o nervo.

REFERÊNCIAS¹

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Molecular biology of the cell. 4^aed. New York: Garland Publishing; 2004.

ANVISA. www.anvisa.gov.br/servicos/saude/control/alertas/Alertas/notatecnica2.pdf
Acesso em 28/02/2007.

Barr J, Kirkpatrick N, Dick A, Hawksworth G, Noble DW. An evaluation of two concentrations of hyaluronidase on plasma concentrations of lidocaine after peribulbar anaesthesia. Br J Anaesth 1995;75(6):692-7.

Borsatti MA, Simonetti MPB, Rocha RG, Penha SS. Hyaluronidase induce long-term analgesia of the EMB S75:R25: a study in the sciatic nerve of the rat in vivo [abstract Hatton 10]. Bras Oral Res 2004;18Suppl:18.

Brydon CW, Basler M, Kerr MB. An evaluation of two concentrations of hyaluronidase for supplementation of peribulbar anaesthesia. Anaesthesia 1995;50(11):998-1000.

Canadian Council on Animal Care. 4 Guide to the care and use of experimental animals. v.1 e v.2. 1993.

Cohen M, Klein E, Geiger B, Addadi L. Organization and adhesive proprieties of the hyaluronan pericellular coat of chondrocytes and epithelial cells. Biophys J 2003; 85:1996-2005.

Congresso Nacional Brasileiro. Anteprojeto de Lei nº 1.153/ 95 do Congresso Nacional sobre o uso de animais de laboratório em ensino e pesquisa. 1995 (Biblioteca do ICB).

Crawford M, Kerr WJ. The effect of hyaluronidase on peribulbar block. Anaesthesia 1994;49(10):907-8.

Dempsey GA, Barrett PJ, Kirby IJ. Hyaluronidase and peribulbar block. Br J Anaesth 1997;78(6):671-4.

¹ De acordo com Estilo Vancouver. Abreviatura de periódicos segundo base de dados MEDLINE. *ials* on the infecting power of vaccine virus. *J Exp Med* 1929;50:327-40.

Farr C, Menzel J, Seeberger J, Schweigle B. Clinical pharmacology and possible applications of hyaluronidase with reference to Hylase "Dessau". *Wien Med Wochenschr* 1997;147(15):347-55.

Gao F, Budd AJ. Venous levels of lignocaine and bupivacaine after peribulbar block. *Anaesthesia* 1996;51(12):1109-12.

Gokin AP, Phillip B, Strichartz GR. Preferential Block of small myelinated sensory and motor fibers by lidocaína 2001; *Anesthesiology* 2001;95:1441-54.

Hamada S, Devys JM, Xuan TH, Ganem S, Sahel JA, Hérán F. Role of hyaluronidase in diplopia after peribulbar anesthesia for cataract surgery. *Ophthalmology* 2005;112(5):879-82.

Hass DA. An update on Local Anesthetics in dentistry. *J Dent Assoc* 2003; 68(9):546-51.

Hechter O. Reconstitution of the dermal barrier to fluid diffusion following administration of hialuronidase. *Proc Soc Exper Biol Med* 1948;67:343-4.

Horliana ACRT, Brito MA, Perez, Simonetti MP, Rocha RG, Borsatti MA. Hyaluronidase increases the duration of mepivacaine in inferior alveolar nerve blocks. *J Oral Maxillofac Surg* 2008;66(2):286-90.

Hynes WL, Walton SL. Hyaluronidases of gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol Lett* 2000;183(2):201-7.

Junqueira LCU, Carneiro J. *Biologia celular e molecular*. 7^aed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000.

Kalichman MW, Moorhouse DF Powell HC, Henry C, Myers R. Relative Neural toxicity of local anesthetics *J Neuropathol Exp Neurol*. 1993;52(3):234-40.

Kallio H, Paloheimo M, Maunuksela EL. Hyaluronidase as an adjuvant in bupivacaine-lidocaine mixture for retrobulbar/peribulbar block. *Anesth Analg* 2000;91(4):934-7.

Malamed SF. Manual de anestesia local. 5^a.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2001.

Mantovani C, Bryant AE, Nicholson G. Efficacy of varying concentrations of hyaluronidase in peribulbar anaesthesia. *Br J Anaesth* 2001;86(6):876-8.

Meyer K. Hyaluronidases. In: Boyer PD. The enzymes. New York: Academic Press; 1971. cap.3, p. 307-20.

Naftalin LW, Yagiela JA. Vasoconstrictor: indications and precautions. *Dent Clin N Am* 2002;46(4):733-46

Nathan, Benrhaïem M, Lofti H, Debord J, Rigaud G, Luchatre G, et al. The role of hyaluronidase on lidocaine and bupivacaine pharmacokinetics after peribulbar blockade. *Anesth Analg* 1996;82(5):1060-4.

Nicoll JM, Treuren B, Acharya PA, Ahlen K, James M. Retrobulbar anaesthesia: the role of hyaluronidase. *Anesth Analg* 1986;(12):1324-8.

Popitz-Bergez FA, Leeson S, Strichartz GR, Thalhammer JG. Relation between functional deficit and intraneural local anesthetic during peripheral nerve block. *Anesthesiology* 1995;83(3):583-92.

Randall LO, Sellito JJ. A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissue. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 1957;111(4):409-19

Ridenour S, Reader A, Beck M, Weaver J. Anesthetic efficacy of a combination of hyaluronidase and lidocaine with epinephrine in inferior alveolar nerve blocks. *Anesth Prog* 2001;48(9):9-15.

Salmen S. Inhibitors of bacterial and mammalian hyaluronidase: synthesis and structure-activity relationships. Regensburg: University of Regensburg; 2003.

Sarvela J, Nikki P. Hyaluronidase improves regional ophthalmic anaesthesia with etidocaine. *Can J Anaesth* 1992;39(9):920-4.

Seifter J. Studies on the pharmacology and toxicity of testicular hyaluronidase. *Ann N Y Acad Sci* 1950;52:1141-55.

Soares LM, Helayel PE, Conceição DB, Oliveria Filho GR. Peribulbar block with the association of 0,5% enantiomeric mixture of bupivacaine (S75-R25) and 2% lidocaine: effects of hyaluronidase addition. *Rev Bras Anesthesiol* 2002;52(4):420-5.

Thalhammer JG, Vladmirova M, Bershadsky B, Strichartz GR. Neurologic evaluation of the rat during sciatic nerv block with lidocaine. *Anesthesiology* 1995;82(4):1013-25.

Tidball JG, Inflammatory process in muscle injury and repair. *Am J Physiol Regul Integr Comp Phisiol* 2005;288:R345-53.

Watson D. Hyaluronidase. *Br J Anaesth* 1993;71(3):422-5.

Truant AP Studies on the pharmacology of meprylcaine (oracaine), a local anesthetic. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 1958;115(4):483-97.

ANEXO A - Parecer de Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa – Subcomissão de Bioética de Animais da FOUSP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE ODONTOLOGIA

PARECER DE APROVAÇÃO

PROTOCOLO nº 10/07

Com base em parecer de relator, o Comitê de Ética em Pesquisa – Subcomissão de Bioética de Animais da FOU SP, APROVOU o protocolo de pesquisa **"Avaliação morfológica do reparo tecidual após o uso de hialuronidase em nervo ciático de rato e alteração da relação intraneural de anestésico local pelo uso da hialuronidase"**, de responsabilidade dos pesquisadores Anna Carolina Ratto Tempestini Horliana, sob orientação da Professor(a) Doutor(a) Maria Aparecida Borsatti.

Cabe ao responsável enviar relatórios referentes ao andamento da pesquisa após 06 (seis) meses e 01(um) ano desta data, bem como cópia do trabalho em "cd" ou "disquete" ao finalizá-lo, conforme legislação vigente.

São Paulo, 02 de julho de 2007

Prof. Dr. **CELSO LUIZ CALDEIRA**
PRESIDENTE DA SUBCOMISSÃO DE BIOÉTICA DE ANIMAIS DA FOU SP

Av. Prof. Lineu Prestes, 2227 – Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira" CEP 05508-000
São Paulo – SP - Diretoria Telefax: (011)3091-0062/3091-7817/3091-7860 - Compras (011) 3091-7825
Impressão: S.D.O.

ANEXO B - Parecer de Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – telefax : (55) (011) 3091.7438
e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **045** nas fls. **45** do livro **2** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade de **Maria Aparecida Borsatti** Coordenador(a) da Linha de pesquisa **"Avaliação morfológica do reparo tecidual após o uso de hialuronidase em nervo ciático de rato e alteração da relação intraneural de anestésico local pelo uso da hialuronidase"** do qual participou(aram) o(s) alunos **Anna Carolina Ratto Tempestini Horliana, Marcelo Lazzaron Lamers e a pesquisadora Marinilce Fagundes dos Santos**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela **COMISSAO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA)** em **10.05.2007**.

São Paulo, 10 de maio de 2007.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEEA - ICB/USP

Prof. Dra. PATRICIA GAMA
Secretária -Suplente
CEEA – ICB/USP