AÇÃO DA PROTEÍNA SERICINA NO REPARO NERVOSO INICIAL, ASSOCIADA OU NÃO À NATAÇÃO, EM RATOS WISTAR

THE ACTION OF SERICIN PROTEIN ON INITIAL NERVE REPAIR, ASSOCIATED OR NOT WITH SWIMMING IN WISTAR RATS

ACCIÓN DE LA PROTEÍNA SERICINA EN LA REPARACIÓN NERVIOSA INICIAL, ASOCIADA O NO A LA NATACIÓN, EN RATONES WISTAR

Jean Carlos Debastiani,[1] André Junior Santana,[1] Alana Ludemila de Freitas Tavares,[1] Juliana Roncini Gomes da Costa,[1] Luiz Gustavo Vasconcelos Machado,[1] Regina Inês Kunz,[1] Lucinéia de Fátima Chasko Ribeiro,[1] Rose Meire Costa,[1] Gladson Ricardo Flor Bertolini[1]

1. Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Unioeste), Laboratório de Estudo das Lesões e Recursos Fisioterapêuticos, Laboratório de Biologia Estrutural e Funcional, Cascavel, PR, Brasil.

RESUMO

Objetivo: Analisar os efeitos do tratamento da sericina, associada ou não ao exercício de natação com sobrecarga, sobre o reparo inicial do nervo isquiático após compressão em ratos Wistar. Métodos: Foram separados 40 animais em cinco grupos, sendo eles: controle; lesão; lesão-sericina; lesão-natação e lesão-sericina-natação. Durante o procedimento de axonotmese, a sericina foi aplicada sobre a lesão nos grupos lesão-sericina e lesão-sericina-natação. Os grupos lesão-natação e lesão-sericina-natação realizaram o exercício de natação com sobrecarga durante cinco dias, iniciando no terceiro dia pós-operatório (PO), sendo avaliados quanto à função, nocicepção e alodinia. A eutanásia foi realizada no oitavo dia PO, sendo que dois fragmentos do nervo foram coletados e preparados para análise quantitativa e descritiva em relação a quantidade total de fibras nervosas viáveis, não viáveis, diâmetro da fibra nervosa, do axônio e espessura da bainha de mielina. Resultados: No índice funcional isquiático não houve melhora significativa até o oitavo dia. O teste de Von Frey na cicatriz cirúrgica e fáscia plantar indicaram redução do quadro álgico e alodinia para os grupos lesão-natação e lesão-sericina-natação. A análise morfológica apresentou características semelhantes nos grupos lesão-sericina, lesão-natação e lesão-sericina-natação, porém houve diferença significativa das fibras nervosas não viáveis menores nos grupos lesão-natação e lesão-sericina-natação em relação aos demais. Conclusões: A proteína sericina isolada apresentou características pró-inflamatórias. Houve melhora da alodinia e diminuição do quadro álgico no local da incisão cirúrgica relacionadas a possível efeito aquático. Não houve aceleração do reparo nervoso no oitavo dia após a lesão. ***Nível de Evidência I; Estudo clínico randomizado de alta qualidade com ou sem diferença estatisticamente significante, mas com intervalos de confiança estreitos.***

Descritores: Materiais biocompatíveis; Compressão nervosa; Natação; Seda.

ABSTRACT

Objective: To analyze the effects of sericin treatment, associated or not with swimming with load exercise, on initial sciatic nerve repair after compression in Wistar rats. Methods: Forty animals were divided into five groups: control, injury, injury-sericin, injury-swimming and injury-sericin-swimming. During the axonotmesis procedure, the sericin was applied to the injury-sericin and injury-sericin-swimming groups. The injury-swimming and injury-sericin-swimming groups performed the swimming with load exercise for five days, beginning on the third postoperative day (PO), and were evaluated for function, nociception and allodynia. Euthanasia was performed on the 8th PO day and fragments of the nerve were collected and prepared for quantitative and descriptive analysis in relation to the total amount of viable nerve fibers and non-viable nerve fibers, nerve fiber diameter, axon diameter and myelin sheath thickness. Results: There was no significant improvement in the sciatic functional index up to the eighth day. The Von Frey test of the surgical scar and plantar fascia indicated a reduction in pain and allodynia for the injury-swimming and injury-sericin-swimming groups. The morphological analysis presented similar characteristics in the injury-sericin, injury-swimming and injury-sericin-swimming groups, but there was a significant difference in the number of smaller non-viable nerve fibers in the injury-swimming and injury-sericin-swimming groups as compared to the others. Conclusions: Isolated sericin protein presented proinflammatory characteristics. There was improvement of allodynia and a decrease in the pain at the site of the surgical incision, possibly linked to an aquatic effect. There was no acceleration of nerve repair on the eighth day after the injury. ***Level of Evidence I; High quality randomized clinical trial with or without statistically significant difference, but with narrow confidence intervals.***

Keywords: *Biocompatible materials; Nerve crush; Swimming; Silk.*

RESUMEN

Objetivo: Analizar los efectos del tratamiento de la sericina, asociada o no al ejercicio de natación con sobrecarga, sobre la reparación inicial del nervio isquiático después de compresión, en ratones Wistar. Métodos: Se separaron 40 animales en cinco grupos, siendo: control; lesión; lesión-sericina; lesión-natación y lesión-sericina-natación. Durante el procedimiento de axonotmesis, la sericina fue aplicada sobre la lesión en los grupos lesión-sericina y lesión-sericina-natación. Los grupos lesión-natación y lesión-sericina-natación realizaron el ejercicio de natación con sobrecarga durante cinco días, iniciándose en el tercer día postoperatorio (PO), siendo evaluados cuanto a la función,

Estudo realizado na Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Unioeste), Cascavel, PR, Brasil.
Correspondência: Gladson Ricardo Flor Bertolini. Laboratório de Estudo das Lesões e Recursos Fisioterapêuticos da Unioeste. Rua Universitária, 2069, Jardim Universitário 85819-110, Cascavel, PR, Brasil. gladsonricardo@gmail.com

CC BY

http://dx.doi.org/10.1590/S1808-185120191804181924

Recebido em 27/06/2017 aceito em 07/06/2019

nocicepción y alodinia. La eutanasia fue realizada en el octavo día PO, siendo que dos fragmentos del nervio fueron recolectados y preparados para análisis cuantitativo y descriptivo, con relación a la cantidad total de fibras nerviosas viables, no viables, diámetro de la fibra nerviosa, del axón y espesor de la vaina de mielina. Resultados: En el índice funcional isquiático no hubo mejoría significativa hasta el octavo día. La prueba de "Von Frey" en la cicatriz quirúrgica y la fascia plantar indicaron reducción del cuadro álgico y alodinia, para los grupos lesión-natación y lesión-sericina-natación. El análisis morfológico presentó características similares en los grupos lesión-sericina, lesión-natación y lesión-sericina-natación, pero hubo diferencia significativa de las fibras nerviosas no viables menores en los grupos lesión-natación y lesión-sericina-natación con relación a los demás. Conclusiones: La proteína sericina aislada presentó características proinflamatorias. Hubo mejora de la alodinia y disminución del cuadro álgico en el lugar de la incisión quirúrgica, relacionadas al posible efecto acuático. No hubo aceleración de la reparación nerviosa en el octavo día después de la lesión. ***Nivel de Evidencia I; Ensayo clínico aleatorizado de alta calidad con o sin diferencia estadísticamente significativa, pero con intervalos de confianza estrechos.***

Descriptores: *Materiales biocompatibles; Compresión nerviosa; Natación; Seda.*

INTRODUÇÃO

Lesões nervosas periféricas (LNPs) são frequentes principalmente as traumáticas, como compressão, esmagamento e estiramento, o que implica em alterações na função motora voluntária, levando a morbidades, incapacidades nas atividades de vida diária e laborais. O tratamento geralmente é longo, com consequente aumento dos custos para os sistemas de saúde público e previdenciário,[1] tendo maior incidência em adultos jovens.[2]

Diversas abordagens terapêuticas são utilizadas no tratamento de LNPs,[3] havendo benefícios do exercício físico na regeneração nervosa periférica, como o aumento da força, resistência e mobilidade,[4,5] além da melhora na mielinização e desenvolvimento das fibras nervosas.[6]

Dentre os exercícios, os em ambiente aquático apresentam bom prognóstico, revelando melhora na recuperação funcional após lesão do nervo isquiático,[5,6] favorecem a remoção de mielina degenerada,[7] a recuperação do diâmetro axonal,[8] além de estimular o crescimento e desenvolvimento de novas células e aumentar a presença de fatores de crescimento neuronais.[9] Teodori et al.,[5] relatam que a natação aplicada nas fases agudas e tardias, em modelos de compressão nervosa, revelou uma aceleração no processo de regeneração do nervo isquiático.

Contudo, outras pesquisas demonstraram atrasos na recuperação funcional com este tipo de exercício,[8] ou nenhum efeito sobre a força muscular,[10] e pelo processo de regeneração lento, problemas como a reinserção nervosa inadequada e ineficiência da função nervosa são possíveis, gerando impactos diretos no resultado final.[1] Isto denota a necessidade de investigação sobre o efeito do exercício físico no reparo nervoso, bem como a associação deste com substâncias auxiliares do processo.

Nesse sentido, o biopolímero da seda sericina, apresenta potencial uso em biomedicina. Esta proteína, produzida pela lagarta bicho-da-seda (*Bombyx mori*) e, juntamente com a fibroína, compõem o casulo de seda.[11] A sericina demonstrou influência na regeneração de tecido cartilaginoso, favorecendo a proliferação celular,[12] acelerando a regeneração de tecido cutâneo,[13] atuando no processo de cicatrização e podendo levar a menores níveis de mediadores inflamatórios.[14,15] No reparo neuronal Wang et al.,[16] demonstraram seu efeito neuroprotetor, promovendo o crescimento *in vitro* de neurônios. Além disso, outros potenciais efeitos tornam a sericina foco de interesse em diversos segmentos, visto as possibilidades de uso.

Desta maneira, a sericina apresenta amplas possibilidades de aplicações, como no reparo de LNPs, e assim, este estudo objetivou analisar os efeitos do tratamento da sericina, associada ou não a exercício de natação, com sobrecarga, sobre o reparo do nervo isquiático após compressão, em ratos Wistar no período inicial do reparo nervoso.

MATERIAIS E MÉTODOS

Caracterização da amostra

A pesquisa seguiu todos os procedimentos experimentais e foi aprovada pelo Comitê de Ética em Uso Animal. Foram utilizados 40 ratos da linhagem *Wistar*, com 8 $\pm$ 2 semanas de idade e peso entre 200 e 300 gramas, mantidos em ambiente controlado, ciclo claro-escuro de 12 horas, temperatura ambiente de 25 + 1ºC, água e ração ad libitum. Estes animais foram separados, equitativa e aleatoriamente em cinco grupos: controle (CON), não realizou nenhum tipo de procedimento; lesão (LES), realizado protocolo de lesão nervosa isquiática e não recebeu nenhum tipo de tratamento; lesão-sericina (LSER), protocolo de lesão nervosa isquiática e tratado com sericina; lesão-natação (LNAT), lesão nervosa isquiática e tratamento com natação; e lesão-sericina-natação (LSRNT), submetido à lesão nervosa, tratamento com sericina e posteriormente natação.

Todos os animais foram submetidos às mesmas avaliações ao longo do período experimental.

Lesão nervosa isquiática e aplicação da proteína sericina

Prévio ao procedimento cirúrgico, os animais foram pesados e anestesiados com cloridrato de quetamina (95 mg/Kg) e cloridrato de xilazina (12 mg/Kg) via intraperitoneal. Na sequência, o animal foi posicionado em decúbito ventral, com abdução dos quatro membros, e preparada a região cirúrgica do membro pélvico direito. A incisão foi realizada paralelamente às fibras musculares do bíceps femoral, possibilitando a exposição do nervo isquiático. A axoniotmese foi realizada com auxílio de uma pinça hemostática, onde o nervo isquiático foi comprimido durante 30 segundos, utilizando-se como referência de pressão o segundo dente da cremalheira.[17] A compressão nervosa de todos os animais foi realizada, pelo mesmo pesquisador. Em seguida foi feita sutura epineural na região lesionada, com fio de nylon 10.0, possibilitando a localização exata da lesão e coleta dos segmentos do nervo no momento da eutanásia.[3]

Após, os animais de LSER e LSRNT receberam a aplicação de 100 μL de sericina hidrolisada, por animal, por meio de uma única aplicação.[18] Em seguida, foi realizado o fechamento cirúrgico por camadas, e realocação do nervo nas mesmas condições pré-cirúrgicas.

A sericina foi obtida diretamente de casulos de *B. mori*, fornecidos pela indústria sericícola BRATAC Silk do Brasil (Londrina, Paraná, Brasil). Os casulos foram cortados em fragmentos de aproximadamente 1 cm^2 e submetidos ao processo de extração por alta pressão e alta temperatura em autoclave (CS 30 – Prismatec, Itu, SP, Brasil), a 120º C e pressão de 1 kgf/cm^2, por 1 hora.[19] Não houve adição de produtos químicos durante a extração e foi utilizado 100 mL de água destilada para cada 6 g de casulo. A fibroína foi separada utilizando-se uma peneira de 18 malhas, a solução de sericina foi congelada (-20ºC) e utilizada na forma hidrolisada durante o experimento.

Natação

O exercício de natação foi realizado com sobrecarga de 10% do peso corporal do animal, durante 15 minutos. A carga foi composta por pesos de chumbo, fixados na região abdominal com cinta de velcro, visando não interferir na mobilidade durante o exercício. O protocolo iniciou no 3º dia após a realização da axoniotmese e mantido diariamente até o 7º dia, sendo realizada a eutanásia dos animais no 8º dia. A carga foi determinada diariamente pela pesagem prévia dos animais.

Nos dez dias que antecederam o procedimento cirúrgico, todos os animais foram aclimatados ao protocolo de natação e aos testes. Os animais de CON, LES e LSER, não realizaram o protocolo de

exercício, porém foram submetidos ao ambiente aquático por 10 segundos, nos mesmos dias do treino estabelecido de LNAT e LSRNT, simulando o estresse do ambiente aquático.[20] Foi utilizado um tanque oval, com 60 cm de profundidade e capacidade para 200 L, e temperatura de 32 ± 1ºC.

Índice funcional do isquiático (IFC)

Para mensurar o índice funcional do isquiático, foi utilizada uma esteira acoplada a um sistema de imagem (Insight®), que obteve dados das pegadas dos animais. As medidas de: comprimento da pata (distância entre os dois pontos extremos da pegada longitudinalmente); espalhar total dos dedos (distância entre os dois pontos mais extremos da pegada transversalmente); espalhar dos dois dedos intermediários, tanto do lado experimental, quanto do contralateral, foram submetidos à fórmula específica, apresentados em percentual negativo, sendo 0 (zero) representativo de função normal e -100 (menos 100) representativo de perda total da função.[21]

Foram realizadas cinco avaliações, sendo a primeira (AV1) 24 horas antes do procedimento cirúrgico, a segunda (AV2) no 3º dia do pós-operatório, antes de iniciar o protocolo de natação e a terceira (AV3) também no 3º dia, porém após o término da natação, a quarta avaliação (AV4) foi realizada no 7º dia após o tratamento por natação e, a quinta (AV5) realizada previamente à eutanásia, no 8º dia de pós-operatório. A ordem dos testes foi estabelecida e seguida durante todo o experimento, sendo primeiro o teste do IFC, em seguida o teste com analgesímetro digital de "*Von Frey*", porém a ordem de realização foi randomizada a fim de diluir a influência do tempo e fadiga dos avaliadores.

Teste tipo filamento de "*Von Frey*" Digital

O analgesímetro digital tipo filamento de "*Von Frey*" (Insight®), consistiu na aplicação de um filamento na região do procedimento cirúrgico, com o animal contido, sendo posicionada a ponteira de polipropileno perpendicularmente a área, com aumento gradativo da pressão exercida até que o animal realizasse o movimento de retirada do membro pélvico. Em seguida foi realizado o mesmo estímulo na face plantar do membro pélvico direito, com o animal em uma caixa elevada com piso de tela, possibilitando o acesso e posicionamento perpendicular e o aumento gradativo da pressão do filamento, sendo interrompido o teste assim que o animal elevasse o membro, ficando registrado o valor da força necessária para retirada. Foram realizadas três medidas por avaliação, em cada região, e adotada a média entre elas para análise estatística.[22]

Coleta e eutanásia

No 8º dia após o procedimento de lesão nervosa, os animais foram pesados e anestesiados. O nervo isquiático direito foi coletado e seccionado no sentido distal em dois fragmentos de 1 cm cada. O primeiro (fragmento proximal) foi obtido imediatamente após o ponto de lesão, identificado pelo fio de nylon 10.0, e o segundo (fragmento distal) foi coletado na sequência. Após este procedimento, os animais ainda sob o efeito do anestésico foram eutanasiados.

Análise morfológica

Os fragmentos do nervo isquiático foram fixados em paraformoldeído tamponado, por 24 horas, sendo que o fragmento distal foi pré-corado com tetróxido de ósmio 2%. Posteriormente, foram processados para emblocamento em parafina histológica e cortados transversalmente em 5 μm de espessura. As lâminas obtidas do fragmento proximal foram coradas em hematoxilina e eosina (H/E),[23] para as análises descritivas do nervo, enquanto o distal foi submetido às análises morfométricas. Na sequência, as lâminas foram fotomicrografadas em microscópio Olympus BX 50.

Para as análises morfométricas foi utilizado o programa Image-Pro-Plus 6.0, no qual foram observados os seguintes parâmetros: quantidade total de fibras nervosas viáveis (FNV), quantidade total de fibras nervosas não viáveis (FNNV), diâmetro do axônio (DAX), diâmetro da fibra nervosa (DFN), e espessura da bainha de mielina (EBM), sendo consideradas FNNV, aquelas que não apresentassem contornos definidos, passíveis de mensuração. As fibras nervosas foram analisadas com relação ao diâmetro, em menores e maiores que 4 μm. Para tanto, foi utilizado como base os estudos de Mazzer et al.,[24] e Mandelbaum-Livnat et al.,[25] que descreveram a presença de fibras nervosas de diâmetros menores e maiores em lesões do nervo isquiático. Foram efetuadas quatro imagens de cada corte, sendo no quadrante superior esquerdo, superior direito, inferior esquerdo e inferior direito, em aumento de 1.000 vezes. A análise foi feita de forma cega com relação aos grupos, sendo analisadas 25 fibras maiores e 25 menores de 4 μm de diâmetro, por quadrante, totalizando 200 fibras por nervo, ou até sua totalidade.

Análise estatística

Os resultados foram expressos por meio de estatística descritiva e analisados quanto à sua normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk. Verificada a normalidade dos dados, procedeu-se a análise por Anova unidirecional, com pós-teste LSD (teste *t*), sendo o nível de significância de $\alpha = 0,05$, para tanto utilizou-se o programa Bioestat 5.0.

RESULTADOS

Índice funcional isquiático

O CON não demonstrou diferenças significativas entre as cinco avaliações realizadas neste grupo (p=0,870). Já LES, LSER, LNAT e LSRNT apresentaram comportamento idêntico, havendo diferença significativa da AV1, realizada previamente a lesão, para as demais avaliações (AV2, AV3, AV4 e AV5) efetuadas após a lesão (p<0,001).

Na comparação entre os grupos, no momento das avaliações, em AV1 não houve diferença significativa entre os grupos (p=0,274). Nos momentos AV2, AV3, AV4 e AV5, houve diferenças entre CON e todos os demais grupos (p<0,001). (Tabela 1)

Teste com analgesímetro tipo filamento de "*Von Frey*" digital

Diante do teste de filamento tipo "*Von Frey*" digital, na região da cicatriz cirúrgica, o CON não demonstrou diferenças significativas (p=0,530). Já o LES e LSER se comportaram de forma idêntica, apresentando diferença da AV1 para as demais (p<0,001). LNAT obteve diferença da AV1 para as demais (p<0,001), e da AV2 para AV4 (p=0,018) e AV5 (p=0,023), tendo LSRNT comportamento idêntico, com diferença da AV2 para AV4 (p=0,006) e AV5 (p=0,002), indicando uma redução do quadro álgico no decorrer tempo.

Ainda em referência à cicatriz cirúrgica, na comparação entre os grupos, não houve diferença significativa na AV1 entre os grupos (p=0,383). Nos momentos AV2 e AV3, foram observadas diferenças entre CON e todos os demais grupos (p<0,001). Em AV4 houve diferença entre CON e os demais (p<0,001), e de LSER para LES (p=0,015), e LSRNT (p=0,011). Para AV5 identificou-se diferença entre CON e os demais (p<0,001), do LSER para o LES (p=0,020) e LSRNT (p<0,001), e LNAT para o LSRNT (p=0,030). (Tabela 2)

Na região da fáscia plantar, o CON não demonstrou diferenças entre as avaliações (p=0,77). Já LES e LSER apresentaram similaridades, mostrando diferença da AV1 para as demais (p<0,001). No LNAT houve diferenças entre a AV1 e as demais (p<0,001) e, entre a AV2 para AV4 (p=0,015) e AV5 (p<0,001), e da AV3 para a AV5 (p=0,004), já o LSRNT apresentou diferença da AV1 para as demais (p<0,001) e de AV2 para AV4 (p=0,001).

Tabela 1. Média e desvio padrão do IFC referente a eutanásia do oitavo dia, e diferenças estatísticas.

	CON	LES	LSER	LNAT	LSRNT
AV1	-12,1±24,0^{aA}	3,07±21,4^{aA}	-17,2±16,2^{aA}	-7,0±7,1^{aA}	-13,5±19,8^{aA}
AV2	-10,1±14,9^{bA}	-60,02±19,2^{bB}	-66,0±9,5^{bB}	-67,5±7,6^{bB}	-63,7±16,7^{bB}
AV3	-5,1±25,3^{bA}	-62,64±10,8^{bB}	-67,2±11,8^{bB}	-50,6±34,3^{bB}	-71,6±19,5^{bB}
AV4	-0,7±11,6^{bA}	-55,40±12,5^{bB}	-61,6±16,9^{bB}	-61,5±19,0^{bB}	-58,9±36,3^{bB}
AV5	-9,3±27,8^{bA}	-57,58±22,8^{bB}	-68,2±8,0^{bB}	-62,3±19,3^{bB}	-64,0±15,6^{bB}

Obs.: Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística significativa no grupo quando comparado suas avaliações (coluna), letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística significativa entre os grupos no momento da avaliação (linha).

Na comparação entre os grupos, referente a fáscia plantar, não houve diferença no momento da AV1 (p=0,1014). Já em AV2, AV3 e AV4, foram observadas diferenças entre CON e os demais grupos (p<0,001). A AV5 mostrou diferença entre CON e os demais grupos (p<0,001) e de LNAT para LSER (p=<0,0241) e LSRNT (p=0,0181). (Tabela 2)

Análise morfológica

O nervo isquiático do CON revelou características teciduais e celulares normais, formado por fibras nervosas de diferentes diâmetros, mielínicas e amielínicas, com presença das células de Schwann. (Figuras 1A e A1) As bainhas conjuntivas, endoneuro, perineuro e epineuro também estavam com características dentro da normalidade. No grupo LES a maioria das fibras nervosas se apresentaram alteradas, diâmetros e formas diferenciadas do CON, aumento no número de células de Schwann, infiltrado inflamatório, formando aglomerados de células gigantes e macrófagos. (Figuras 1B e B1)

Nos grupos SER, LNAT e LSRNT, (Figuras 1C-1E e C1-E1) os aspectos morfológicos estavam semelhantes entre si, com alteração axonal, hiperceluralidade, decorrente do aumento no número de células de Schwann e da presença de infiltrado inflamatório.

A contagem do número total de FNV, tanto as fibras de diâmetro maior, quanto as menores de 4 μm, mostraram diferença estatística de todos os grupos em relação ao CON (p<0,001). Já os valores de FNNV maiores, mostrou diferença do CON em relação aos demais grupos (p<0,010). Na variável FNNV menores, foram observadas diferenças entre CON e os demais grupos (p<0,001), de LES entre todos os grupos (LSER p=0,028, LNAT p<0,001 e LSRNT p<0,001), e de LSER para todos (LNAT p=0,038 e LSRNT p=0,006).

Na análise da média dos DFN dos grupos maiores que 4 μm, foram observadas diferenças somente de CON para os demais grupos (p<0,001). Já a média do DFN menores, não houve diferença (p=0,860), o mesmo ocorreu na avaliação da media dos DAX das fibras maiores (p=0,200) e menores (p=0,630). Na avaliação da EBM maiores, houve diferença do CON para os demais (p<0,001) não sendo observado diferença nas fibras menores (p=0,086). (Tabela 3)

DISCUSSÃO

A localização periférica do nervo isquiático o expõe a lesões nervosas, principalmente aquelas que produzem como sintoma a ciatalgia, o que interfere na transmissão dos impulsos nervosos e podem implicar em incapacidade funcional, com potencial impacto socioeconômico negativo afetando, sobretudo, indivíduos jovens e produtivos.[2,26]

O modelo de lesão abordado nesta pesquisa foi proposto por Bridge et al.[18] produzindo uma compressão, em que ocorre rompimento de axônios e desencadeia um processo de degeneração Walleriana, no sentido distal à lesão, e que ocorreu em todos os grupos que foram submetidos a lesão neste estudo. Este processo afeta a estrutura das fibras nervosas em um espaço de tempo de cerca de dois a três dias, sendo que uma cascata de eventos é disparada a partir do local da lesão e envolve, entre outros fatores, a migração de macrófagos, proliferação de células de Schwann, mudanças nos constituintes da matriz extracelular e reorganização do espaço endoneural, como verificado no presente estudo, além da produção de citocinas e aumento de neurotrofinas.[26]

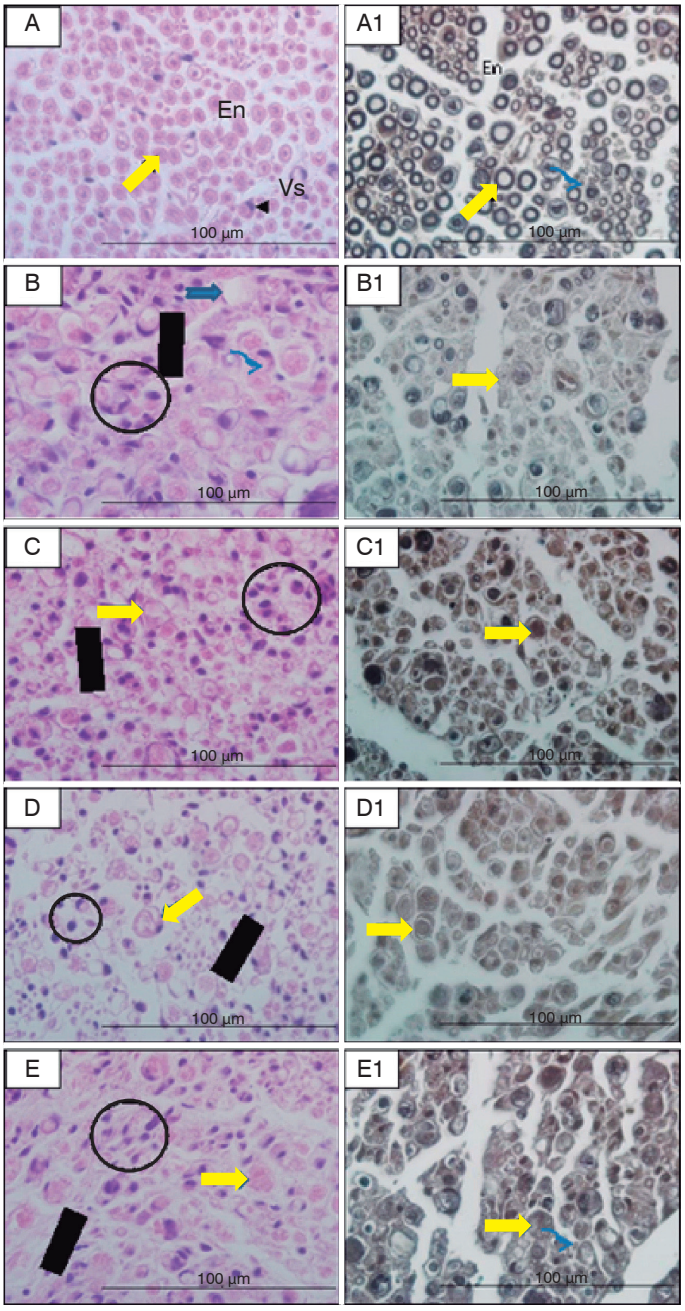

Figure 1. Fotomicrografias do nervo isquiático de ratos Wistar no 8º dia pós-lesão, corte transversal, hematoxilina-eosina (A - E) e tetróxido de ósmio (A1 – E1). A e A1, grupo controle, fibras nervosas íntegras, com axônio e bainha de mielina (seta fina), núcleo de células de Schwann (ponta de seta), vaso sanguíneo (Vs) e endoneuro (En). B e B1, grupo lesão com fibras nervosas degeneradas (seta azul), infiltrado inflamatório (circulo pontilhado) e células de Schwann. C e C1, grupo sericina; D e D1, grupo natação; e E e E1, grupo sericina e natação com fibras nervosas degeneradas, núcleo de células de Schwann, hipercelularidade, infiltrado inflamatório, fibras de pequeno diâmetro (seta curva) e vasos sanguíneos.

Tabela 2. Média e desvio padrão do teste de "Von Frey" da cicatriz cirúrgica, e da fáscia plantar referente a eutanásia do oitavo dia, e diferenças estatísticas significativas.

		CON	LES	LSER	LNAT	LSRNT
Cicatriz Cirúrgica	AV1	145,4±10,1^{aA}	137,2±13,6^{aA}	136,3±13,5^{aA}	130,1±10,9^{aA}	139,6±19,7^{aA}
	AV2	143,4±13,2^{aA}	48,4±8,6^{bB}	38,1±15,5^{bB}	39,9±9,5^{bB}	38,9±14,0^{bB}
	AV3	144,7±15,9^{aA}	49,0±12,2^{bB}	36,6±15,0^{bB}	48,3±4,7^{bcB}	48,8±9,5^{bcB}
	AV4	150,0±13,5^{aA}	57,7±6,9^{bB}	44,2±11,6^{bC}	51,0±8,1^{cBC}	58,4±6,6^{cB}
	AV5	153,8±10,3^{aA}	54,5±9,3^{bB}	43,7±7,4^{bC}	50,5±6,9^{cBC}	60,6±6,8^{cD}
Fáscia Plantar	AV1	68,1±11,5^{aA}	68,4±13,0^{aA}	55,3±13,1^{aA}	68,0±10,0^{aA}	70,9±7,1^{aA}
	AV2	66,0±9,9^{aA}	32,6±11,3^{bB}	31,9±10,1^{bB}	23,6±6,7^{bB}	24,0±4,7^{bB}
	AV3	68,3±10,8^{aA}	35,1±11,3^{bB}	29,4±11,4^{bB}	30,5±5,3^{bcB}	31,4±8,9^{bcB}
	AV4	74,1±15,2^{aA}	39,5±7,6^{bB}	32,5±8,8^{bB}	36,0±5,6^{cdB}	36,7±8,2^{cB}
	AV5	69,7±11,9^{aA}	39,0±11,0^{bBC}	31,0±6,8^{bB}	41,6±3,6^{dC}	30,5±4,4^{bcB}

Obs.: Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística significativa no grupo quando comparado suas avaliações (coluna), letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística significativa entre os grupos no momento da avaliação (linha).

Tabela 3. Comparativo das médias, maiores e menores de 4 μm, no oitavo dia de pós-operatório, de fibras nervosas viáveis (FNV), fibras nervosas não viáveis (FNNV), diâmetro das fibras nervosas (DFN), diâmetro dos axônios (DAXN) e espessura da bainha de mielina (EBM).

		CON	LES	SER	LNAT	LSRNT
FNV	> 4 μm	590,1±40,5^{A}	15,5±8,0^{B}	14,5±19,3^{B}	7,0±4,5^{B}	6,1±3,2^{B}
	< 4 μm	18,5±12,0^{A}	5,0±3,8^{B}	3,6±1,6^{B}	4,66±3,61^{B}	4,3±2,8^{B}
FNNV	> 4 μm	17,8±4,3^{A}	411,1±11,2^{B}	487,6±51,0^{B}	449,5±84,9^{B}	438,8±48,0^{B}
	< 4 μm	0,0±0,0^{A}	56,5±23,3^{B}	93,1±24,1^{C}	127,6±20,4^{D}	139,8±46,6^{D}
DFN	> 4 μm	9,0±0,4^{A}	6,7±1,1^{B}	6,5±0,2^{B}	6,7±1,1^{B}	6,5±1,4^{B}
	< 4 μm	3,4±0,1^{A}	3,4±0,3^{A}	3,3±0,3^{A}	3,3±0,5^{A}	3,3±0,3^{A}
DAXN	> 4 μm	4,0±0,4^{A}	3,2±0,5^{A}	3,1±0,3^{A}	3,4±0,8^{A}	3,3±1,0^{A}
	< 4 μm	1,5±0,1^{A}	1,57±0,2^{A}	1,4±0,1^{A}	1,52±0,2^{A}	1,5±0,1^{A}
EBM	> 4 μm	2,5±0,1^{A}	1,7±0,2^{B}	1,6±0,1^{B}	1,6±0,2^{B}	1,5±0,2^{B}
	< 4 μm	0,9±0,1^{A}	0,9±0,1^{A}	0,9±0,1^{A}	0,9±0,2^{A}	0,8±0,1^{A}

Obs. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa entre os grupos (linha).

A hipercelularidade verificada nos grupos lesionados resulta de diversos tipos celulares voltados à reorganização tecidual e funcional; como os macrófagos, presentes no coto distal, que removem os restos mielínicos em degeneração, entre o segundo e o sétimo dia após a lesão. Com a extrusão inicial da bainha de mielina, em até três dias após a lesão do axônio, se inicia a divisão e proliferação das células de Schwann, o que explica a grande quantidade de células observadas no oitavo dia após a lesão. As células de Schwann também realizam fagocitose e estão associadas à produção de substâncias quimiotáxicas, elas se alinham ao longo da lâmina basal, formando as bandas de Büngner, e auxiliam na orientação do crescimento axonal.[26]

A regeneração axonal periférica depende de uma resposta inflamatória rápida e eficiente, visto que as células de Schwann e macrófagos comunicam-se por meio de redes de citocinas, controlando a fagocitose e fatores de crescimento. Em roedores, a liberação de citocinas pró-inflamatórias, inicia de três a cinco horas após a lesão e o número de macrófagos, tanto endógenos quanto sistêmicos, atinge seu máximo de quatro a sete dias após a lesão. Explicando assim a hipercelularidade observada no oitavo dia após a lesão. É importante ressaltar que atrasos nesse processo podem levar a perda da capacidade regenerativa.[26]

Para fins de comparação, não foram encontrados estudos similares do uso da sericina em LNP's, sendo estes os primeiros dados morfológicos e funcionais advindo da aplicação deste biomaterial, seja tratado diretamente ou não sobre a lesão. No entanto, a perspectiva em relação a aplicação da sericina em outros tecidos se mostrou promissora,[12-16] levantando a expectativa de sua ação no reparo nervoso periférico.

Quanto aos resultados obtidos no IFC, existiu diferença somente entre o CON e os demais grupos, quando comparado intergrupos, e individualmente houve diferença somente da AV1, realizada previamente a lesão. Dessa forma, o modelo de lesão apresentou-se eficaz em causar alterações significativas na função motora dos animais e perdurou em todos os grupos de intervenção, até o oitavo dia após a lesão nervosa.

Oliveira et al.,[8] relataram que a natação com sobrecarga na fase inicial da regeneração nervosa causou danos à recuperação funcional, e a associação com estimulação elétrica, não teve efeito sobre o reparo nervoso, propondo que os protocolos de intervenção evitem sobrecarga. Contudo, Lós et al.,[27] colocaram que a intervenção precoce em meio aquático, após reparo cirúrgico de uma lesão nervosa periférica completa, não compromete o processo regenerativo e estimula a neovascularização fisiológica. De forma concordante Teodori et al.,[5] citaram que o exercício de natação, na fase aguda e tardia da lesão nervosa periférica do nervo isquiático, em ratos Wistar, por esmagamento, acelera a regeneração nervosa e melhora a transmissão sináptica. Porém, os dados obtidos neste estudo, não revelaram melhora funcional nos grupos lesionados, no oitavo dia após a lesão.

Alterações álgicas relacionadas às intervenções, evidenciadas por meio do teste com o analgesímetro digital, realizado na região da incisão cirúrgica, encontrou na comparação por grupo, que o CON não demostrou alterações, já nos demais grupos a AV1 se mostrou diferente das avaliações seguintes, o que se deve a AV1 ter sido realizada previamente ao procedimento cirúrgico, porém no grupo LNAT e no LSRNT ocorreu um aumento do limiar nociceptivo no decorrer do tempo, relacionado a um efeito do exercício aquático, pois somente os grupos com intervenção por exercício demonstraram esse comportamento, o que sustenta estudos que citam exercícios como estratégia eficaz para o controle do processo inflamatório e da dor, pois alteram os níveis de citocinas inflamatórias, neurotrofinas, neurotransmissores e opioides endógenos.[28]

Nas AV2 e AV3, houve diferença entre o CON e os demais grupos, e na AV4, denota-se diferença entre o LSER para o LES e LSRNT, sendo que o LSER teve o pior desempenho, denotando que a sericina, usada de forma isolada, se mostrou com ação pró-inflamatória, quando administrada na fase inicial de reparo. Bhattacharjee et al.[29] citam que o uso de sericina aumenta a resposta inflamatória por causar hipersensibilidade, decorrentes de respostas imunitárias exacerbadas. No entanto, Svennigsen e Dahlin[26] colocam que o aumento da resposta inflamatória é um quesito importante a ser considerado na regeneração nervosa. Aramwit et al.[14] destacaram que a sericina não é tóxica e pode promover cicatrização de feridas cutâneas, sendo que os níveis de mediadores inflamatórios IL-1β e TNF-α, observados sete dias após a lesão, são significativamente inferiores em feridas tratadas sem a sericina. Em estudo comparativo nas fibras de seda, com e sem a sericina, observou-se que nas fibras com sericina houve a ativação de células inflamatórias, como polimorfonucleadas, leucócitos, eosinófilos e macrófagos.[30]

O teste realizado na região da fáscia plantar com o analgesímetro digital, buscou identificar alterações por alodinia, com referência ao trajeto nervoso isquiático. Na comparação individual, LES e LSER, se comportaram de forma idêntica. No LNAT houve diferença da AV2 para a AV4 e AV5, e no LSRNT da AV2 para AV4, mostrando uma melhora da sensibilidade em ambos os grupos, podendo estar associada ao tratamento em meio aquático, visto que somente os grupos submetidos ao tratamento por exercício de natação, mostraram melhora no decorrer do tempo. Este resultado corrobora que os estudos de Kami, Tajima e Senba,[28] em que sugerem o exercício de natação como fator para melhorar a alodinia em modelos de dor neuropática, mas os mecanismos não são completamente compreendidos.

No momento da AV5, o LNAT foi diferente de LSER e LSRNT, tendo melhor desempenho, porém não foi diferente do LES, sendo as piores médias associadas ao uso da sericina, evidenciando novamente, um efeito pró-inflamatório.

Em relação aos achados morfométricos, observou-se que a quantidade de FNV, tanto as menores quanto as maiores, mostraram diferença do CON para todos os demais grupos, comprovando que até o oitavo dia, a lesão nervosa ainda era significativa. Já a quantidade de FNNV menores de 4 μm, mostraram diferença do LES para todos os demais e do LSER também para todos os demais, porém com os menores valores observados, já NAT e SRNT foram diferentes de todos os grupos, obtendo os maiores valores, porém não é possível afirmar se estas FNNV estão em processo de regeneração ou degradação. A tendência é que fibras maiores alteradas estejam em processo de degeneração e fibras menores,

estejam em regeneração. Sendo assim, o processo de regeneração ainda em fase inicial, não evidenciou sinais de viabilidade, justificando a falta de funcionalidade adequada observada, porém a diferença numérica entre os grupos, que foi significativamente maior em LNAT e LNTSR, pode indicar que houve regulação da ação pró-inflamatória da proteína sericina pelo exercício de natação.

Já o DFN maiores de 4 μm apresentaram diferença do CON para os demais grupos, não havendo diferença entre as menores, também não havendo diferença significativa no DAX, tanto maiores quanto menores. A EBM das fibras maiores de 4 μm mostrou diferença do CON, já nas menores não houve diferença, revelando pouca influência nessas variáveis, no oitavo dia.

Considerando que o processo inflamatório é fundamental para regeneração nervosa,[26] estudos mostraram que a sericina induz citocinas pró-inflamatórias e aumenta a fagocitose, além de estimular o fator de transcrição NF-Kb e p38 quinase, que estão amplamente envolvidos na regulação de vias pró-inflamatórias.[29] Ainda Teodori et al.,[5] relatam que o exercício de natação realizado na fase aguda após lesão do nervo isquiático por esmagamento em ratos Wistar, acelera a regeneração nervosa e melhora a transmissão sináptica. Assim, com base nos resultados do presente estudo, parece que o exercício de natação regula a ação pró-inflamatória da proteína sericina, no entanto se faz necessário estudos com tempos prolongados de tratamento para analisar o comportamento desta relação em uma fase mais tardia no reparo nervoso.

CONCLUSÃO

A proteína sericina, aplicada diretamente sobre a lesão nervosa isquiática, apresentou características pró-inflamatórias que parecem ser moduladas quando associada ao exercício de natação. Já a natação isolada mostrou melhora da hipernocicepção em relação as demais intervenções, vinculado a um possível efeito aquático. Não houve sinais morfológicos significativos de aceleração do processo de reparo nervoso no oitavo dia após a lesão em nenhum dos tratamentos.

Todos os autores declaram não haver nenhum potencial conflito de interesses referente a este artigo.

CONTRIBUIÇÕES DOS AUTORES: Cada autor contribuiu individual e significantemente para o desenvolvimento deste artigo. JCD (0000-0001-8845-6333)*: redação, revisão, realização das cirurgias para lesão nervosa; realização dos tratamentos, produção e análise de lâminas histológicas; AJS (0000-0003-1282-0746)*: revisão do texto final, realização das cirurgias para lesão nervosa; realização dos tratamentos, auxílio na produção e análise de lâminas histológicas; ALFT (0000-0002-8687-1231): revisão do texto final, realização das cirurgias para lesão nervosa; realização dos tratamentos, auxílio na produção e análise de lâminas histológicas; JRGC (0000-0001-5145-5935)*: revisão do texto final, realização das cirurgias para lesão nervosa; realização dos tratamentos, auxílio na produção e análise de lâminas histológicas; LGVM (0000-0002-1786-5073)*: revisão do texto final, realização das cirurgias para lesão nervosa; realização dos tratamentos, auxílio na produção e análise de lâminas histológicas; RIK (0000-0003-1510-7022)*: revisão do texto final, auxílio na produção e análise de lâminas histológicas; LFCR (0000-0001-5174-7399)*: revisão do texto final, auxílio na produção e análise de lâminas histológicas; RMC (0000-0002-5344-5076)*: revisão do texto final, auxílio na produção e análise de lâminas histológicas; GRFB (0000-0003-0565-2019)*: revisão do texto final auxílio na cirurgia, redação, realização da análise estatística, conceito intelectual e confecção de todo o projeto de pesquisa. *ORCID (*Open Researcher and Contributor ID*).

REFERÊNCIAS

1. Brull R, Hadzic A, Reina MA, Barrington MJ. Pathophysiology and etiology of nerve injury following peripheral nerve blockade. Reg Anesth Pain Med. 2015;40(5):479-90.
2. Miranda GE, Torres RY. Epidemiology of traumatic peripheral nerve injuries evaluated with electrodiagnostic studies in a tertiary care hospital clinic. P R Health Sci J. 2016;35(2):76-80.
3. Savastano LE, Laurito SR, Fitt MR, Rasmussen JA, Polo VG, Patterson SI. Sciatic nerve injury: A simple and subtle model for investigating many aspects of nervous system damage and recovery. J Neurosci Methods. 2014;227:166-80.
4. Nijs J, Kosek E, Oosterwijck JV, Meeus M. Dysfunctional endogenous analgesia during exercise in patients with chronic pain: to exercise or not to exercise? Pain Physician. 2012;15(3 Suppl):ES205-13.
5. Teodori RM, Betini J, Oliveira LS, Sobral LL, Takeda SYM, Montebelo MIL. Swimming exercise in the acute or late phase after sciatic nerve crush accelerates nerve regeneration. Neural Plast. 2011; 2011(1):1-8.
6. Jang S, Lee J. Effects of physical exercise on the functional recovery of rat hindlimbs with impairments of the sciatic nerve as assessed by 2D video analysis. J Phys Ther Sci. 2015;27(3):935-8.
7. Sarikcioglu L, Oguz N. Exercise training and axonal regeneration after sciatic nerve injury. Intern J Neurosci. 2001;109(3-4):173-1.
8. Oliveira LS, Sobral LL, Takeda SYM, Betini J, Guirro RRJ, Somazz MC, et al. Estimulación eléctrica y natación en la fase aguda de la axonotmesis: influencia sobre la regeneración nerviosa y la recuperación funcional. Rev Neurol. 2008;47(1):11-5.
9. Dishman RK, Berthoud H, Booth FW, Cotman CW, Edgerton VR, Fleshner MR, et al. Neurobiology of exercise. Obesity (Silver Spring). 2006;14(3):345-56.
10. Coradini JG, Kakihata CMM, Kunz RI, Errero TK, Bonfleur ML, Bertolini GRF. Avaliação da força de preensão em ratos Wistar, normais e obesos, submetidos à natação com sobrecarga após compressão do nervo mediano. Rev Bras Reumatol. 2015;5(1):43-7.
11. Barajas-Gamboa JA, Serpa-Guerra AM, Restrepro-Osorio A, Álvarez-López C. Sericin applications: a globular silk protein. Ing Compet. 2016;18(2):193-206.
12. Dinescu S, Galateanu B, Albu M, Lungu A, Radu E, Hermenean A, et al. Biocompatibility assessment of novel collagen-sericin scaffolds improved with hyaluronic acid and chondroitin sulfate for cartilage regeneration. Biomed Res Int. 2013;2013:598056 .
13. Ersel M, Uyanikgil Y, Akarca FK, Ozcete E, Altunci YA, Karabey F, et al. Effects of silk sericin on incision wound healing in a dorsal skin flap wound healing rat model. Med Sci Monit. 2016;22(1):1064-78.
14. Aramwit P, Kanokpanont S, De-Eknamkul W, Srichana T. Monitoring of inflammatory mediators induced by silk sericin. J Biosci Bioeng. 2009;107(5):556-61.
15. Padol AR, Jayakumar K, Mohan K, Manochaya S. Natural biomaterial silk and silk proteins: Applications in tissue repair. International Journal of Materials and Biomaterials Applications. 2012;2(4):19-24.
16. Wang Z, Wang J, Yang J, Luo Z, Yang W, Xie H, et al. A neuroprotective sericin hydrogel as an effective neuronal cell carrier for the repair of ischemic stroke. ACS Appl Mater Interfaces. 2015;7(44):1-34.
17. Bridge PM, Ball DJ, Mackinnon SE, Nakao Y, Brandt K, Hunter DA, et al. Nerve crush injuries - A model for axonotmesis. Exp Neurol. 1994;127(2):284-90.
18. Dias FJ, Issa JPM, Coutinho-Netto J, Fazan VPS, Sousa LG, Iyomasa MM, et al. Morphometric and high resolution scanning electron microscopy analysis of low-level laser therapy and latex protein (Hevea brasiliensis) administration following a crush injury of the sciatic nerve in rats. J Neurol Sci. 2015;349(1-2):129-37.
19. Gimenes ML, Silva VR, Vieira MGA, Silva MGC, Scheer AP. High molecular sericin from Bombyx mori coccons: Extraction and recovering by ultrafiltration. International journal of Chemical Engineering and Applications. 2014;5(3):226-71.
20. Peretti AL, Rosa CT, Errero TK, Baretta V, Schneider SCS, Bertolini GRF. Avaliação comportamental de ratos treinados em natação forçada. Scientia Medica. 2015;25(1):1-13.
21. Monte-Raso VV, Barbieri CH, Mazzer N, Fazan VPS. Os efeitos do ultra-som terapêutico nas lesões por esmagamento do nervo ciático de ratos: análise funcional da marcha. Rev Bras Fisioter. 2006;10(1):113-9.
22. Vivancos GG, Verri Jr WA, Cunha TM, Schivo IRS, Parada CA, Cunha FQ, et al. An electronic pressure-meter nociception paw test for rats. Braz J of Med Biol Res. 2004;37(1):391-9.
23. Junqueira LC, Junqueira LMMS. Técnicas básicas de citologia e histologia.1th ed. São Paulo: Santos;1983.
24. Mazzer PYCN, Barbieri CH, Mazzer N, Fazan VPS. Avaliação qualitativa e quantitativa das lesões agudas por esmagamento do nervo isquiático do rato. Acta Ortop Bras. 2006;14(6):220-5.
25. Mandelbaum-Livnat MM, Almog M, Nissan M, Loeb E, Shapira Y, Rochkind S. Photobiomodulation triple treatment in peripheral nerve injury: nerve and Muscle Response. Photomed Laser Surg. 2016;34(12):638-45.
26. Svennigsen AF, Dahlin LB. Repair of the peripheral nerve – Remyelination that Works. Brain Sci. 2013;3(3):1182-97.
27. Lós DB, Silva IB, Lira KDS, Andrade RF, Moraes SRA. Efeito da natação na regeneração do nervo ciático após neurotmese experimental. Rev Fisioter S Fun. 2016;5(1):23-9.
28. Kami K, Tajima F, Senba E. Exercise-induced hypoalgesia: potential mechanisms in animal models of neuropathic pain. Anat Sci Int. 2017;92(1):79-90.
29. Bhattacharjee M, Schultz-Thater E, Trella E, Miot S, Das S, Loparic M, et al. The role of 3D structure and protein conformation on the innate and adaptive immune responses to silk-based biomaterials. Biomaterials. 2013;34(33):8161-71.
30. Liu H, Ge Z, Wang Y, Toh SL, Sutthikhum V, Goh JC. Modification of sericin-free silk fibers for ligament tissue engineering application. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2007;82(1):129-38.