

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**FILME À BASE DE QUITOSANA COMPARADO À GORDURA
AUTÓGENA NA PREVENÇÃO DE ADERÊNCIAS PÓS-
LAMINECTOMIA DORSAL EM COELHOS**

Filipe Augusto Sales Gomes
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Neusa Margarida Paulo

GOIÂNIA
2009

FILIPPE AUGUSTO SALES GOMES

**FILME À BASE DE QUITOSANA COMPARADO À GORDURA
AUTÓGENA NA PREVENÇÃO DE ADERÊNCIAS PÓS-
LAMINECTOMIA DORSAL EM COELHOS**

Dissertação apresentada para a obtenção do título
de Mestre em Ciência Animal junto à Escola de
Veterinária da Universidade Federal de Goiás.

Área de Concentração:

Patologia, Clínica e Cirurgia Animal.

Linha de Pesquisa:

Técnicas cirúrgicas e anestésicas, patologia,
clínica cirúrgica e cirurgia experimental

Orientadora:

Profa. Dra. Neusa Margarida Paulo – EV/UFG

Comitê de Orientação:

Prof. Dr. Adilson Donizeti Damasceno – EV/UFG

Prof. Dr. Alexandre Mazzanti – UFSM

GOIÂNIA

2009

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação na (CIP)
GPT/BC/UFG**

G633f Gomes, Filipe Augusto Sales.
Filme à base de quitosana comparado à gordura autógena na prevenção de aderências pós-laminectomia dorsal em coelhos [manuscrito] / Filipe Augusto Sales Gomes. - 2009.
64 f. : il., figs, tabs.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Neusa Margarida Paulo; Coorientadores: Adilson Donizeti Damasceno e Alexandre Mazzanti

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária, 2009.

Bibliografia.

Inclui lista de figuras, abreviaturas, siglas e tabelas.

Apêndices.

1. Neurocirurgia – Coelhos. 2. Aderências pós-laminectomia 3. Biomateriais 4. Fibrose 5. Neurocirurgia veterinária. I. Título.

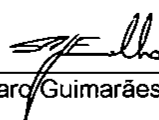
CDU:619:616.8-089:636.92

FILIFE AUGUSTO SALES GOMES

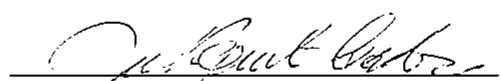
Dissertação defendida e aprovada em **30/09/2009**, pela Banca Examinadora constituída pelos professores:



Profa. Dra. Neusa Margarida Paulo
(ORIENTADOR (A))



Prof. Dr. Sérgio Amaro Guimarães Fialho - UFSM/RS



Prof. Dr. Júlio Róquete Cardoso – ICB/UFG

Dedico a minha querida mãe
e ao meu eterno irmão (*in memoriam*),
exemplos de competência e força de vontade.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me dar o dom da vida e por colocar todas essas pessoas no meu destino e caminho.

Aos meus pais, Zélia Sales e Elias Ferreira Gomes e meu eterno irmão Thiago Augusto Sales que mesmo distante demonstram por mim carinho, amor e apoio sem limites.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Animal da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás pela oportunidade e crédito para concretização deste trabalho e a CAPES pela bolsa de fomento.

A minha orientadora, Prof^a. Dra. Neusa Margarida Paulo, que me guiou com brilhantismo e sabedoria até o final desta jornada.

Ao Prof. Dr. Adilson Donizeti Damasceno, pela paciência, sugestões, palavras de apoio, de solidariedade e importantes auxílios na confecção deste trabalho.

Aos professores e técnicos do setor de Patologia que me ofereceram o espaço e os equipamentos necessários para desenvolvimento da parte histológica deste trabalho.

A todos os funcionários do Hospital Veterinário da Universidade Federal de Goiás que por vezes ficaram depois do expediente de trabalho para auxílio na execução deste trabalho.

A Dra. Ângela Maria Moraes, Ana Paula Rodrigues e equipe da UNICAMP pelo fornecimento dos filmes à base de quitosana sem os quais este estudo não seria possível.

A BIOAGRI como empresa contribuinte deste projeto.

A GUABI pelo fornecimento da ração para os coelhos deste e de outros projetos.

Aos médicos veterinários e funcionários do Hospital Veterinário das Faculdades Objetivo pela cumplicidade, amizade e apoio.

Aos médicos veterinários, médicos veterinários residentes e todos os funcionários do Hospital Veterinário da Universidade Federal de Goiás pela confiança, credibilidade, palavras de encorajamento, vida e otimismo.

A todos os amigos de mestrado pelo auxílio e estudos compartilhados.

Aos amigos veterinários Cássia, Leandro, Sandro e Ygor, pelas noites perdidas anestesiando os animais e auxiliando os procedimentos.

As graduandas Carolina, Juliana, Marilene, Rejane, pela compreensão, paciência, amizade e ajuda na manutenção diária dos coelhos.

Ao prof. Dr. Alexandre Mazzanti pelo auxílio valioso na parte experimental deste trabalho.

Aos professores da graduação e pós-graduação onde, cada um do seu jeito, sempre me recebeu muito bem.

Aos pacientes para e tetraplégicos que tanto me inspiram e motivam para o exercício competente desta profissão.

Meu muito obrigado.

“Não conheço nenhuma forma infalível para obter o sucesso. Mas conheço uma forma infalível de fracassar: Tentar agradar a todos.”

(John F. Kennedy)

“Procure ser um homem de valor, em vez de ser um homem de sucesso.”

(Albert Einstein)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1 Anatomia da medula espinhal e coluna vertebral	4
2.2 Abordagem cirúrgica da coluna toracolombar	6
2.2.1 Laminectomia dorsal	7
2.3 Biomateriais em neurocirurgia	8
2.3.1 Enxerto de gordura autógena	10
2.3.2 Biomateriais à base de Quitosana	11
3 MATERIAL E MÉTODOS	14
3.1 Local	14
3.2 Animais de experimentação	14
3.3 Manejo dos animais	14
3.4 Avaliações clínicas pré-operatórias	15
3.5 Tratamentos	16
3.5.1 Materiais utilizados	17
3.6 Procedimentos pré-cirúrgicos e cirúrgicos	18
3.6.1 Pré-operatório	18
3.6.2 Protocolo Anestésico	18
3.6.3 Técnica cirúrgica	19
3.6.4 Acompanhamento pós-operatório	21
3.7 Protocolos de avaliação <i>ante-mortem</i>	21
3.8 Eutanásia	23
3.9 Estudo histopatológico	23
3.10 Análise estatística	25
4 RESULTADOS	26
5 DISCUSSÃO	35
6 CONCLUSÕES	40
REFERÊNCIAS	41

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Ilustração de um corte transversal da medula espinhal evidenciando as principais estruturas que a compõem.....	5
FIGURA 2 – Ilustração da medula espinhal após a retirada da lâmina dorsal, mostrando a relação dos segmentos com os corpos vertebrais.....	6
FIGURA 3 – A. Punção na cisterna magna do espaço subaracnóide do coelho para colheita do líquido e injeção do contraste para mielografia. B. Injeção do contraste através do cateter introduzido na cisterna magna do coelho.....	16
FIGURA 4 – Sítio de colheita do enxerto de gordura autógena (seta). Imagem obtida de um coelho <i>pós-mortem</i>	17
FIGURA 5 – Laminectomia dorsal confeccionada entre L1 e L2 (setas) e o filme à base de quitosana (seta larga) utilizado para ocluir a janela feita entre as vértebras.	18
FIGURA 6 – Coelho posicionado na mesa cirúrgica para realização da laminectomia dorsal.	19
FIGURA 7 – Aspecto final da laminectomia dorsal em coelho feita entre o espaço interarcual L1 – L2.	20
FIGURA 8 – Mielografias pós-operatórias de coelhos submetidos à laminectomia dorsal. A. ausência de compressão (seta) (G30). B. compressão moderada (seta) (G15). C. Grave compressão medular (setas duplas) devido à ruptura do fio de aço (seta) (Q15).	27
FIGURA 9 – Quantidade de coelhos em relação aos graus de aderência encontrados em cada subgrupo.	28
Figura 10 – Fotomicrografia de colunas vertebrais de coelhos com o uso do enxerto de gordura autógena (Coloração: HE), (aumento 5x). A. Nota-se a dura-máter (seta) próxima a medula sem sinais de aderência. B. Presença de neovascularização (setas) no enxerto que apresenta aderência leve com a dura-máter (seta pontilhada). C. Fibrose (seta) com aderência moderada entre a dura-máter e o EGAL. D. Aderência intensa com pouca quantidade de fibrose (setas pontilhada) e o afastamento da dura-máter (seta dupla) em relação a medula.	30
FIGURA 11 – Fotomicrografias de lâminas histológicas colhidas da coluna toracolombar de coelhos (Coloração: HE). A. Discreta presença de tecido fibroso próximo a dura-máter (seta) e entremeados entre o implante de gordura (seta larga) (aumento de 5X). B. Grande quantidade de tecido fibroso (seta) circundando o filme de quitosana (FQ), formando uma cápsula fibrosa (seta larga). (aumento de 10X).....	31
FIGURA 12 – Fotomicrografia da coluna vertebral de coelhos (Coloração: HE). A. Aderência intensa entre o implante de gordura (seta pontilhada) e a dura-máter (seta) afastando-a em relação à medula (seta dupla), poucas áreas de fibrose (setas larga) sem presença de células inflamatórias. (aumento 5x). B. Filme à base de quitosana (FQ) envolto por grande quantidade de células inflamatórias com áreas de necrose (setas) com leve aderência da dura-máter pelo afastamento desta em relação à medula espinhal (seta dupla). (aumento de 5x).	32

- FIGURA 13 – Fotomicrografia da coluna vertebral de coelho após 30 dias da implantação do filme a base de quitosana (FQ) (Coloração: HE). **A.** Presença de reação inflamatória intensa (seta) em torno do filme de quitosana com áreas de necrose e formação de cartilagem metaplásica (seta pontilhada) (aumento 5x). **B.** Formação óssea (seta pontilhada) sobre a dura-máter (seta) sem compressão medular (Aumento de 5X).....33
- FIGURA 14 – Fotomicrografia da coluna vertebral de coelhos 15 dias após o implante do filme a base de quitosana (FQ) (Coloração: HE). **A.** Reação inflamatória exacerbada (seta pontilhada) com formação de cápsula fibrosa (seta) (aumento 5x). **B.** Filme de quitosana (FQ) com regiões de necrose (seta) formadas próximas ao implante. (Aumento 10X).34

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Distribuição dos grupos em função do implante utilizado e o período para análise mielográfica e histopatológica.....	16
TABELA 2 – Distribuição dos grupos em função dos dias e quantidade de animais em que foram feitos os exames mielográficos.	22
TABELA 3 – Relação entre os grupos e o escore de compressão encontrado na mielografia.	26
TABELA 4 – Relação entre o número de animais de cada grupo em cada momento em relação ao graus de aderências encontrados.....	29
TABELA 5 – Relação entre o número de animais de cada grupo em cada momento em relação ao graus de reação inflamatória encontrados.....	32

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 – Distribuição e classificação dos graus de compressão em função dos achados encontradas no exame mielográfico.....	22
QUADRO 2 – Distribuição dos graus de aderência em função da classificação da aderência e alterações encontradas nos cortes histológicos.....	24
QUADRO 3 – Distribuição dos graus de reação inflamatória em função da quantidade de células encontradas nos cortes histológicos.....	25

LISTA DE ABREVIATURAS

C ₁	Primeira vértebra cervical
C ₄	Quarta vértebra cervical
C ₅	Quinta vértebra cervical
C ₆	Sexta vértebra cervical
CO ₂	Gás Carbônico
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
EGAL	Enxerto de gordura autógena livre
EV	Escola de Veterinária
HE	Hematoxilina-Eosina
HV	Hospital Veterinário
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
IRM	Imagem de Ressonância Magnética
IV	Intravenoso
LCR	Líquido Cefalorraquidiano
L ₁	Primeira vértebra lombar
L ₂	Segunda vértebra lombar
L ₃	Terceira vértebra lombar
L ₄	Quarta vértebra lombar
L ₆	Sexta vértebra lombar
ME	Medula Espinhal
PLA	Ácido polilático
PO	Pós-operatório
S ₁	Primeira vértebra sacral
SNC	Sistema Nervoso Central
TC	Tomografia Computadorizada
TID	Três vezes ao dia
T ₁	Primeira vértebra torácica
T ₂	Segunda vértebra torácica
T ₃	Terceira vértebra torácica
T ₁₁	Décima primeira vértebra torácica
T ₁₃	Décima terceira vértebra torácica
UFG	Universidade Federal de Goiás
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas

RESUMO

A formação de aderências após procedimentos cirúrgicos na coluna vertebral é um tema bastante estudado na neurocirurgia, em função do desconforto e dores pós-operatórias sofridas pelos pacientes operados. Diversos estudos já foram realizados utilizando antiinflamatórios, enxertos autólogos, heterólogos e xenólogos e ainda biomateriais na forma de filme e gel com a finalidade de reduzir ou prevenir a formação de aderências. O objetivo deste estudo foi comparar o filme à base de quitosana com a gordura autógena na prevenção de aderências durais em coelhos. Tal técnica foi comparada à técnica realizada rotineiramente pelos neurocirurgiões que, na maioria dos casos, utilizam a gordura autógena. Foram utilizados 24 coelhos da raça Nova Zelândia, machos, adultos, e após 15 e 30 dias de pós-operatório (PO) as medulas espinhais dos animais foram submetidas à avaliação mielográfica e histológica. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos (grupo G e grupo Q) de igual número, sendo posteriormente subdivididos nos subgrupos G15, Q15, G30 e Q30 de acordo com os momentos de avaliação e o material utilizado. Nos animais do grupo Q, a laminectomia realizada entre L1-L2 foi ocluída com o filme à base de quitosana e no grupo G o defeito foi reparado com enxerto de gordura autógena livre. Na avaliação mielográfica, foi observada compressão moderada na coluna dorsal da medula espinhal tanto nos animais do grupo G quanto nos animais do grupo Q. Em dois coelhos do grupo Q ocorreu compressão grave atribuída à ruptura da estabilização feita com fio de aço cirúrgico. Não foi observada diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre os grupos e subgrupos. Decorridos os períodos pré-estabelecidos de PO, foi notado nos animais de ambos os grupos, aderência fibrosa de leve a intensa entre a dura-máter e o implante, com fibrose e fibras colágenas entremeadas ao tecido conjuntivo e implante, sem diferença estatística significativa ($p \leq 0,05$) entre os grupos e subgrupos. Verificou-se infiltrados celulares e células gigantes, sendo este achado mais intenso nos animais do grupo Q. Aos 15 e 30 dias de PO, os filmes à base de quitosana encontravam-se revestidos por células inflamatórias com áreas de necrose central. Aos 30 dias de PO, o material apresentava cápsula fibrosa circundando o foco inflamatório e o implante, tendo sido notada diferença estatística significância ($p \leq 0,05$) de 5%, quando comparados os grupos e os subgrupos entre si. Com base nos resultados pode-se concluir que o filme à base de quitosana, assim como a gordura autógena livre reduz a extensão das aderências durais em coelhos, porém, o filme à base de quitosana assim como todo corpo estranho, induz respostas inflamatórias tissulares crônicas e intensas no coelho.

PALAVRAS-CHAVE: biomateriais, coluna vertebral, dura-máter, fibrose, meninge, neurocirurgia.

ABSTRACT

The adhesions formation after surgical procedures in the spine is a subject well studied in neurosurgery, according to the discomfort and postoperative pain suffered by patients. Several studies have been performed using anti-inflammatories, autologous grafts, xenografts and xenologer biomaterials and even in film form and gel with the aim of reducing or preventing adhesion formation. The aim of this study was to compare the film based on chitosan with autogenous fat in preventing dural adhesions in rabbits. This technique was compared to the technique used routinely by neurosurgeons who, in most cases, using autogenous fat. We used 24 adult male rabbits of New Zealand, and 15 and 30 days postoperatively (PO) the spinal cords of animals underwent myelography and histological evaluation. The animals were randomly divided equally into two groups (group G and Q), and further subdivided into four subgroups: G15, Q15, G30 and Q30 according to time points and the material used. In the group Q, a laminectomy performed between L1-L2 was occluded with the film based on chitosan and in the Group G the defect was repaired with autogenous free fat graft. In assessing myelography, there was a moderate compression of the column spinal cord both in group G as in group Q. In two rabbits of group Q the compression was attributed to severe disruption of the stabilization made with surgical steel wire. There was no significant difference ($p \leq 0.05$) between groups and subgroups. After the pre-established postoperatively, fibrous adhesion from mild to intense between the dura and the implant was noted in animals from both groups, with fibrosis and collagen fibers interspread with the tissue and implant without, no statistically significant difference ($p \leq 0.05$) between groups and subgroups. There were cell infiltrates and giant cells that were more intense in the group Q. At 15 and 30 days postoperatively, the films based on chitosan were coated by inflammatory cells with areas of central necrosis. At 30 days postoperatively, the material had a fibrous capsule surrounding the inflammatory focus and the implant was noticed statistically significant ($p \leq 0.05$) of 5% when comparing the groups and subgroups. Based on the results we can conclude that the film based on chitosan, as well as a free autogenous fat reduces the extent of dural adhesions in rabbits, however, the film based on chitosan as well as any foreign body, induces chronic and intensifies inflammatory responses in the rabbit.

KEYWORDS: biomaterials, dura, fibrosis, meninges, neurosurgery, spine.

1. INTRODUÇÃO

O emprego de materiais biológicos tanto absorvíveis quanto não absorvíveis para a prevenção de aderências entre a dura-máter e tecidos peridurais vem sendo objeto de estudo de vários pesquisadores. Tal motivação decorre, sobretudo, em função da polêmica dor periódica causada por essa aderência entre tecidos peridurais, dura-máter e raízes nervosas, tendo elevadas possibilidades de reintervenção cirúrgica para corrigir esse defeito.

A maioria dos trabalhos relacionados ao uso de biomateriais em neurocirurgias, relacionando-os à formação de aderências peridurais, está associada ao emprego de gordura autógena ou de polímeros diversos e géis à base de quitosana, e não ao filme de quitosana, o que pode implicar no interesse por pesquisas que envolvam a sua aplicabilidade na neurocirurgia experimental humana e veterinária.

É interessante notar que a maioria dos trabalhos relacionados com a quitosana é desenvolvida nos países asiáticos, sendo o Japão, líder incontestável. Mas outras nações como a Coreia, Singapura, Taiwan e Tailândia também têm feito notáveis contribuições. Mais recentemente, a China uniu-se a esse campo de pesquisa para se tornar, cada vez mais, uma fonte de investigação da quitina e quitosana na Ásia (KHOR & LIM, 2003).

A cirurgia da coluna vertebral na medicina veterinária está baseada na descompressão e exploração da medula espinhal, e na fixação vertebral (TUDURY et al, 2001). Entre as causas mais comuns de disfunção toracolumbar nos cães está a hérnia de disco (SEIM, 1996), seguida das neoplasias, discoespondilite, embolismo fibrocartilagenoso e mielopatia degenerativa (SEIM, 1996; CHRISMAN et al., 2005).

A laminectomia dorsal é um dos procedimentos cirúrgicos indicados para aliviar a compressão da medula espinhal que ocorre em fraturas, luxações e exostoses vertebrais, protrusão ou extrusão de discos intervertebrais, hemorragias extra-durais e neoplasias meníngeas (TUDURY et al., 1984).

O canal vertebral na região toracolumbar possui um diâmetro muito estreito se comparado à região cervical. Desta forma, pequenas massas compressivas acarretam em sinais clínicos graves como paralisia dos membros

pélvicos com perda da sensibilidade e da função motora, podendo ser necessária a intervenção cirúrgica (PADILHA FILHO & SELMI, 1999). Já a reintervenção é a fase mais desafiadora para o cirurgião porque além de exigir um tempo cirúrgico maior, devido à dissecação de elementos peridurais circunvizinhos, há o risco mais alto de danos iatrogênicos. Diversas técnicas cirúrgicas e tratamentos têm sido adotados visando minimizar as fibroses peridurais, porém muitas apresentam resultados conflitantes (SONGER et al., 1990).

O termo fibrose peridural ou epidural refere-se à deposição de tecido fibroso no espaço epidural. Esse processo é usualmente causado pela manipulação prévia desse espaço por meio da colocação de catéteres epidurais, ou mais freqüentemente, por intervenções na coluna que envolva a exploração do espaço epidural. Pesquisas têm sido feitas procurando relacionar a presença de extensas fibroses pós-operatórias com dor lombar persistente. Ainda que a fibrose epidural ocorra em graus variáveis, em resposta à manipulação do espaço, inúmeros pacientes não desenvolvem sintomas relacionados à formação de aderências epidurais (HERCULANO et al., 2006). O desenvolvimento de tecido cicatricial epidural depois de uma laminectomia é o resultado da destruição da gordura epidural, de hematoma intra-espinhal e/ou da invasão do canal vertebral pelos músculos epiaxiais (LAROCCA & MACNAB, 1974).

Os procedimentos cirúrgicos na coluna vertebral e crânio resultam freqüentemente na formação de aderências entre tecidos peridurais e a dura-máter, requerendo assim a utilização de barreiras que possam evitar ou minimizar esses acontecimentos (PREUL et al., 2003). Numerosos pesquisadores vêm testando a eficiência de materiais para manutenção de uma barreira entre os músculos e o espaço epidural com o intuito de diminuir a dor pós-operatória e promover uma menor fibrose local (KATO et al., 2005). Barreiras mecânicas em forma de filme ou gel, reguladores químicos do processo de cicatrização, prevenção de hematomas locais (QUIST et al., 1998), enxertos de gordura livre ou pediculados (LANGENSKIÖLD & KIVILVOTO, 1976; JENSEN et al., 1996), filmes e esponjas de gelatina absorvíveis (LAROCCA & MACNAB, 1974), metilmetacrilato (BARBERA et al., 1978; LAWSON et al., 1991), membranas de celulose (COSTA et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2007) e medicamentos locais ou sistêmicos, como metilprednisolona e dexametasona (HINTON et al., 1995), têm

sido utilizados com a finalidade de evitar as aderências e formação de fibroses locais (QUIST et al., 1998; NAROTAM et al., 2004).

Em humanos, o tecido fibroso extradural formado pode estender-se no canal vertebral, aderindo-se à dura-máter e/ou à raiz nervosa causando inclusive, sintomas periódicos de dor (GILL et al., 1985). BURTON (1991) citou que a laminectomia é responsável por cerca de 8% de insucessos em cirurgias espinhais em humanos. Em cães, o principal fator limitante das laminectomias é a largura e o comprimento de exposição da medula espinhal, havendo o risco pós-cirúrgico da sua compressão causada por tecido fibroso (BRISSON et al., 2004).

Não há atualmente nenhum único material aceito como totalmente eficiente para evitar a formação de fibroses e que não cause efeitos colaterais após cirurgia na coluna vertebral em cães e humanos, apesar de existirem inúmeros materiais testados em neurocirurgia. O enxerto de gordura autógena livre (EGAL) parece ser bastante eficiente quando comparado à maioria dos materiais estudados, além de ser o material com maior popularidade para prevenir fibroses em cirurgias espinhais em muitas espécies (TREVOR et al., 1991; KANAMORI et al., 2001a). A eficácia do EGAL na prevenção de fibroses após anestesia epidural, foi demonstrada por JENSEN et al. (1996) e GÖRGÜLÜ et al. (2004). Porém, há vários relatos de complicações significantes após a utilização de EGAL, citando-se principalmente a síndrome da cauda equina em humanos e mielopatia compressiva em cães (PRUSICK et al., 1988; MARTIN-FERRER, 1989; TROTTER, 1990; ÇOBANOĞLU et al., 1995; WHELLER & SHARP, 1999).

A rotina de neurocirurgias na medicina veterinária vem aumentando a cada ano. Devido a isso, novas técnicas estão sendo estudadas além de materiais que possam minimizar as complicações decorrentes de procedimentos neurocirúrgicos.

Este estudo foi realizado para comparar a eficiência do filme à base de quitosana com a gordura autógena visando evitar a formação de aderência entre os músculos epiaxiais e a dura-máter após laminectomia dorsal.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Anatomia da medula espinhal e coluna vertebral

A coluna vertebral estende-se do crânio até a ponta da cauda. Consiste em uma quantidade de ossos, as vértebras, unidos de forma estável, porém não rígidos. As vértebras, em sua maioria, obedecem a um padrão estrutural comum que consiste em um corpo maciço recoberto por um arco, que completa o fechamento de um forame vertebral; é a soma desses forames que constitui o canal vertebral (DYCE et al., 2004).

A medula espinhal (ME) situa-se no canal vertebral, alojada com mais espaço na porção cervical e adequadamente na porção toracolumbar (BOYD, 2002). Estende-se como sendo um prolongamento da medula oblonga no forame magno até a porção caudal das vértebras lombares (DYCE et al., 2004), terminando em média, na 6ª vértebra lombar, com algumas variações entre espécies e raças (WHEELER & SHARP, 1999).

No canal vertebral encontra-se envolvendo as meninges uma significativa quantidade de tecido adiposo epidural e um plexo venoso que, juntamente com o líquido cefalorraquidiano (LCR), protegem a medula espinhal dos efeitos da pressão que surgem em decorrência de movimentos da coluna vertebral (KÖNIG & LIEBICH, 2004). As meninges envolvem o sistema nervoso central (SNC) sendo a mais externa denominada dura-máter, composta de tecido conjuntivo denso. Profundamente a esta, tem-se a aracnóide e mais intimamente a pia-máter, que é uma camada situada diretamente sobre a superfície da medula espinhal (WHEELER & SHARP, 1999). Entre a pia-máter e a aracnóide, há o espaço subaracnóide preenchido com o LCR, o qual é um líquido incolor com um nível muito baixo de proteína e conteúdo celular fluindo principalmente em direção caudal na medula espinhal (JERRAM & DEWEY, 1999a).

A ME é composta pela substância cinzenta central, com cornos ventrais e dorsais, de morfologia semelhante à letra “H”, compostos de corpos celulares neuronais. Apresenta também um canal central que representa a continuação caudal dos ventrículos do encéfalo, o qual é preenchido com LCR como demonstrado na Figura 1. A substância branca situa-se perifericamente e é

formada principalmente por axônios mielinizados em sua maior parte e oligodendrócitos (KÖNIG & LIEBICH, 2004; CHRISMAN et al., 2005).

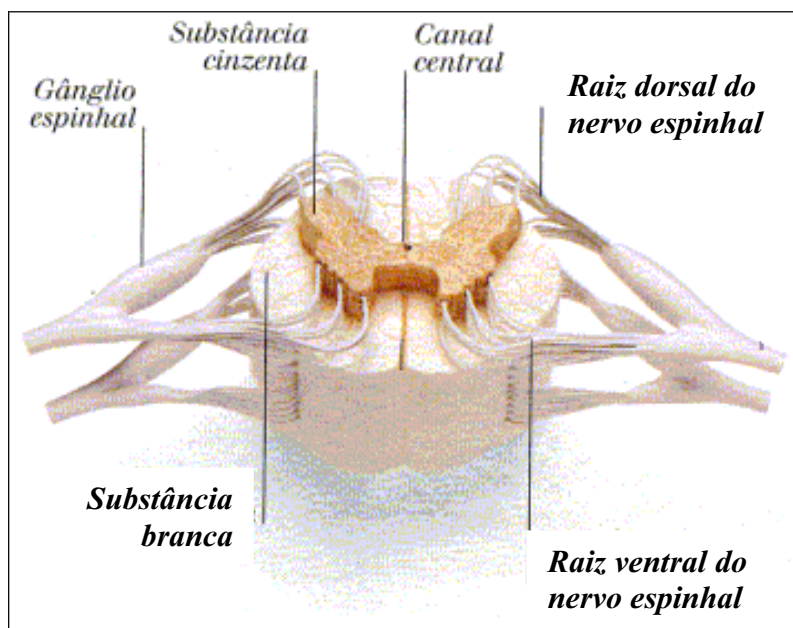


FIGURA 1 – Ilustração de um corte transversal da medula espinhal evidenciando as principais estruturas que a compõem (<http://upload.wikimedia.org> com adaptações).

A ME está localizada dentro do canal vertebral e contém raízes dorsais e ventrais que formam o sistema nervoso periférico (LECOUTEUR & CHILD, 1992). É dividida em regiões compostas por diversos segmentos espinhais. A primeira é a cervical cranial, composta pelos segmentos C1 a C5. Segue-se a região cervical caudal correspondente aos segmentos C6 a T2, que é a região da intumescência cervical, onde se localizam os corpos celulares dos neurônios que comandam os movimentos e a sensibilidade dos membros torácicos. A terceira região, a mais ampla, é a toracolombar, que corresponde aos segmentos T3 a L3. A última região é a lombossacral referente aos segmentos L4 a S3, que corresponde à intumescência lombossacra, onde se localizam os neurônios responsáveis pelos movimentos e sensibilidade dos membros pélvicos, além das funções do esfíncter anal externo e vesical. Estes segmentos não correspondem às vértebras de mesmo número (LECOUTEUR & CHILD, 1992, WHEELER & SHARP, 1999; CHRISMAN et al., 2005) como representado na Figura 2.

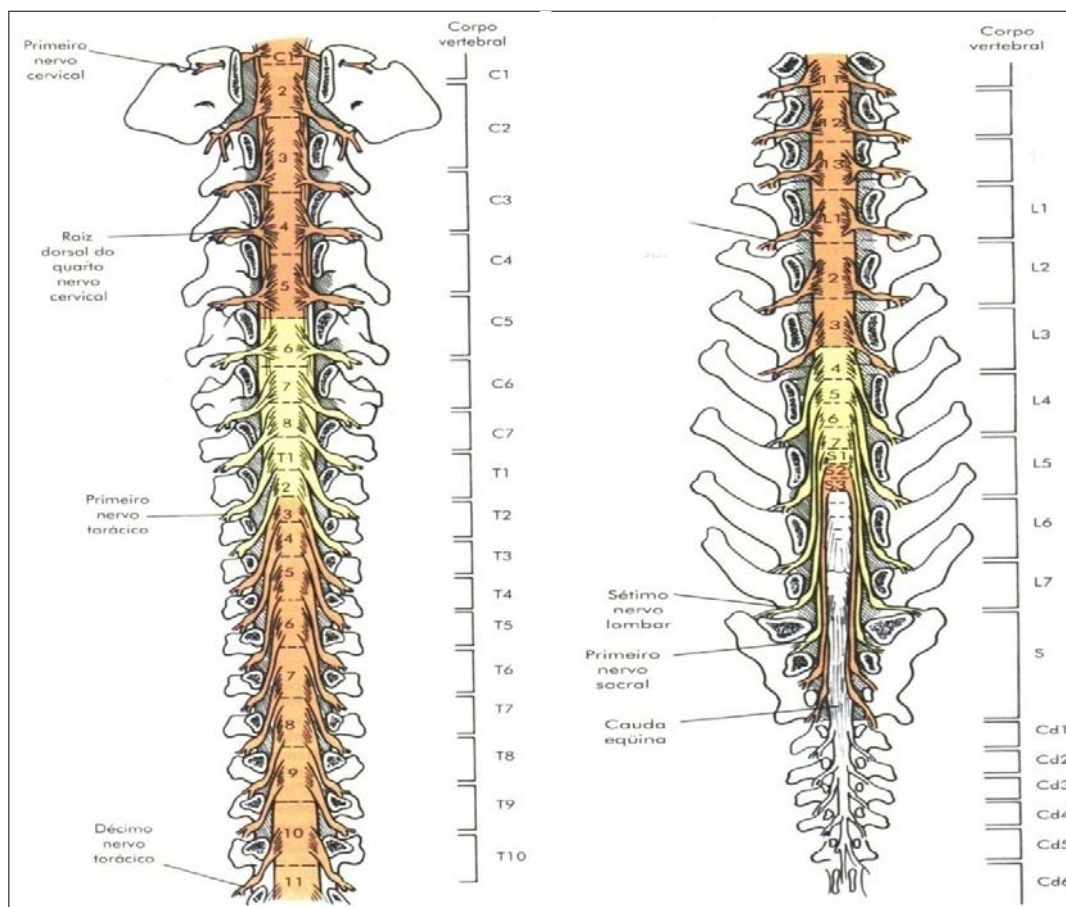


FIGURA 2 – Ilustração da medula espinhal após a retirada da lâmina dorsal, mostrando a relação dos segmentos com os corpos vertebrais (SEIM In: FOSSUM, 2005).

O segmento craniocervical (C1-C5) está localizado nos corpos vertebrais C1-C4; o segmento caudocervical (C6-T2) em C5-T1; o segmento toracolumbar (T3-L3) em T2-L3; e o segmento lombossacral (L4-S3) em L4-L6 (FOSSUM, 2005).

Com exceção das duas primeiras vértebras cervicais e das vértebras sacrais fusionadas, os corpos vertebrais são articulados por meio de discos intervertebrais e por seus processos articulares, cuja articulação é classificada como sinovial (WHEELER & SHARP, 1999).

2.2 Abordagem cirúrgica da coluna toracolumbar

A abordagem dorsal da coluna toracolumbar está indicada para a prática de laminectomia e hemilaminectomia dorsais, fenestração de discos intervertebrais, redução de fraturas e luxações toracolumbares (SLATTER, 1998).

Em um estudo conduzido por MUIR et al. (1995) foi notado que cães com doença do disco intervertebral que passaram por hemilaminectomia, apresentaram significativa melhora na recuperação da função neurológica quando comparados aos submetidos à laminectomia dorsal que requer dissecção muscular mais extensa.

A pediclectomia, que é a remoção do osso lateral entre o corpo vertebral e o processo articular promove menor desestabilização e manipulação da medula se comparada à hemilaminectomia ou laminectomia dorsal, promovendo ainda descompressão da medula e remoção do material extravasado. Outras vantagens desta técnica estão relacionadas a um menor tempo cirúrgico e mínima hemorragia (JERRAM & DEWEY, 1999b).

2.2.1 Laminectomia dorsal

JERRAM e DEWEY (1999b) definem a laminectomia dorsal como a remoção dorsal e/ou dorsolateral do arco vertebral. Este procedimento só promove acesso dorsal, assim, quando há necessidade de remoção de material localizado no assoalho do canal vertebral, deve-se manipular a ME. Devido a isso, essa técnica tem sido modificada acrescentando-se extrações de porções do processo articular e lâmina dorsolateral, para evitar complicações pós-operatórias como compressão da ME por tecido fibrótico.

A preocupação principal depois que se realiza uma laminectomia é a formação de tecido cicatricial sobre a medula espinhal que pode resultar em compressão extradural ou pode fazer com que seja necessário reintervir para promover a descompressão numa área de difícil acesso, o que torna o procedimento perigoso (HIRAIZUMI et al., 1997).

A formação progressiva da fibrose e a concentração de tecido cicatricial ao redor da dura-máter e raízes nervosas expostas cirurgicamente foi implicada por muito tempo como uma das causas principais de dor pós-laminectomia (LEE et al., 1990). ATLAS et al. (1996) observaram que em aproximadamente 800.000 pacientes humanos submetidos à cirurgias lombares por ano mundialmente, 5% a 40% apresentaram episódios de dor e limitações em suas atividades. Enquanto PREUL et al. (2003) salientaram que aproximadamente 15% dos pacientes

seriam submetidos a uma reintervenção dentro de cinco anos após a cirurgia inicial.

2.3 Biomateriais em neurocirurgia

Os biomateriais do tipo biodegradáveis podem ser classificados como suportes (*scaffolds*) ou como barreiras (METTLER, 2004). DALLAN (2005) descreveram que no caso dos suportes, os filmes atuam como matrizes para o crescimento de células, sendo degradados por enzimas ou pelo próprio meio fisiológico ao longo do processo de cicatrização. Já os do tipo barreira não devem favorecer a aderência sobre suas superfícies, possuindo como principais funções a proteção física.

Para o bom desempenho dos biomateriais, características adequadas como flexibilidade, resistência mecânica e permeabilidade são fundamentais. Por serem biodegradáveis e absorvidos pelo organismo ao longo do processo de cicatrização, não é necessária a sua retirada (DALLAN, 2005).

A procura por um material para reparar defeitos na dura-máter tem envolvido pesquisas com diversos produtos como materiais biológicos e sintéticos. Inicialmente, metais inertes como ouro, prata, platina, alumínio, níquel, aço e tantálio eram usados. Porém, a maioria desses metais era encapsulada e formava uma forte aderência, resultando no seu abandono, o que favoreceu o uso de membranas orgânicas (BERJANO et al., 1999).

Vários enxertos autólogos como músculos, gordura, pele, peritônio, periósteo, saco herniário, túnica vaginal, outros enxertos xenólogos como peritônio de cães, intestino de ovelha já foram utilizados na forma de membranas orgânicas para o reparo da dura-máter, porém, a maioria destes está relacionados a aderências extensas entre a dura-máter e o córtex cerebral ou medula espinhal (THADANI et al., 1988). A fáscia temporal e a fáscia lata foram amplamente utilizadas como substitutos de dura-máter porque não induziam reações inflamatórias imunológicas severas (WARREN et al., 2000; YAMADA et al., 1997). Porém, quantidades suficientes destes materiais nem sempre podem estar disponíveis e uma segunda intervenção pode ser requerida para colher outros fragmentos do material (NAROTAM et al., 1995).

GILL et al. (1979) estudaram cães submetidos à laminectomias e afirmaram que o enxerto de gordura livre oferece melhor proteção na prevenção de cicatrizes peridurais que outros implantes, tais como plástico, polietileno em forma de esponja, filme e gel. Já LEE & ALEXANDER (1984) submeteram cães a laminectomia dorsal entre L5 e L6 e posteriormente ocluíram a janela com filme ou esponja de ácido polilático (PLA), notando a superioridade da esponja sobre o outro utilizado, por ser completamente biocompatível e lentamente biodegradável. Em outro estudo, HERCULANO et al. (2006) submeteram ratos à laminectomia nos segmentos torácico e lombar com interposição da membrana biológica constituída de cortical óssea bovina descalcificada notando a superioridade deste biomaterial funcionando como barreira mecânica evitando assim aderências entre o tecido fibroso e a medula espinhal.

Idealmente, um dispositivo de dupla função, que além de reduzir o extravasamento pós-operatório de LCR, também previna fibroses peridurais seria apresentado como um novo paradigma de tratamento para neurocirurgias e cirurgias ortopédicas (HAWK & KIM, 2000).

Com a técnica de regeneração tecidual guiada, muitas membranas têm sido desenvolvidas e aperfeiçoadas para serem utilizadas como barreira física. Essa evolução caminhou para o desenvolvimento de membranas reabsorvíveis, como a de colágeno tipo I bovino, ácido polilático e várias outras utilizadas com resultados satisfatórios em diversos tipos de defeitos ósseos e de tratamentos cirúrgicos (BOSACCO et al., 2001).

Um material em forma de gel reabsorvível derivado de um poliglicano demonstrou efetividade na redução de fibroses peridurais e aderências pós-operatórias, retardando o reparo de defeitos na dura-máter (ARROTEGUI & LLOMBART, 2004). Outro material bastante utilizado para a restauração de dura-máter craniana e espinhal é a matriz de colágeno a qual é uma barreira segura e efetiva. Tal material promove a reparação de defeitos de dura-máter com total vedação não deixando fluir LCR além do sítio de aplicação do biomaterial (ARROTEGUI & LLOMBART, 2004).

2.3.1 Enxerto de gordura autógena

O enxerto de gordura autógena livre (EGAL) é aceito como um material capaz de evitar possíveis fibroses epidurais após descompressão cirúrgica de tecido neural, sendo superior a diversos materiais utilizados com esse intuito (TSUJI, 1991). Nas primeiras décadas do século XIX, foi iniciada a utilização do enxerto de gordura subcutânea na tentativa de inibir ou prevenir fibroses perineurais após laminectomias lombares (KANAMORI et al., 2001b). Desde então, o EGAL tornou-se um dos métodos mais populares de barreira, sendo geralmente utilizado na prática diária de cirurgias descompressivas da coluna vertebral (KANAMORI et al., 2001a). Porém, os resultados informados a cerca do seu uso são variados havendo alguma dúvida sobre sua proteção contra a formação de fibroses (LANGENSKIOLD & KIVILVOTO, 1976; JENSEN et al., 1996; BERNSMANN et al., 2001). Vários estudos experimentais e clínicos com exames histológicos, tomografia computadorizada (TC) pós-operatória e imagem de ressonância magnética (IRM), demonstraram viabilidade do enxerto de gordura com revascularização e redução do tecido cicatricial (KANAMORI et al., 2001a; KANAMORI et al., 2001b; GÖRGÜLÜ et al., 2004).

O EGAL pode reduzir a extensão do tecido cicatricial depois do procedimento cirúrgico, mas não proporciona melhor resultado clínico (JENSEN et al., 1996; BERNSMANN et al., 2001). O uso desse enxerto também não é livre de complicações, ou seja, a compressão da dura-máter pelo enxerto ocorre freqüentemente após descompressões, resultando em compressão sintomática de uma raiz nervosa ou da espinha dorsal por migração no espaço epidural (QUIST et al., 1998). Estas complicações além de outras como, a formação de hematoma anterior à gordura enxertada e compressão direta devido aos músculos para-espinhais que comprimem esse enxerto contra a dura-máter foram observadas precocemente no período pós-operatório. Desta forma, as utilizações do EGAL para a prevenção da formação de tecido cicatricial em cirurgia de disco lombar além de não melhorar o resultado clínico, não parece ser mais segura que outros métodos (GÖRGÜLÜ et al., 2004) podendo ocorrer também necrose do implante (QUIST et al., 1998).

A utilização do EGAL para cobrir defeitos de laminectomias segundo COSTA et al. (2006) foi parcialmente efetiva na prevenção da formação de aderências, porém foi associada com uma taxa mais alta de déficits neurológicos e mudanças na conformação da medula espinhal em cães. Por este motivo, é recomendado que o EGAL seja evitado ao executar a laminectomia dorsal modificada na região toracolombar em cães (TUDURY et al., 1984).

KANAMORI et al. (2001a) demonstraram experimentalmente e clinicamente que, embora os EGAL apresentem redução de aproximadamente 30% a 50% do seu tamanho original com o tempo, permanecem viáveis preservando o aparecimento característico de gordura epidural normal, conforme verificado por tomografia computadorizada. Já em outro estudo, KANAMORI et al. (2001b) demonstraram que o tamanho do EGAL foi reduzido em aproximadamente 57% depois de 42 dias, e para aproximadamente 33% depois de um ano, quando comparado com o terceiro dia depois de cirurgia, de acordo com resultados de IRM.

Embora não exista nenhuma diretriz para determinação do tamanho do EGAL, os enxertos de gordura únicos e grandes parecem sobreviver melhor que múltiplas partículas, mas devido à compressão nervosa ser um perigo constante, os cirurgiões evitam usar um enxerto de gordura muito grande (BERNSMANN et al., 2001). Apesar da manutenção da viabilidade dos EGAL, tem sido mostrado que enxertos pequenos podem ser ineficazes devido a sua redução de volume depois da cirurgia. Habitualmente é recomendado enxerto de gordura de 5 mm de espessura. Deste tamanho, a gordura enxertada protege a dura-máter suficientemente e permite alguma diminuição do enxerto sem formação excessiva de tecidos fibrosos (KANAMORI et al., 2001a; COSTA et al., 2006).

2.3.2 Biomateriais à base de Quitosana

A quitosana é um polissacarídeo de cadeia longa, absorvível, atóxico, que em estudos preliminares em ratos com a terapia combinada entre gel e soluções, reduziu a incidência de aderências após procedimentos cirúrgicos intestinais (ZHOU et al., 2004). Este mesmo polissacarídeo, sintetizado originalmente para tratamento de lesões cutâneas, tem despertado a atenção de

vários cirurgiões, por formar uma barreira física sobre a superfície cirurgicamente danificada (CHATELET, 2000; ZHOU et al., 2004).

A quitosana é um polímero natural, obtido pela desacetilação da quitina e apresenta reconhecida propriedade antimicrobiana, bactericida, bacteriostática, fungicida, fungistática e auxiliar da cicatrização (CRAVEIRO & CRAVEIRO, 2000). Devido à disponibilidade mundial desta matéria-prima, são encontrados na literatura diversos métodos para a extração e a caracterização da quitina, principalmente aquela proveniente da carapaça de crustáceos, além de métodos para a obtenção e a caracterização da quitosana e de membranas à base de quitosana com aplicação em processos de reparação cutânea atuando como pele artificial (DALLAN, 2005). Sua capacidade de atuar como material biocompatível inócuo tem sido amplamente demonstrada. Foram relatados resultados efetivos a respeito da penetrabilidade osteoblástica nas membranas porosas de quitosana em diferentes concentrações (BERNABEU et al., 2005).

A quitosana é biocompatível e naturalmente degradada no organismo (o monômero e os oligômeros de glucosamina são substâncias que participam de rotas do metabolismo animal), apresentando a propriedade de formar géis em soluções ácidas fracas, o que possibilita sua utilização em formulações farmacêuticas para aplicações tópicas em ferimentos, queimaduras e/ou vesículas oriundas de agressões fúngicas ou bacterianas (CHANDY & SHARMA, 1990; RAO & SHARMA, 1997; CRAVEIRO & CRAVEIRO, 2000; KHOR & LIM, 2003). Este polissacarídeo apresenta diversas características interessantes, entre elas, a redução do tempo de cicatrização de lesões provenientes de agressões físicas como, por exemplo, ferimentos ou queimaduras. A quitosana estimula a proliferação e a reorganização celular (MUZZARELLI et al., 1988; YOSOF et al., 2001), também conferindo excelente resistência mecânica aos biomateriais produzidos a partir de seu uso (DALLAN, 2005).

Foi obtido sucesso após o uso do gel de quitosana em anastomose aórtica (COSTAIN, 1997), anastomoses do intestino grosso, miorráfias e na inibição da formação de aderências pós-cirúrgicas em ratos (ZHOU et al., 2004). Sucesso também foi obtido após o uso do gel de quitosana na diminuição da formação de aderências em coelhos submetidos à enterotomias cecais e colônicas (COSTAIN, 1997).

CHEN et al. (2006) salientaram que a quitosana apresentou atividade similar aos glicosaminoglicanos, demonstrando o seu efeito inibitório sobre a apoptose de condrócitos. Esta ação da quitosana foi atribuída à possível proteção da função mitocondrial e antioxidante, baixando os níveis de óxido nítrico e de outros agentes oxidantes.

FREIER et al. (2005) relataram que a quitosana desacetilada a 0,5% e 11% em forma de tubo para condução, aumentou a viabilidade e otimizou a compatibilidade de células nervosas. Em outro estudo conduzido por WANG et al. (1998), avaliaram o cultivo de células tronco neurais derivadas do córtex fetal de ratos e cultivados com quitosana. Neste estudo, os resultados demostraram uma maior proliferação das células-tronco neurais sendo que a maioria dessas células era diferenciada em células tipo neurônio após quatro dias de cultura. Com base nestes dados, foram feitos tubos de condução flexíveis a base de quitosana para aplicações em lesões medulares curtas e defeitos de nervos periféricos analisados apenas *in vitro* com bons resultados.

ROSALES-CORTÉS et al. (2003) avaliaram a reação imunológica à quitosana demonstrando a não indução de resposta imunológica, pois os níveis séricos de IgG e IgM do sangue periférico não apresentaram alterações significativas quando comparados aos pacientes do grupo controle.

Já PAULO et al. (2009) demonstraram a eficiência do filme à base de quitosana na prevenção de aderências abdominais em ratos porem foi constatada grande quantidade de macrófagos, presença de células gigantes e proliferação de fibroblastos sob o filme.

A quitosana é um biomaterial promissor e à medida que a engenharia de tecidos aumentar o seu leque de aplicações biomédicas, novas investigações deste biomaterial serão conduzidas (KHOR & LIM, 2003).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local

O estudo foi realizado no Hospital Veterinário da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás (HV/EV/UFG) em colaboração com a Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) e o Laboratório de Análises Clínicas do HV/EV/UFG, no período de março de 2008 a maio de 2009.

3.2 Animais de experimentação

Foram utilizados 24 coelhos machos de pelagem branca da raça Nova Zelândia, espécie *Oryctolagus cuniculus*, saudáveis com peso corpóreo médio de 3200g, obtidos de um criatório particular localizado na cidade de Brasília-DF.

Anteriormente à realização do estudo experimental os animais foram avaliados clinicamente para exclusão de qualquer anormalidade sistêmica, anatômica ou neural que pudessem interferir nos resultados.

3.3 Manejo dos animais

Todos os animais foram identificados com brinco numerado na orelha direita. Ao chegarem ao biotério, previamente à transferência para as gaiolas, os animais foram separados, por sorteio, em dois grupos de tratamentos.

Os coelhos foram alojados no biotério de cirurgia experimental em roedores da EV/UFG, o qual possui ambiente climatizado com temperatura média de 25°C, com gaiolas próprias para a espécie sub-divididas em oito compartimentos, ficando separados individualmente.

Para a realização dos curativos locais diários no pós-operatório foi utilizada uma bancada com localização próxima as gaiolas.

O manejo hídrico foi feito com água à vontade sendo trocada duas vezes ao dia. O manejo alimentar foi com fornecimento, duas vezes ao dia, de ração comercial balanceada e própria para espécie. A rotina diária de manejo incluía a

limpeza local com água, sabão e desinfetante, e higienização das gaiolas, comedouros e bebedouros.

Todos os procedimentos foram conduzidos conforme recomendação e normas estabelecidas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

3.4 Avaliações clínicas pré-operatórias

Um animal de cada grupo, escolhido aleatoriamente, foi submetido à radiografia simples. Sob anestesia geral foi feita a colheita de líquido cefalorraquidiano e mielografia para avaliação laboratorial e do posicionamento radiográfico.

A punção venosa foi feita na veia safena lateral sendo obtidos dois mililitros de sangue para análise hematológica, que constou de hemograma, níveis de proteínas totais plasmáticas e fibrinogênio de todos os animais de cada grupo. Estes exames foram realizados cinco dias antes do procedimento cirúrgico.

Os exames pré-operatórios como radiografia simples, análise líquórica e mielografia foram realizados em apenas um animal de cada grupo escolhido aleatoriamente. O exame radiográfico simples foi realizado no animal sob anestesia geral nas posições látero-lateral direita e ventro-dorsal, ambas sob tração linear da coluna vertebral. Posteriormente, após tricotomia local prévia, foi realizada punção na cisterna magna com agulha raqui-espinhal (Agulha para injeção raquidiana 22G x 1_{1/2}" - Med Epidural, Manaus-AM) para colheita do líquido e sua análise. Concomitantemente, para realização da mielografia foi injetado 0,3 mililitros por quilo de Iopamidol (Iopamiron[®] 370 – Shering, São Paulo-SP) através da mesma agulha utilizada para colheita do líquido conforme mostrado na Figura 3.

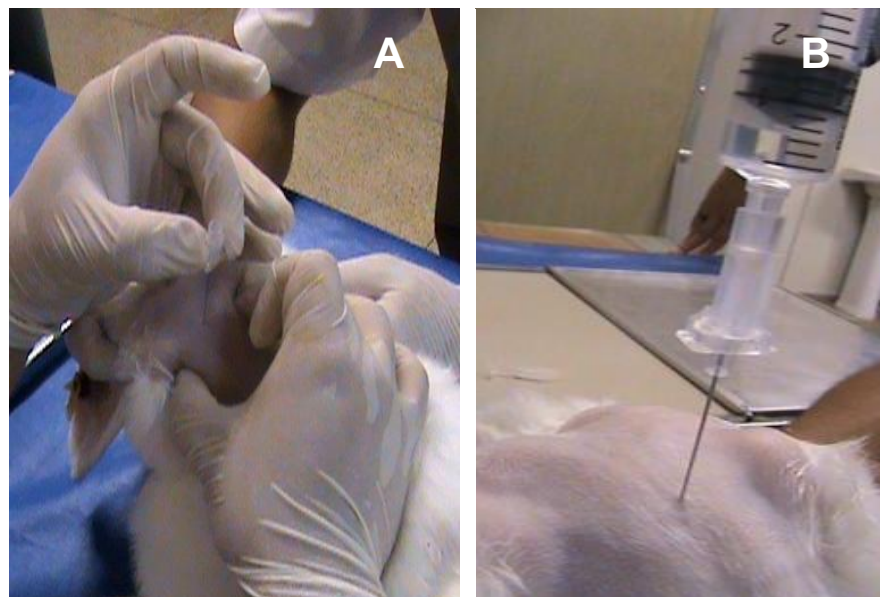


FIGURA 3 – **A.** Punção na cisterna magna do espaço subaracnóide do coelho para colheita do líquido e injeção do contraste para mielografia. **B.** Injeção do contraste através do cateter introduzido na cisterna magna do coelho.

3.5 Tratamentos

Os 24 animais foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos: gordura (G) e quitosana (Q) com 12 animais respectivamente. Nos animais pertencentes ao grupo G foi utilizada a gordura autógena e nos pertencentes ao grupo Q, o filme à base de quitosana. Como cada grupo foi constituído de doze animais, estes foram subdivididos em dois subgrupos de seis (G15, Q15, G30, Q30), diferenciando o período de avaliação conforme descritos na Tabela 1.

TABELA 1 – Distribuição dos grupos em função do implante utilizado e o período para análise mielográfica e histopatológica.

GRUPOS	Quantidade de animais
G15 (Gordura 15 dias)	6 animais
Q15 (Quitosana 15 dias)	6 animais
G30 (Gordura 30 dias)	6 animais
Q30 (Quitosana 30 dias)	6 animais
TOTAL	24 animais

Os protocolos anestésicos, cirúrgicos e de pós-operatórios foram os mesmos para os grupos.

3.5.1 Materiais utilizados

Foi utilizado um fragmento único de gordura autógena de aproximadamente dois centímetros quadrados retirado do coxim adiposo localizado entre a margem dorsal das escápulas direita e esquerda sobre o músculo trapézio (Figura 4).



FIGURA 4 – Sítio de colheita do enxerto de gordura autógena (seta).
Imagem obtida de um coelho *pós-mortem*.

Os filmes à base de quitosana tinham 2,0 x 1,0cm de comprimento por 0,5mm de espessura. Foram fornecidos pelo Departamento de Processos Biotecnológicos da Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), São Paulo. Anteriormente a sua implantação, eram hidratados com solução fisiológica 0,9% (Solução Fisiológica 0.9% - Baxter Hospitalar, São Paulo-SP) e colocados na janela confeccionada cirurgicamente (Figura 5).

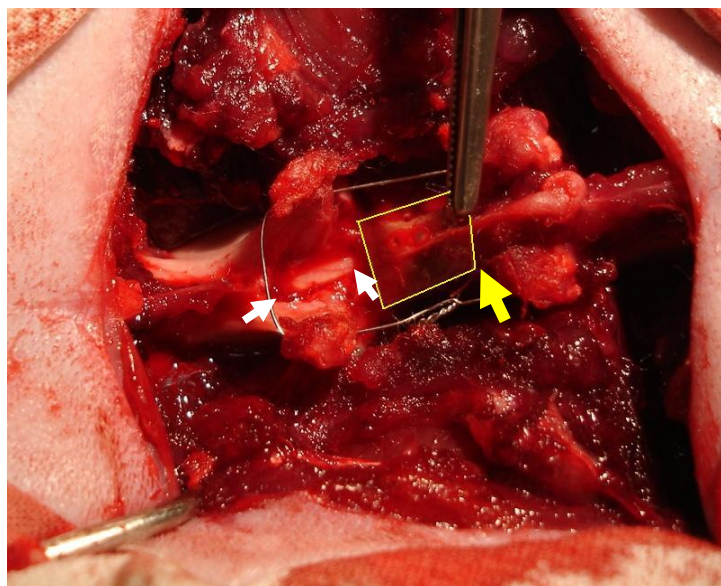


FIGURA 5 – Laminectomia dorsal confeccionada entre L1 e L2 (setas) e o filme à base de quitosana (seta larga) utilizado para ocluir a janela feita entre as vértebras.

3.6 Procedimentos pré-cirúrgicos e cirúrgicos

3.6.1 Pré-operatório

No período pré-operatório foi realizado jejum hídrico e alimentar de uma hora, tricotomia de toda região dorsal da coluna vertebral, do local de punção venosa (veia auricular lateral) e local da punção na cisterna magna para colheita do líquido.

3.6.2 Protocolo Anestésico

Os animais foram contidos em caixas de transporte para serem encaminhados à sala de preparo do centro cirúrgico de pequenos animais do HV/EV/UFG. Como medicação pré-anestésica foi utilizado o cloridrato de xilazina (Calmun® – Agener União Saúde Animal, São Paulo-SP) na dose de 1mg/kg e cloridrato de morfina (Dolomorf® – União Química, Jabaquara-SP) 2mg/kg por via intramuscular. Após 15 minutos foi realizada a punção da veia auricular lateral com cateter intravascular periférico radiopaco 24G (Jelco® - Johnson&Johnson

Lenneke Marelaan, Bélgica) seguida da administração de fluidoterapia por meio de equipo microgotas para infusão de solução de ringer com lactato (Solução de Ringer com Lactato - Frezenius Kabi Brasil, Aquiraz-CE). Foi realizada a indução anestésica com propofol (Propovan 1% - Cristália, Itapira-SP) na dose de 10mg/kg por via endovenosa. Concomitantemente foi feita a intubação orotraqueal com tubo endotraqueal (Tubo traqueal sem balão tamanho 2,5mm – Rusch, Uruguai) e manutenção anestésica com halotano (Tanohalo – Cristália, Itapira-SP).

A antibioticoterapia profilática constituiu-se de enrofloxacin (Chemitril 2,5% - Chemitec, São Paulo-SP) na dose de 10mg/kg por via intramuscular em dose única, 20 minutos antes do início do procedimento cirúrgico.

3.6.3 Técnica cirúrgica

A técnica cirúrgica de abordagem do canal vertebral e síntese foi igual para todos os animais. Eles foram posicionados em decúbito ventral com um colchão posicionado abaixo da 13ª costela para elevar L1 e L2 onde foi realizada a laminectomia. Posteriormente os animais foram fixados à mesa cirúrgica com fitas de esparadrapo (Figura 6).



FIGURA 6 – Coelho posicionado na mesa cirúrgica para realização da laminectomia dorsal.

Foi realizada a anti-sepsia do campo operatório com iodopovidona degermante (Riodeine degermante® – Rioquímica Indústria Farmacêutica, São José do Rio Preto-SP), álcool etílico (Álcool Fino 70% - Miyako do Brasil,

Guarulhos-SP) e iodopovidona tópico (Riodeine tópico® – Rioquímica Indústria Farmacêutica, São José do Rio Preto-SP), seguida do adequado posicionamento dos panos de campo.

O acesso tóraco-lombar foi realizado por meio de uma incisão longitudinal dorsal desde T11 até L4, seguida da divulsão do tecido subcutâneo e localização da fáscia lombar que foi incisada sobre os processos espinhosos das vértebras. Posteriormente realizou-se a divulsão romba dos músculos epiaxiais até abordagem e localização dos processos espinhosos e articulares de T13, L1, L2 e L3.

A laminectomia foi realizada nos dois grupos com o emprego da mesma técnica. Após a localização dos processos espinhosos, articulares e acessórios das vértebras T13, L1, L2 e L3, realizou-se a osteotomia do processo espinhoso da vértebra L1 com goiva biarticulada de Love a fim de alcançar a medula espinhal. Posteriormente foi utilizada a pinça de Lowe-Kerrinson de 2mm para retirada da lamina dorsal, tornando exposta a gordura peridural a qual foi afastada por meio de cureta odontológica de Graice, para exposição da dura-máter. A laminectomia confeccionada media um centímetro de comprimento por 0,5 centímetro de largura, conforme Figura 7.

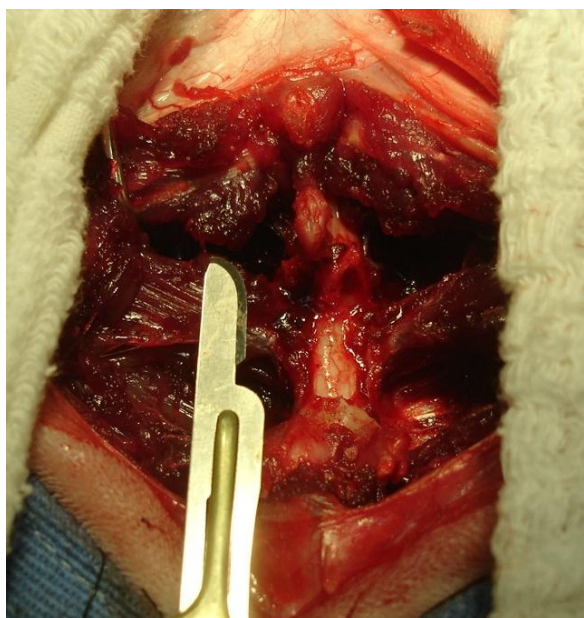


FIGURA 7 – Aspecto final da laminectomia dorsal em coelho feita entre o espaço interarcual L1 – L2.

Foi utilizado um fragmento de gordura autógena de aproximadamente três centímetros quadrados (Grupo G) e o filme à base de quitosana (Grupo Q) para obliterar a janela feita na lâmina dorsal da vértebra. Seguiu-se a estabilização vertebral utilizando um fio de aço cirúrgico (Aço cirúrgico nº1 – Paramed suturas, São Paulo-SP) envolvendo os processos articulares das vértebras adjacentes ao local onde foi feita a laminectomia.

A fáscia tóraco-lombar foi suturada com ponto contínuo simples com fio de náilon (Nylon agulhado 2-0 – Shalon, São Luis dos Montes Belos-GO), a aproximação do tecido subcutâneo foi com pontos tipo Cushing e fio de náilon (Nylon agulhado 3-0 – Shalon, São Luis dos Montes Belos-GO) e a dermorrafia com pontos tipo colchoeiro com fio de náilon (Nylon agulhado 4-0 – Shalon, São Luiz dos Montes Belos-GO).

3.6.4 Acompanhamento pós-operatório

Como analgesia pós-operatória foi administrado cloridrato de morfina (Dolomorf® - União Química, Jabaquara-SP) na dose de 1mg/kg por via subcutânea uma vez ao dia, iniciando imediatamente após a realização da laminectomia e perdurando por três dias. Os curativos locais foram realizados com álcool etílico (Álcool fino 70% - Miyako do Brasil, Guarulhos-SP) uma vez ao dia, até a cicatrização clínica da ferida.

Não foi utilizado antiinflamatório para não influenciar nos resultados.

Os animais recebiam alimentação duas vezes ao dia e água *ad libitum*, permanecendo em repouso nas gaiolas descritas anteriormente.

3.7 Protocolos de avaliação *ante-mortem*

Após o período correspondente a cada tratamento, os animais foram submetidos à radiografia simples e mielografia para avaliação de compressão mecânica pelo implante ou pela formação de tecido fibroso.

A análise mielográfica foi feita do mesmo modo em todos os grupos, diferenciando o período de avaliação conforme Tabela 2.

TABELA 2 – Distribuição dos grupos em função dos dias e quantidade de animais em que foram feitos os exames mielográficos.

Grupos avaliados	Momento da avaliação	Número de animais
G15	15 dias	6 animais
Q15	15 dias	6 animais
G30	30 dias	6 animais
Q30	30 dias	6 animais

Para realização deste procedimento utilizou-se o mesmo protocolo anestésico anteriormente descrito. Posteriormente, fez-se a punção da cisterna magna com agulha raqui-espinhal (Agulha para injeção raquidiana 22G x 1 $\frac{1}{2}$ " - Med Epidural, Manaus_AM) e injeção, através dessa agulha, de 0,3mL por quilo de iopamidol (Iopamiron[®] 370 – Shering, São Paulo-SP) em cada animal. Foram avaliados os graus de compressão ou não no sítio da laminectomia, considerando principalmente se houve compressão dorsal pelo implante ou pela instabilidade vertebral.

Para tabulação dos resultados de cada animal, foi adotada a classificação conforme escore adaptado de COSTA et al. (2006) (Quadro 1).

QUADRO 1 – Distribuição e classificação dos graus de compressão em função dos achados encontrados no exame mielográfico.

Classificação da compressão em graus	Achados mielográficos
0	Sem compressão da coluna de contraste.
1	Compressão leve com perda da coluna de contraste dorsal e/ou compressão medular de até 20% e sem instabilidade vertebral.
2	Compressão moderada entre 21 a 50% do diâmetro da coluna de contraste medular e sem instabilidade vertebral.
3	Compressão grave e evidente da medula espinhal acima de 51% com ou sem instabilidade vertebral.

Os resultados da mielografia foram avaliados com os testes de Kruskal-Wallis e Mann-Witney, sendo que valores de $p \leq 0,05$ foram considerados significantes.

3.8 Eutanásia

Ao final dos tratamentos e avaliações, todos os animais foram submetidos à eutanásia em câmara de CO₂. Este procedimento foi realizado nos animais previamente anestesiados com tiletamina + zolazepam (Zoletil® 100 – Virbac Saúde Animal, São Paulo-SP) na dose de 5mg/Kg por via intramuscular.

3.9 Estudo histopatológico

Imediatamente após a eutanásia, todos os animais foram submetidos à necropsia com colheita de tecidos da coluna vertebral toracolombar, para análises histopatológicas, morfológicas e da formação de aderências peridurais após a laminectomia. Para essa avaliação foi selecionada a coluna vertebral de cada coelho, abrangendo os tecidos perivertebrais como a área em que a amostra de tecido continha a medula espinhal, a dura-máter, lâminas laterais, arco ventral e o corpo da vértebra, além do implante utilizado em cada grupo avaliado.

Os tecidos colhidos foram transferidos para frascos contendo formol tamponado a 10% na proporção de 20 vezes o volume do fixador em relação ao volume da peça para sua fixação, sendo devidamente identificados com os brincos auriculares dos coelhos. Os tecidos ficaram imersos neste líquido por aproximadamente 96 horas. Os materiais conservados foram cortados ao meio e transferidos para recipientes menores sendo imersos novamente em solução de formol tamponado a 10% onde permaneceram até o momento do processamento histológico que foi realizado conforme a rotina do Laboratório de histopatologia do ICB/UFG.

Os blocos foram recortados transversalmente no sítio em que foi realizado o procedimento cirúrgico. As peças histológicas continham a musculatura epiaxial, a região do implante, a medula espinhal, os processos

laterais do canal vertebral e o corpo da vértebra. Este material foi colocado em formol tamponado a 10% para posteriormente ser descalcificado.

Fez-se a descalcificação dos tecidos, seguida da sua desidratação em álcool etílico (Álcool etílico absoluto 99,5% P.A. – Cromato produtos químicos LTDA., Diadema-SP) em série crescente de 70% até álcool absoluto. A clarificação da peça foi em xilol (Xileno P.A. – Cromato produtos químicos LTDA., Diadema-SP), sendo posteriormente incluída em parafina histológica com ponto de fusão a 56°C.

Na etapa seguinte, as amostras colhidas foram recortadas e emblocadas, numa espessura de 6µm em micrótomo rotativo. Os cortes obtidos foram corados pela hematoxilina e eosina (HE). Para montagem das lâminas empregou-se solução de tolueno.

As lâminas foram examinadas em fotomicroscópio óptico de campo claro, sendo as imagens selecionadas registradas por máquina fotográfica acoplada ao microscópio e armazenadas digitalmente.

Para a leitura das lâminas foram analisadas as intensidades das aderências, sendo as mesmas classificadas através do escore adaptados segundo RODGERS et al. (2003), descrito no Quadro 2.

QUADRO 2 – Distribuição dos graus de aderência em função da classificação da aderência e alterações encontradas nos cortes histológicos.

Graus de aderência	Classificação da aderência	Alterações encontradas
0	Ausente	Ausência de aderências.
1	Mínima	Aderências com poucas áreas de fibrose sobre a dura-máter (menos 29%).
2	Moderada	Aderências com áreas de fibrose sobre a dura-máter (de 30% a 70%).
3	Intensa	Aderências sobre a dura-máter (mais de 70%) com espessamento, e aumento do espaço subaracnóide.

As lâminas foram avaliadas de acordo com a reação inflamatória produzida pelo implante segundo critérios adaptados de BARROS FILHO et al. (2003) conforme o Quadro 3.

QUADRO 3 – Distribuição dos graus de reação inflamatória em função da quantidade de células encontradas nos cortes histológicos.

Grau da reação inflamatória	Tipo de resposta inflamatória	Parâmetros Avaliados
0	Ausente	Ausência de heterófilos
1	Discreta	Infiltrado inflamatório com mononucleares e polimorfonucleares
2	Moderada	Infiltrado inflamatório e reação tipo corpo estranho circundando o implante
3	Intensa	Infiltrado inflamatório circundando o implante numa espessura de 2 a 3 vezes o tamanho do implante.

3.10 Análise estatística

A verificação da formação de aderências foi avaliada de forma qualitativa, ou seja, foram estipulados escores para os níveis de aderências entre o filme de quitosana e a dura-máter e entre a gordura autógena e a dura-máter. Os escores obtidos foram avaliados por grupo quanto à média, desvio padrão e erro padrão da média. Além disso, os grupos foram comparados entre si, partindo-se da hipótese que eram diferentes entre si, utilizando o teste de Kruskal-Wallis para se avaliar e comparar o efeito dos diferentes tratamentos e o teste de Mann-Whitney para comparação entre dois subgrupos.

Para avaliação dos dados qualitativos obtidos na microscopia, utilizou-se também os testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney, considerando-se 5% o nível crítico para estabelecer as diferenças estatisticamente significativas.

Todos os dados foram submetidos à análise estatística por meio do programa SigmaStat 3.0.

4 RESULTADOS

Durante o experimento, houve perda de dois animais em decorrência de problemas respiratórios ocorridos no período de adaptação ao ambiente, quatro durante os procedimentos cirúrgicos devido a complicações anestésicas e três decorrentes de problemas pós-operatórias. Contudo foi feita reposição das unidades experimentais.

No exame mielográfico pré-operatório não foi encontrada nenhuma alteração. Um animal do subgrupo Q15 (8,33%) e outro do subgrupo Q30 (8,33%) apresentaram sinais de infecção local com deiscência de sutura, produção de grande quantidade de material caseoso no sítio cirúrgico caracterizando rejeição do material, sendo estes excluídos da análise estatística. Outro óbito ocorreu em um coelho (8,33%) de G15 sendo este excluído das análises.

Nas mielografias pós-operatórias, em todos os grupos, ocorreram compressões em graus variados, verificando um maior número de coelhos com compressão leve, sendo seis animais (50%) do grupo G e cinco (45,45%) do grupo Q.

Os resultados referentes aos graus de compressão encontrados nas mielografias pós-operatórias estão representados na Tabela 3.

TABELA 3 – Relação entre os grupos e o escore de compressão encontrado na mielografia.

Grupos avaliados	Graus de compressão			
	0	1	2	3
G15 ^a (n=5)	1	3	1	
Q15 ^a (n=5)		3	1	1
G30 ^a (n=6)	2	3	1	
Q30 ^a (n=5)	1	2	1	1

Letras diferentes entre os subgrupos indicam que foram estatisticamente diferentes ($p \leq 0,05$).

A Figura 8 mostra as imagens mielográficas encontradas, notando-se ausência de compressão (três animais do grupo G – 27,27% e um do grupo Q –

10%), compressão moderada (dois animais do grupo G – 18,18% e dois do grupo Q – 20%) e compressão grave (nenhum do grupo G e dois animais – do grupo Q – 20%).

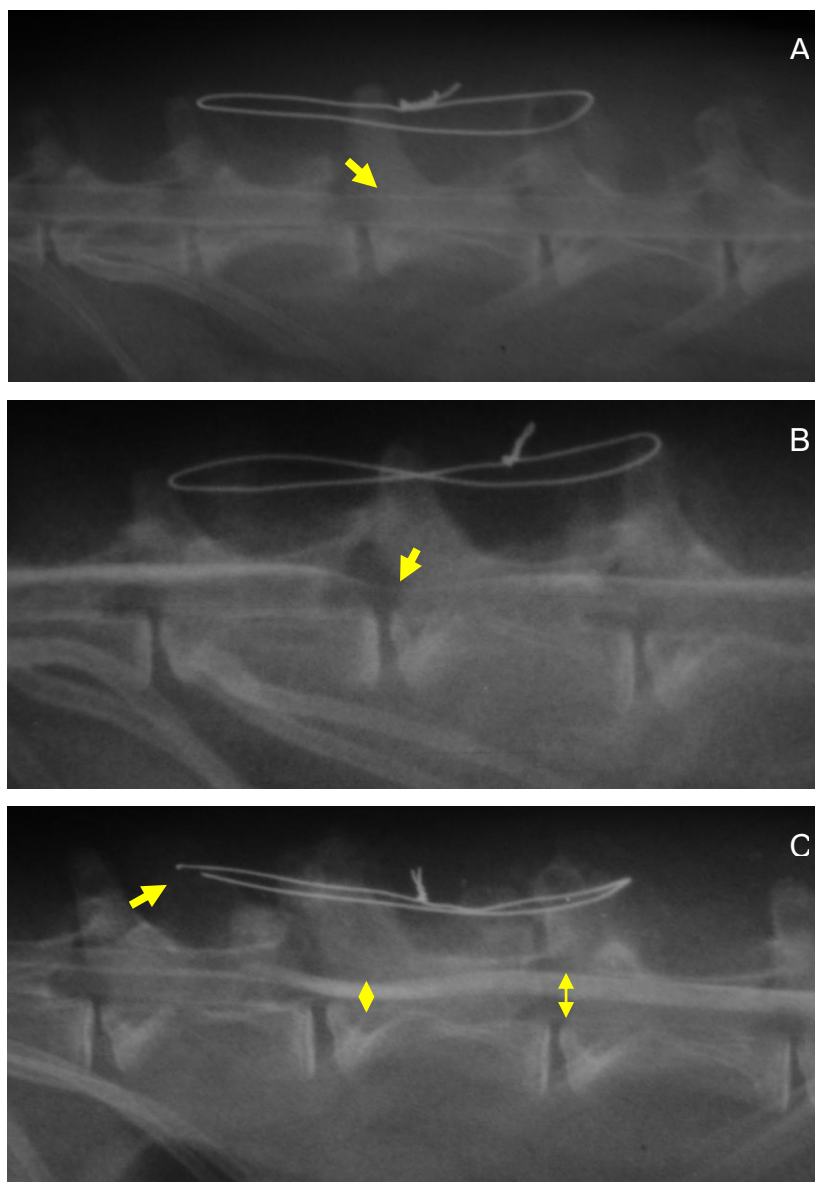


FIGURA 8 – Mielografias pós-operatórias de coelhos submetidos à laminectomia dorsal. **A.** ausência de compressão (seta) (G30). **B.** compressão moderada (seta) (G15). **C.** Grave compressão medular (setas duplas) devido à ruptura do fio de aço (seta) (Q15).

Ocorreu compressão em oito animais (72,72%) do grupo gordura e em nove (90%) do grupo quitosana, totalizando 17 coelhos (80,95%). A compressão

leve teve o maior número de coelhos em G15 (60%), Q15 (60%), G30 (60%) e Q30 (40%).

A compressão grave encontrada em um animal do Q15 (20%) e outro do Q30 (20%) foi atribuída a instabilidade vertebral encontrada devido à ruptura do fio de aço cirúrgico. Estes por sua vez, apresentaram quadros de paraparesia sendo diagnosticados com oito e 12 dias de pós-operatório, respectivamente.

Quanto aos graus de compressão da mielografia entre os grupos avaliados não existe diferença significativa ($p=0,481$), a partir do teste de Kruskal-Wallis com grau de significância $\geq 5\%$.

O grupo G e o grupo Q, quando comparados entre si em períodos diferentes, ou seja, G15 e Q15 ($p=0,273$), Q30 e G30 ($p=0,348$) também não apresentaram diferença significativa ($p \leq 0,05$).

Os resultados da análise histológica do material corado por hematoxilina-eosina (HE) mostraram que as características histológicas de aderências não apresentaram diferença significativa entre os subgrupos quando empregado o teste estatístico de Kruskal-Wallis ($p \leq 0,05$) aos 15 e 30 dias de avaliação. Os achados estão representados na Figura 9.

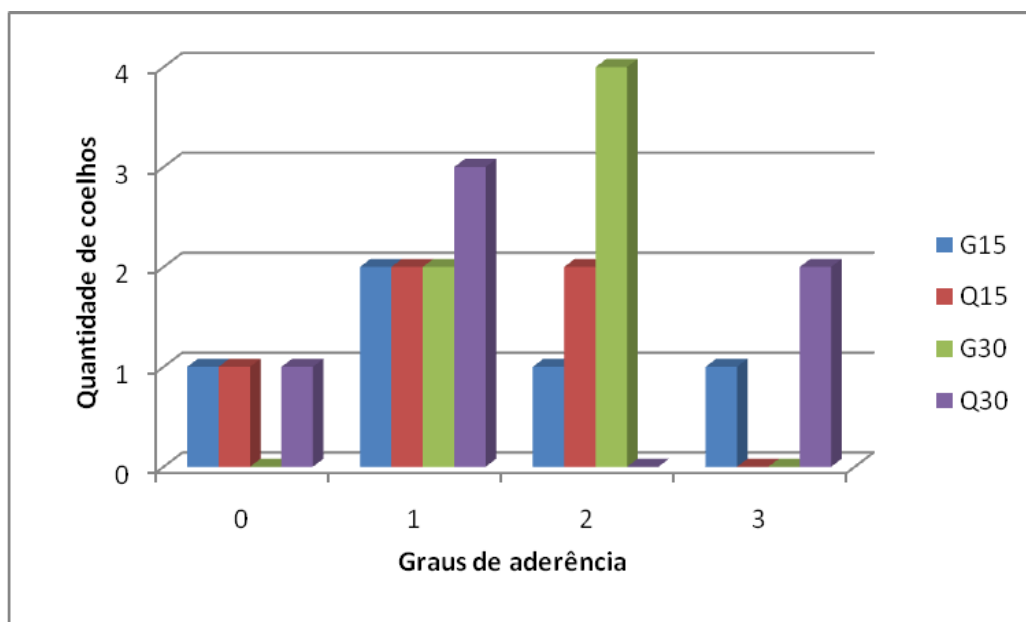


FIGURA 9 – Quantidade de coelhos em relação aos graus de aderência encontrados em cada subgrupo.

No grupo G1, os enxertos de gordura autógena livre, permaneceram viáveis com sinais de revascularização e pequenos focos de necrose central. Em todos os animais o EGAL manteve a dura-máter afastada dos músculos epiaxiais com nenhuma, pouca ou moderada formação de fibrose local sendo classificados, quanto a aderências, de acordo com a Tabela 4.

TABELA 4 – Relação entre o número de animais de cada grupo em cada momento em relação ao grau de aderências encontrados.

Subgrupos	Escores dos graus de aderência			
	0	1	2	3
G15 ^a	1	2	1	1
Q15 ^a	1	2	2	
G30 ^a		2	4	
Q30 ^a	1	3		2

Letras diferentes entre os subgrupos indicam que foram estatisticamente diferentes ($p \leq 0,05$).

Nos coelhos dos grupos G15 e G30 houve diversidade entre os achados de aderência, porém sem significância estatística ($p \leq 0,05$), conforme mostrado no quadro acima. Estes achados são demonstrados na Figura 10.

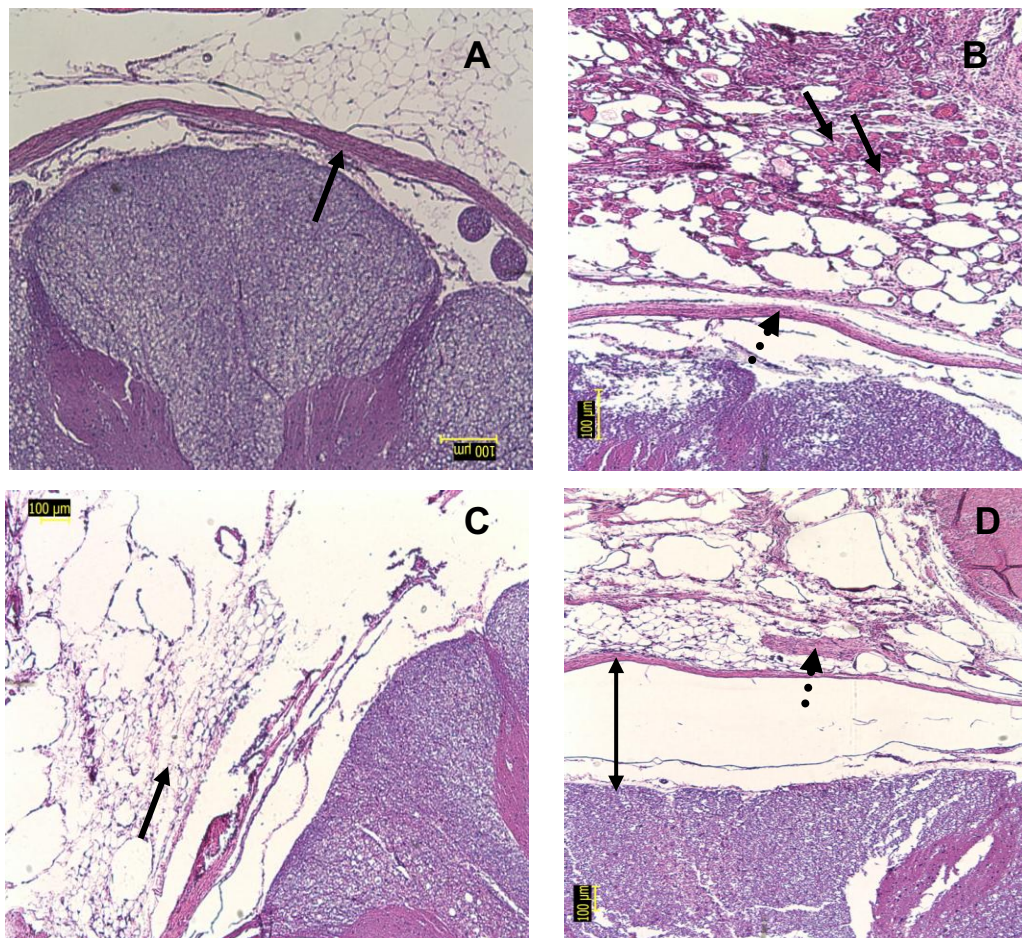


Figura 10 – Fotomicrografia de colunas vertebrais de coelhos com o uso do enxerto de gordura autógena (Coloração: HE), (aumento 5x). **A.** Nota-se a dura-máter (seta) próxima a medula sem sinais de aderência. **B.** Presença de neovascularização (setas) no enxerto que apresenta aderência leve com a dura-máter (seta pontilhada). **C.** Fibrose (seta) com aderência moderada entre a dura-máter e o EGAL. **D.** Aderência intensa com pouca quantidade de fibrose (setas pontilhada) e o afastamento da dura-máter (seta dupla) em relação a medula.

No subgrupo G30, todos os coelhos apresentaram aderências sendo que dois animais obtiveram grau 1 (leve), e quatro animais apresentaram grau 2 (moderada). No subgrupo Q30, dois coelhos foram classificados com o grau 3 (aderência intensa) conforme demonstrado na Figura 11.

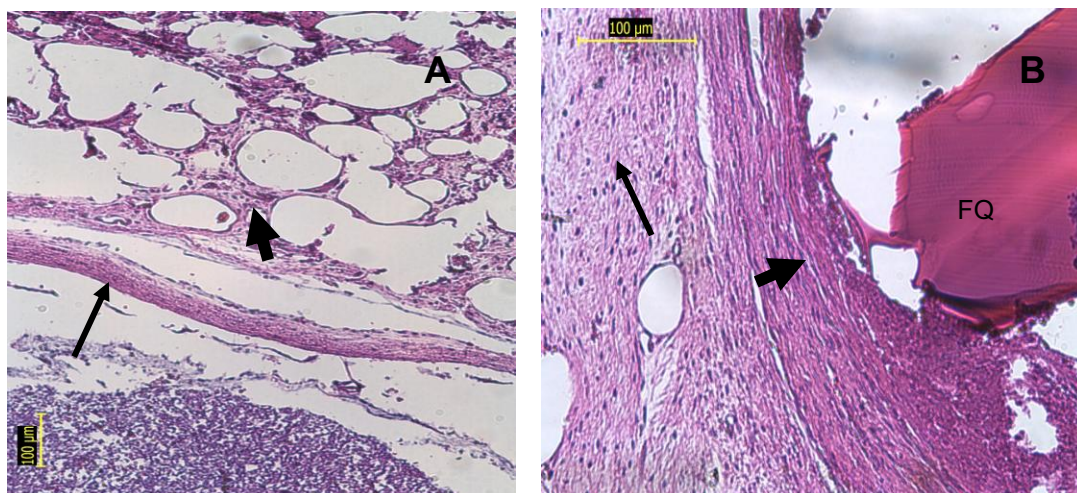


FIGURA 11 – Fotomicrografias de lâminas histológicas colhidas da coluna toracolombar de coelhos (Coloração: HE). **A.** Discreta presença de tecido fibroso próximo a dura-máter (seta) e entremeados entre o implante de gordura (seta larga) (aumento de 5X). **B.** Grande quantidade de tecido fibroso (seta) circundando o filme de quitosana (FQ), formando uma cápsula fibrosa (seta larga). (aumento de 10X).

Com relação às reações inflamatórias, os coelhos que receberam os filmes à base de quitosana apresentaram infiltrados inflamatórios com presença de várias células gigantes por campo de observação e indícios de reação tipo corpo estranho. Em apenas dois animais do grupo Q o filme de quitosana teve uma reação inflamatória de grau 1, ou seja, reação inflamatória leve com macrófagos não circundando todo o implante, sendo que outros sete coelhos apresentaram reação intensa, grau 3, com células inflamatórias circundando de duas a três vezes o tamanho do implante.

Considerando os subgrupos, foi verificada diferença significativa ($p \leq 0,05$) quanto à extensão inflamatória nos dias 15 e 30 de pós-operatório. No subgrupo G15, um animal (20%) não apresentou reação inflamatória e um (20%) com reação moderada, respectivamente, enquanto que no subgrupo Q15, todos os animais apresentaram reação, variando de leve (40%), moderada (20%) e intensa (40%). Houve diferença estatística entre os subgrupos G15 e Q15 ($p=0,040$) e entre G30 e Q30 ($p=0,004$) (Tabela 5).

TABELA 5 – Relação entre o número de animais de cada grupo em cada momento em relação ao graus de reação inflamatória encontrados.

Subgrupos	Reação inflamatória			
	0	1	2	3
G15 ^a (n=5)	1	3	1	
Q15 ^b (n=5)		2	1	2
G30 ^a (n=6)	3	3		
Q30 ^b (n=6)			1	5

Letras diferentes entre os subgrupos indicam que foram estatisticamente diferentes ($p \leq 0,05$).

A Figura 12 mostra dois cortes transversais da coluna vertebral dos coelhos de G30 e Q30, respectivamente.

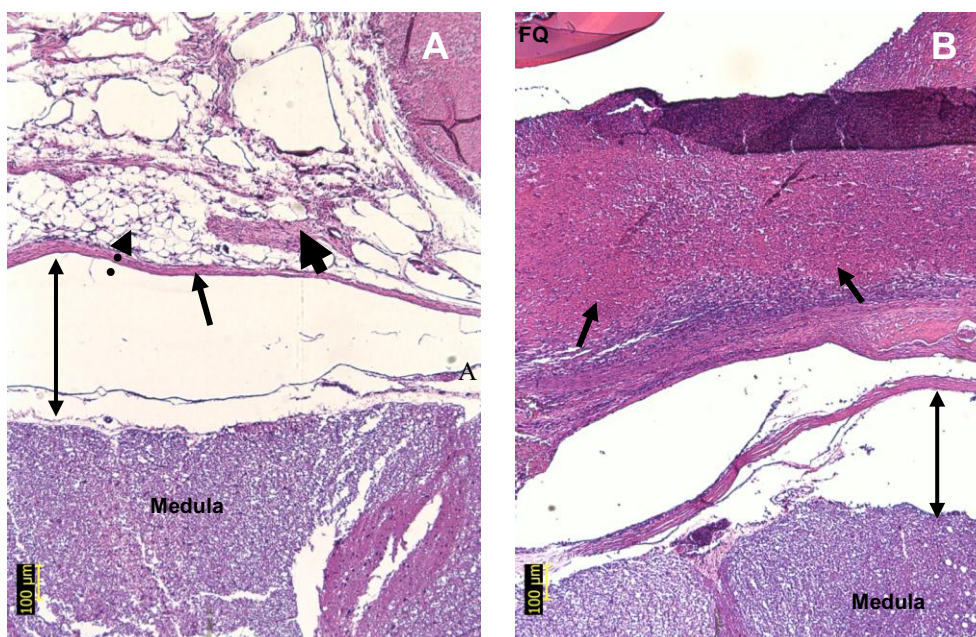


FIGURA 12 – Fotomicrografia da coluna vertebral de coelhos (Coloração: HE). **A.** Aderência intensa entre o implante de gordura (seta pontilhada) e a dura-máter (seta) afastando-a em relação à medula (seta dupla), poucas áreas de fibrose (setas larga) sem presença de células inflamatórias. (aumento 5x). **B.** Filme à base de quitosana (FQ) envolto por grande quantidade de células inflamatórias com áreas de necrose (setas) com leve aderência da dura-máter pelo afastamento desta em relação à medula espinhal (seta dupla). (aumento de 5x).

Três animais (60%) de Q30 apresentaram faixas cartilaginosas metaplásicas com presença de osteófitos centrais indicando a formação de um novo tecido ósseo no sítio da laminectomia, sendo que estes coelhos apresentaram áreas de fibroses com crescimento associado à formação óssea (Figura 13), contudo este achado não foi encontrado nos animais do G15.

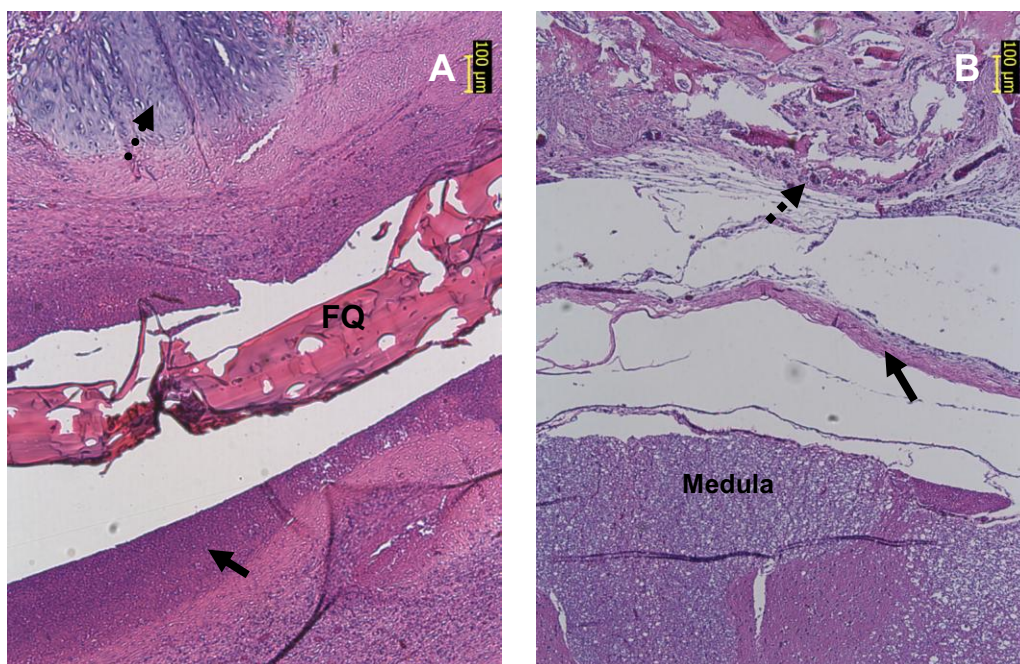


FIGURA 13 – Fotomicrografia da coluna vertebral de coelho após 30 dias da implantação do filme a base de quitosana (FQ) (Coloração: HE). **A.** Presença de reação inflamatória intensa (seta) em torno do filme de quitosana com áreas de necrose e formação de cartilagem metaplásica (seta pontilhada) (aumento 5x). **B.** Formação óssea (seta pontilhada) sobre a dura-máter (seta) sem compressão medular (Aumento de 5X).

Cinquenta por cento dos animais nos quais foram utilizados o filme à base de quitosana apresentaram necrose extensa em torno do implante com grande quantidade de heterófilos, formação de cápsula cística com granulomas e necrose caseosa características da formação de abscesso do tipo caseoso (Figura 14).

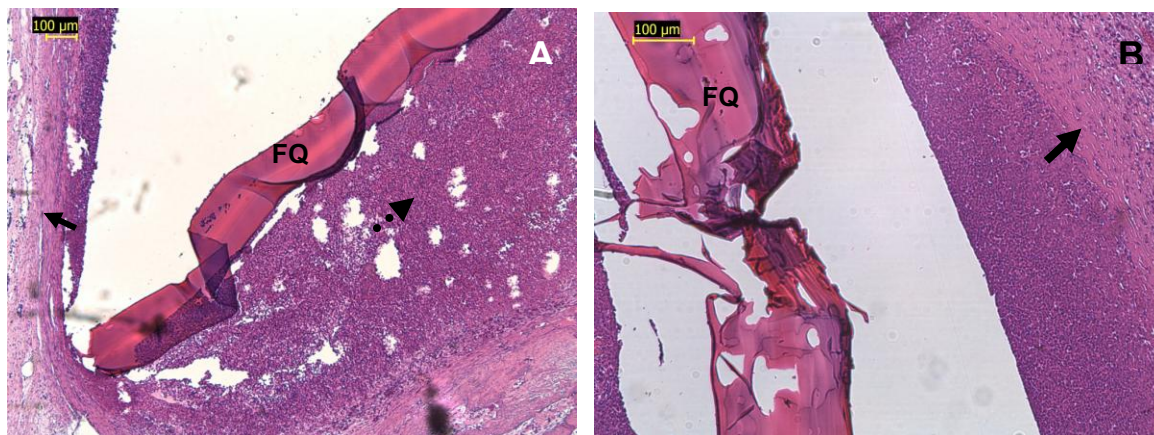


FIGURA 14 – Fotomicrografia da coluna vertebral de coelhos 15 dias após o implante do filme a base de quitosana (FQ) (Coloração: HE). **A.** Reação inflamatória exacerbada (seta pontilhada) com formação de cápsula fibrosa (seta) (aumento 5x). **B.** Filme de quitosana (FQ) com regiões de necrose (seta) formadas próximas ao implante. (Aumento 10X).

5 DISCUSSÃO

O filme à base de quitosana foi comparado com a gordura autógena, pois a gordura é o material utilizado com maior frequência em cirurgias descompressivas da coluna vertebral pela facilidade de obtenção e eficiência na prevenção das aderências, como demonstrado por GÖRGÜLÜ et al., (2004), que citam o enxerto de gordura como um material amplamente utilizado tanto clinicamente, quanto experimentalmente, porém, os mesmos referem dúvidas sobre a formação de fibroses e compressões dinâmicas causadas por este implante.

Diversos tipos de materiais em forma de géis e líquidos são utilizados com o objetivo de prevenir compressão medular quando utilizados como barreira, porém podem ser reabsorvidos rapidamente e não terem nenhum benefício em evitar a formação de aderência (BRYANT et al., 1983; VAN AKKERVEEKEN et al., 1986). Por este motivo, no presente estudo foi utilizado o filme à base de quitosana por ser este um material delgado, com cerca de 0,5mm de espessura, diminuindo assim a probabilidade de causar compressão dinâmica sobre a dura-máter.

TUDURY et al. (1984) citam que a laminectomia dorsal pode causar cifose dorsal ou compressão dinâmica da medula espinhal dorsal devido a remoção das lâminas dorsais e/ou laterais das vértebras e o ligamento longitudinal dorsal, causando assim instabilidade vertebral e déficits neurológicos. A fim de evitar este problema, torna-se necessário a estabilização vertebral, manobra que foi adotada no presente estudo no qual foi utilizado o fio de aço cirúrgico como material de estabilização, pois esta técnica causa menos dissecação de estruturas e boa estabilidade entre as vértebras. Utilizando uma técnica similar, GAGE (1971), SWAIN (1971) e TUDURY et al. (1984) descreveram a utilização de pinos de Steimann paralelos às apófises espinhais de cada vértebra, sendo estes fixados aos processos articulares por meio de fios de aço.

Neste estudo, a laminectomia dorsal foi eleita como técnica por proporcionar grande exposição da medula espinhal promovendo assim um maior contato com as estruturas musculares adjacentes, além de ser a técnica mais

utilizada nos estudos de aderência na dura-máter medular conforme relataram TROTTER et al. (1990) e TREVOR et al. (1991). Foi realizado apenas um procedimento cirúrgico em cada coelho para diminuir a possibilidade de instabilidade vertebral e mimetizar a realidade que ocorre em circunstâncias clínicas. Observações contrárias foram feitas por KIVILUOTO (1976), KELLER et al. (1978), JACOBS et al. (1980), GILL et al. (1985), NUSSBAUM et al. (1990), POSPIECH et al. (1995), que procederam mais de uma laminectomia em um só animal, defendendo a hipótese de que realizando procedimentos repetidos em um mesmo animal, evitaria variações individuais na formação de aderências e reações inflamatórias.

Dois animais apresentaram déficits neurológicos como paraparesia pós-operatória, o que pode ser atribuído à ruptura do fio de aço que provocou a instabilidade vertebral. Esta ocorrência também foi observada nos estudos de TUDURY et al. (1984) que relataram fraturas nas apófises espinhosas nas quais estavam fixados os fios de aço, promovendo a instabilidade vertebral e déficits neurológicos nos pacientes observados.

Outra consequência desfavorável dentre as diversas que podem ocorrer após uma laminectomia dorsal é a compressão medular dorsal, principalmente quando é utilizado o EGAL (COSTA et al., 2006). No presente estudo, o EGAL causou compressão medular dorsal de grau leve e moderado visualizada nos exames mielográficos, sendo que esta compressão pode ser atribuída à redução do tamanho do implante com conseqüente invasão do canal vertebral no sítio em que foi realizada a laminectomia, estando este achado em conformidade com os de PRUSICK et al. (1988) e KANAMORI et al. (2001a), que descreveram que o EGAL pode sofrer necrose asséptica ou migrar para o canal medular. Adicionalmente, a pressão exercida pelos músculos epiaxiais sobre o EGAL pode acentuar o quadro compressivo da medula, conforme relataram CABEZUDO et al. (1985). Para estes autores, a sutura da fáscia muscular dorsal é uma causa de déficits neurológicos pós-operatórios, pois esta sutura força os músculos epiaxiais contra o implante e conseqüentemente o mesmo comprime a medula espinhal exposta pela laminectomia.

Os resultados encontrados na mielografia mostraram uma grande variação entre os coelhos do mesmo grupo e entre os grupos, entretanto não

foram notadas correlações entre as amostras nas quais haviam aderências e o quadro histológico apresentado. Estes resultados são similares aos relatados por FUNKQUIST & SCHANTZ (1962), BARBERA et al. (1978), TREVOR et al. (1991) e AKDEMIR et al. (1993), que realizaram mielotomografia sem encontrar correlação entre os achados destas técnicas de avaliação.

O padrão de similaridade com relação aos graus de compressão medular moderado e leve observados aos 15 e 30 dias nos animais do grupo G pode ser atribuído provalvemente à resolução da inflamação e remodelação do enxerto sobre a dura-máter, fenômeno também observado por KANAMORI et al. (2001a), que citam que o enxerto de gordura livre torna-se acomodado e se molda em torno da dura-máter, não causando déficits neurológicos nem compressão dinâmica da medula espinhal com passar das semanas.

KANAMORI et al. (2001b) verificaram que o enxerto de gordura é reduzido cerca de 10%, 30% e 43% do seu tamanho aos 7, 21 e 42 dias, respectivamente. Embora a espessura ideal para o EGAL não esteja bem estabelecida, 5mm é o tamanho frequentemente mais utilizado (BRYANT et al., 1983; VAN AKKERVEEKEN et al., 1986; PRUSICK et al., 1988; KANAMORI et al., 2001b). Assim, baseado nestas recomendações, o EGAL utilizado neste experimento mediu aproximadamente dois centímetros comprimento por um centímetro de largura e meio centímetro de espessura, apesar de ser muito difícil medir a espessura desse tipo de tecido por serem friáveis e que inicialmente parecem ser maiores do que aparentam. No grupo G, 54,5% dos animais apresentaram aderências do implante na dura-máter, sendo esta uma percentagem superior aos relatados por JENSEN et al. (1996) e COSTA et al. (2006) porém inferior aos de NUSSBAUM et al. (1990).

A carboximetilquitosana é a quitosana na qual alguns grupos de sua estrutura original foram substituídos por grupos carboximetil, com a finalidade, dentre outras, de aumentar sua solubilidade em água. Neste trabalho, o filme à base de quitosana não está na forma carboxilada, o que não impede a comparação dos resultados obtidos com a sua utilização, daqueles relatados por diversos autores que investigaram a prevenção de aderências em diferentes regiões (XIONG et al., 1998; ZHOU et al., 2004; DAROZ et al., 2008). Em nosso estudo, a presença de aderências epidurais foi notada em mais de 50% dos

coelhos, ainda que a área afetada fosse menor em relação aos animais do grupo G. Este achado parece estar relacionado à limitação do crescimento de fibroblastos em face à quitosana, conforme salientaram XIONG et al. (1998) ao utilizarem coelhos como unidade experimentais.

Em nosso estudo, os achados indicativos de processo inflamatório nas amostras do grupo Q foram mais intensos que no grupo G. Não foi utilizado antiinflamatório para não influenciar os resultados. Este pode ser um dos fatores que contribuíram para o aparecimento de resposta inflamatória intensa no grupo Q, pois o biomaterial é um corpo estranho e normalmente irá induzir uma resposta inflamatória intensa no paciente. É sabido que a implantação de um biomaterial no organismo inicia uma sequência de eventos de reação de corpo estranho, começando com uma resposta inflamatória aguda e evoluindo, em alguns casos, para uma resposta inflamatória crônica e/ou formação de um tecido de granulação e desenvolvimento de uma cápsula fibrosa. Estes processos estão relacionados ao tipo de material implantado, bem como ao grau de lesão produzido. Ainda, a natureza da resposta inflamatória eventualmente esta relacionada ao grau de fibrose (BABENSEE et al., 1998). Neste nosso estudo, o filme a base de quitosana desencadeou uma resposta inflamatória intensa, sendo que em três coelhos (33,3%) ocorreu a formação de cápsula fibrosa englobando o filme, estando em conformidade com os autores acima referenciados.

Assim, parece existir uma relação entre os achados histológicos referentes à inflamação e o biomaterial implantado nos coelhos, pois segundo REDROBE (2002), esta espécie reage à implantação de corpos estranhos de maneira diferente de outras espécies. A maioria dos animais do grupo Q apresentou necrose em torno do implante com grande quantidade de heterófilos e formação de cápsula fibrosa caracterizando a formação de um material do tipo caseoso. Esta particularidade apresentada na espécie *Lagomorpha* é relatada por RECKERS et al. (2006), que procederam transplante de meniscos com a utilização de cianocrilato em coelhos e constataram a formação deste tipo de material no sítio cirúrgico, porém sem crescimento bacteriano. Anteriormente, REDROBE (2002) concluiu que a formação de material caseoso é uma forma de resposta a corpo estranho encontrada nos coelhos, sendo uma particularidade desta espécie este tipo de resposta inflamatória que é desencadeada por

heterófilos, como citado também por DORMAN et al. (2004), que encontraram necrose caseosa em coelhos, similarmente aos achados em nosso estudo.

O material caseoso localizado na periferia do implante pode estar associado à compressão medular encontrada nos dois coelhos do grupo Q, que apresentaram compressão moderada, o que está de acordo com os relatos de SANDERS & TRUUMES (2004), que avaliaram por meio de imagem de ressonância magnética pacientes submetidos a cirurgias lombares e atribuíram a formação de abscesso como uma das formas de compressão pós-operatória de raiz nervosa.

A presença de tecido cartilaginoso aos 30 dias em quatro coelhos de Q e um de G, com formação de uma lâmina dorsal óssea em Q, foi um achado similar aos relatados por GIL et al. (1979); JACOBS et al. (1980) e TROTTER et al. (1988) quando estes avaliaram apenas o enxerto de gordura. GILL et al. (1979) atribuíram seus achados à metaplasia de tecido fibroso com conseqüente formação de tecido ósseo. BERNABEU et al. (2005) relataram a penetrabilidade osteoblástica nas membranas de quitosana e JUNG et al. (2007) relatam que o filme de quitosana teve um potencial significativo para induzir a formação óssea após craniectomia parcial em ratos, achados estes que reforçam os achados do presente estudo, pois em quatro coelhos o filme a base de quitosana apresentou formação de tecido ósseo sob o implante.

A viabilidade de aplicações biomédicas da quitosana tem despertado atenção de inúmeros pesquisadores. Entretanto, pode-se notar a ocorrência de resultados divergentes, conforme a espécie estudada, o grau de desacetilação, a forma da quitosana e/ou o sítio de sua implantação. Sugere-se então, que este material seja avaliado em outras espécies além do coelho, a fim de que o tipo peculiar de reação inflamatória desta espécie não interfira nos achados.

6 CONCLUSÕES

O filme à base de quitosana comparado com o EGAL foi eficiente na redução da extensão de aderências pós laminectomia dorsal em coelhos.

O filme à base de quitosana induziu uma resposta inflamatória intensa no coelho, havendo necessidade de ser avaliado em outras espécies para que a eficiência deste material sobre as aderências durais sejam adequadamente elucidadas.

REFERÊNCIAS

1. AKDEMIR, H.; PASAOGLU, A.; SELCUKLU, A.; OZTURK, F.; KURTSOY, A. Prevention of adhesions after laminectomy: an experimental study in dogs. **Research in Experimental Medicine**, Berlim. v.193, n.1, p.39–46, 1993.
2. ARROTEGUI, I.; LLOMBART, J.L. Dural Graft Matrix As An Adhesion Barrier. **54th Annual Meeting of the Congress of Neurological Surgeons**, San Francisco, p.16-21. 2004.
3. ATLAS, S.J.; DEYO, R.A.; PATRICK, D.L. The Quebec task force classification for spinal disorders and the severity, treatment, and outcomes of sciatica and lumbar spinal stenosis. **Spine**, Quebec, v.21, p.2885-2892. 1996.
4. BABENSEE, J.E.; ANDERSON, J.M.; MCINTIRE, L.V.; MIKOS, A.G. Host response to tissue engineered devices. **Advanced drug delivery reviews**, Cleveland, v.33, p.111-139. 1998.
5. BARBERA, J.; GONZALEZ, J.; ESQUERDO, J.; BROSETA, J.; BARCIA-SALORIO, J.L. Prophylaxis of the laminectomy membrane – an experimental study in dogs. **Journal of Neurosurgery**, Zaragoza, v.49, p.419–424. 1978.
6. BARROS FILHO, T.E.P.; OLIVEIRA, C.R.G.C.M.; OLIVEIRA, R.P.; BARROS, E.M.K.P.; MARCON, R.M.; CRISTANTE, A.F. Estudo do uso da membrane de politetrafluoroetileno inerte expandido para a prevenção de fibrose pós laminectomia em ratos wistar. **Acta ortopaedica brasileira**, São Paulo, v.11, n.2, p.110-117, 2003.
7. BERJANO, R.; VINAS, F.C.; DUJOVNY, M. A review of dural substitutes used in neurosurgery. **Critical Reviews in Neurosurgery**, Detroit, v.9, n.4, p. 217-222. 1999.
8. BERNABEU, E.; SÁNCHEZ-BREA, L. M.; LARENA, A.; CÁCERES, D. A.; DE LA PIEDRA, C.; MONTERO, M.; VICARIO, C.; FUENTES, A.; IBARZÁBAL, A. Análisis por micrometría óptica directa y confocal de quitosano en medio de cultivo de osteoblastos. **Patología Del Aparato Locomotor**, Madrid, v.3, n.2, p.144-151. 2005.
9. BERNSMANN, K.; KRAMER, J.; ZIOZIOS, I.; WEHMEIER, J.; WIESE, M. Lumbar micro disc surgery with and without autologous fat graft. A prospective randomized trial evaluated with reference to clinical and social factors. **Archives of orthopaedic and trauma surgery**, Bochum, v.121, p.476–480, 2001.
10. BOSACCO, S.J.; GARDNER, M.J.; GUILLE, J.T. Evaluation and Treatment of Dural Tears in Lumbar Spine Surgery. **Clinical Orthopaedics and Related Research**. Philadelphia, v.389, p.238-247. 2001.
11. BOYD, J. S. **Anatomia Clínica do Cão e do Gato**. 2ed. Barueri: Manole, 2002. 218p.

12. BRISSON, B.A.; MO.AT, S.L.; SWAYNE, S.L.; PARENT, J.M. Recurrence of thoracolumbar intervertebral disk extrusion in chondrodystrophic dogs after surgical decompression with or without prophylactic fenestration: 265 cases. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Gelph, v.224, p.1808-14. 2004.
13. BRYANT, M.S.; BREMER, A.M.; NGUYEN, T.Q. Autogeneic fat transplants in the epidural space in routine lumbar spine surgery. **Neurosurgery**, v.13, p.367–370, 1983.
14. BURTON, C.V. Causes of failure of surgery in the lumbar spine: 10-year follow-up. **The Mount Sinai Journal of Medicine**, Minneapolis, v.58, p.183-187, 1991.
15. CABEZUDO, J.M.; LOPEZ, A.; BACCI, F. Symptomatic root compression by a free fat transplant after hemilaminectomy. **Journal of Neurosurgery** v.63, n.4, p.633–635, 1985.
16. CHANDY, T.; SHARMA, C.P. Chitosan as a biomaterial. **Biomaterials Artificial Cells and Artificial Organs**, Poojapura, v.18, p.1-24, 1990.
17. CHATELET, C. Influence of the degree of acetylation on some biological properties of chitosan films. **Biomaterials**, Villeurbanne Cedex, n.22, p.261-268, 2000.
18. CHEN, Q.; LIU, S.Q.; DU, Y.M.; PENG, H.; SUN, L.P. Carboxymethyl-chitosan protects rabbit chondrocytes from interleukin-1 β -induced apoptosis. **European Journal of Pharmacology**, Amsterdam, v.541, p.1–8, 2006.
19. CHRISMAN, C.L.; MARIANI, C.; PLATT, S.; CLEMMS, R. **Neurologia para o clínico de pequenos animais**. São Paulo: Roca, 2005. 336p.
20. CONSTAIN, D.J. Prevention of postsurgical adhesions with N,O-carboxymethyl chitosan: Examination of the most efficacious preparation and the effect of N,O-carboxymethyl chitosan on postsurgical healing. **Surgery**. Nova Scotia, v.121, n.3, p.314-319, 1997.
21. COSTA, R. C.; PIPPI, N. L.; GRAÇA, D. L.; FIALHO, S. A.; ALVES, A.; GROFF, A. C.; REZLER, U. The effects of free fat graft or cellulose membrane implants on laminectomy membrane formation in dogs. **The Veterinary Journal**, Guelph, v.171, p.491-499, 2006.
22. ÇOBANOĞLU, S.; IMER, M.; ÖZYLMAZ, F.; MEMİŞ, M. Complication of epidural fat graft in lumbar spine disc surgery: case report. **Surgical Neurology**, Edirne, v.44, p.479-482, 1995.
23. CRAVEIRO, A.A.; CRAVEIRO, A.C. **Membrana de quitina e quitosana para utilização em regeneração de tecidos e cicatrizações**. Patente brasileira, PI 9805480-5^a, 12/09/2000.

24. DALLAN, P.R.M. **Síntese e caracterização de membranas de quitosana para aplicação na regeneração de pele.** 2005. 194p. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP.
25. DAROZ, L.R.D.; LOPES, J.B.; DALLAN, L.A.O.; CAMPANA-FILHO, S.P.; MOREIRA, L.F.P.; STOLF, N.A.G. Prevention of postoperative pericardial adhesions using thermal sterile carboxymethyl chitosan. **Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular**, São Paulo, v.23, n.4, p.480-487, 2008.
26. DORMAN, S.E.; HATEM, C.L.; TYAGI, S.; AIRD, K.; LOPEZ-MOLINA, J.; PITT, M.L.M.; ZOOK, B.C.; DANNENBERG JR, A.M.; BISHAI, W.R.; MANABE, Y.C. Susceptibility to tuberculosis: clues from studies with inbred and outbred New Zealand white rabbits. **Infection and immunity**, Baltimore, v.72, n.3, p.1700–1705, 2004.
27. DYCE, K.M.; SACK, M.O.; WENSING, C.J.G. **Tratado de Anatomia Veterinária.** 3 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004.813p.
28. FOSSUM, T. W. **Cirurgia de Pequenos Animais.** 2 ed. USA: Roca, 2005. 1408p.
29. FREIER, T.; KOH, H.S.; KAZAZIAN, K.; SHOICHET, M.S. Controlling cell adhesion and degradation of chitosan films by N-acetylation. **Biomaterials**, Toronto, v.26, n.29, p.5872-5878, 2005.
30. FUNKQUIST, B.; SCHANTZ, B. Influence of extensive laminectomy on the shape of spinal canal. **Acta Orthopaedica Scandinavica**, v.56, p.7–50, 1962.
31. GAGE, E.D. Surgical repairs of spinal fractures in small breed dogs. **Veterinary Medicine in Small Animals Clinical**, Kansas, v.66, n.3, p.1095-1101, 1971.
32. GILL, G.G.; SAKOVICH, L.; THOMPSON, E. Pedicle fat grafts for the prevention of scar formation after laminectomy. **Spine**, Califórnia, v.4, p.176–186, 1979.
33. GILL, G.G.; SCHECK, M.; KELLEY, E.T. Pedicle fat grafts for the prevention of scar in low-back surgery: a preliminary report on the first 92 cases. **Spine**, California, v.10, p.662-667, 1985.
34. GÖRGÜLÜ, A.; ŞİMŞEK, O.; ÇOBANOĞLU, S.; IMER, M.; PARSAK, T. The effect of epidural free fat graft on the outcome of lumbar disc surgery. **Neurosurgical Review**, Isparta, v.27, n.3, p.181-4. 2004.
35. HAWK, M.W.; KIM, K.D. Review of spinal psuedomeningoceles and cerebrospinal fluid fistulas. **Neurosurgery Focus**, Califórnia, v.9, n.5, p.1-5. 2000.
36. HERCULANO, M.A.; TELLA JR., O.I.; PRANDINI, M.N.; PRANDINI, M.T.S.A. Estudo de membrana biológica em ratos na prevenção de fibrose pós laminectomia. **Arquivo de Neuropsiquiatria**, São Paulo, v.64, p.259-263. 2006.

37. HINTON JR., J.L.; WAREJCKA, D.J.; MEI, Y.; MCLENDON, R.E.; LAURENCIN, P.A.; LUCAS, P.A.; ROBINSON JR., J.S. Inhibition of epidural scar formation after lumbar laminectomy in the rat. **Spine**, Georgia, v.20, p.564–570, 1995.
38. HIRAIZUMI, Y.; TRANSFELDT, E.E.; FUJIMAKI, E.; NAMBU, M. Application of polyvinyl alcohol hydrogel membrane as anti-adhesive interposition after spinal surgery. **Spine**, Tokyo, v.15. n.22. p.1418-9. 1997.
39. JACOBS, R.R., MCCLAIN, O., NEFF, J. Control of postlaminectomy scar formation: an experimental and clinical study. **Spine**, Philadelphia, v.5, p.223–229, 1980.
40. JENSEN, T.T.; ASMUSSEN, K.; BERG-HANSEN, E.M.; LAURITSEN, B.; MANNICHE, C.; VINTERBERG, H.; JENSEN, L.; KRAMHOFT, J. First time operation for lumbar disc herniation with or without free fat transplantation: Prospective Triple-Blind Randomized Study With Reference to Clinical Factors and Enhanced Computed Tomographic Scan 1 Year After Operation. **Spine**, Hilleroed, v.21, p.1072–1076, 1996.
41. JERRAM, R.M.; DEWEY, C.W. Acute thoracolumbar disk extrusion in dogs-Part I. **Compendium on Continuing Education for the Practice Veterinary**, Princeton, v.21, n.10, p.922-930, 1999a.
42. JERRAM, R.M.; DEWEY, C.W. Acute thoracolumbar disk extrusion in dogs-Part II. **Compendium on Continuing Education for the Practice Veterinary**, Princeton, v.21, n.11, p.1037-1047, 1999b.
43. JUNG, U.W.; SONG, K.Y.; KIM, C.S.; LEE, Y.K.; CHO, K.S.; KIM, C.K.; CHOI, S.H. Effects of a chitosan membrane coated with polylactic and polyglycolic acid on bone regeneration an a rat calvarial defect. **Biomedical Materials**, Bristol, v.2, n.3, p.101-105, 2007.
44. KANAMORI, M.; KAWAGUCHI, Y.; OHMORI, K.; KIMURA, T.; MD, H.T.; MATSUI, H. The fate of autogenous free-fat grafts after posterior lumbar surgery: part 1. A postoperative serial magnetic resonance imaging study. **Spine**, Toyama, v.26, p.2258–2263, 2001a.
45. KANAMORI, M.; KAWAGUCHI, Y.; OHMORI, K.; KIMURA, T.; TSUJI, H.; MATSUI, H. The fate of autogenous free-fat grafts after posterior lumbar surgery: part 2. Magnetic resonance imaging and histologic studies in repeated surgery cases. **Spine**, Toyama, v.26, p.2264–2270, 2001b.
46. KATO, T.; HARO, H.; KOMORI, H.; SHINOMIYA, K. Evaluation of hyaluronic acid sheet for the prevention of postlaminectomy adhesions. **The Spine Journal**, Nagano, v.5, p.479–488, 2005.
47. KELLER, J.T., DUNSKER, S.B., MCWHORTER, J.M., ONGKIKO, C.M., SAUNDERS, M.C., MAYFIELD, F.H. The fate of autogenous grafts to the spinal dura: an experimental study. **Journal of Neurosurgery**, v.49, n.3, p.412–418, 1978.

48. KIVILUOTO, O., Use of free fat transplants to prevent epidural scar formation. **Acta Orthopaedica Scandinavica**, v.164, p.71–75, 1976.
49. KÖNIG, H.E.; LIEBICH, H.G. **Anatomia dos Animais Domésticos. Texto e Atlas Colorido. Volume 2**. Porto Alegre: Artmed, 2004. 399p.
50. KHOR, E.; LIM, L.Y. Implantable applications of chitin and chitosan. **Biomaterials**, Singapore, v.24, p.2339–2349, 2003.
51. LANGENSKIÖLD, A.; KIVILVOTO, O. Prevention of epidural scar formation after operations on the lumbar spine by means of free fat transplants. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, Helsinki, v.115, p.92-95, 1976.
52. LAROCCA, H.; MACNAB, I. The laminectomy membrane: studies in its evaluation, characteristics, effects and prophylaxis in dogs. **The Journal of Bone and Joint Surgery, British volume**, Boca Raton, v.56, p.545–50, 1974.
53. LAWSON, K.J.; MALYCKY, J.L.; BERRY, J.L.; STEFFEE, A.D. Lamina repair and replacement to control laminectomy membrane formation in dogs. **Spine**, Califórnia, v.16, p.222–226, 1991.
54. LECOUTEUR, R.A.; CHILD, G. Moléstias da medula espinhal. In: ETTINGER, S.J. **Tratado de Medicina Interna Veterinária**. São Paulo: Manole, 1992. v.2, p.655-736.
55. LEE, C.K.; ALEXANDER, H. Prevention postlaminectomy scar formation. **Spine**, Philadelphia, v.9, n.3, p.305-12, 1984.
56. LEE, H.M.; YANG, K.H.; HAN, D.Y.; KIM, N.H. Na experimental study on prevention of postlaminectomy scar formation. **Yonsei Medical Journal**, Seoul, v.31, n.4, p.359-366, 1990.
57. MARTIN-FERRER, S. Failure of autologous fat grafts to prevent postoperative epidural fibrosis in surgery of the lumbar spine. **Neurosurgery**, Melilla, v.24, p.718–721, 1989.
58. METTLER, L. A randomized, prospective, controlled, multicenter clinical trial of a sprayable, site-specific adhesion barrier system in patients undergoing myomectomy. **Fertility and Sterility**, Kiel, v.82, n.2, p.398-404, 2004.
59. MUIR, P.; JOHNSON, K.A.; MANLEY, P.A.; DUELAND, R.T. Comparison of hemilaminectomy and dorsal laminectomy for a thoracolumbar intervertebral disc extrusion in dachshunds. **Journal of Small Animal Practice**, Wisconsin, v.36, n.8, p.360-367, 1995.
60. MUZZARELLI, R.; BALDASSARRE, V.; CONTI, F.; FERRARA, P.; BIAGINI, G. Biological activity of chitosan: ultrastructural study. **Biomaterials**, Ancona, v.9, p.247-252, 1988.

61. NAROTAM, P.K.; VAN DELLEN, J.R.; BHOOLA, K. A clinicopathological study of collagen sponge as a dural graft in neurosurgery. **Journal of Neurosurgery**, Durban, v.82, n.3, p.406–412. 1995.
62. NAROTAM, P.K.; JOSE, S.; NATHOO, N. Collagen Matrix (DuraGen) in Dural Repair: Analysis of a New Modified Technique. **Spine**, Omaha, v.29, p.2861-2867. 2004.
63. NUSSBAUM, C.E.; MCDONALD, J.V.; BAGGS, R.B. Use of Vicryl (Poliglactin 910) mesh to limit epidural scar formation after laminectomy. **Neurosurgery**, Baltimore, v.26, n.4, p.649–654, 1990.
64. OLIVEIRA, R.C.S.; VALENTE, P.R.; ABOU-JAMRA, R.C.; ARAÚJO, A.; SALDIVA, P.H.; PEDREIRA, D.A.L. Biosynthetic cellulose induces the formation of a neodura-máter following prenatal correction of meningocele in fetal sheep. **Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, v.22, n.3, p.174-181, 2007.
65. PADILHA FILHO, J. G.; SELMI, A. L. Retrospective study of thoracolumbar ventral fenestration trough intercostal thoracotomy and paracostal laparotomy in the dog. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v.36, n.4, 1999.
66. PAULO, N.M.; SILVA, M.S.B.; MORAES, A.M.; RODRIGUES, A.P.; MENEZES, L.B.; MIGUEL, M.P.; LIMA, F.G.; FARIA, A.M.; LIMA, L.M.L. Use of chitosan membrane associated with polypropylene mesh to prevent peritoneal adhesion in rats, **Journal os Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, article on line, 2009.
67. POSPIECH, J.; PAJONK, F.; STOLKE, D. Epidural scar tissue formation after spinal surgery: an experimental study. **European Spine Journal**, Verlag, v.4, p.213–219, 1995.
68. PREUL, M.C.; CAMPBELL, P.K.; BENNETT, S.L.; MUENCH, T.R. Toward optimal tissue sealants for neurosurgery: use of a novel hydrogel sealant in a canine durotomy repair model. **Neurosurgery**, Phoenix, v.53, n.5, p.1189-98. 2003.
69. PRUSICK, V.R.; LINT, D.S.; BRUDER, W.J. Cauda equina syndrome as a complication of free epidural fat-grafting: a report of two cases and a review of the literature. **The Journal of bone and joint surgery, American volume**, Michigan, v.70, n.8, p.1256-8. 1988.
70. QUIST, J.J.; DHERT, W.J.A.; MEIJ, B.J.P.; VISSER, W.J.; ONER. F.C.; HAZEWINKEL, H.A.W.; VERBOUT, A.J. The prevention of peridural adhesions: a comparative long-term histomorphometric study using a biodegradable barrier and a fat graft. **The journal of bone and joint surgery**. British, v.80, n.3. 1998.
71. RAO, S.B.; SHARMA, C.P. Use of chitosan as a biomaterial: studies on its safety and hemostatic potential. **Journal of Biomedical Materials Research**, Poojapura, v.34, p.21-28, 1997.

72. RECKERS, L.J.; FAGUNDES, D.J.; COHEN, M.; RAYMUNDO, J.L.P.; MOREIRA, M.B.; PAIVA, V.C. Medial meniscus transplantation using cyanoacrylate in rabbits. **Acta cirúrgica brasileira**, São Paulo, v.21, n.2, p.92-96, 2006.
73. REDROBE, S. Soft tissue surgery of rabbits and rodents. **Seminars in avian and exotic pet medicine**, Bristol, v.11, n.4, p.231-245. 2002.
74. RODGERS, K.E.; ROBERTSON, J.T.; ESPINOZA, T.; OPPELT, W.; CORTESE, S.; DIZEREGA, G.S.; BERG, R.A. Reduction of epidural fibrosis in lumbar surgery with Oxiplex adhesion barriers of carboxy-methylcellulose and polyethylene oxide. **Spine Journal**, Califórnia, v.3, p.277-284, 2003.
75. ROSALES-CORTES, M.; PEREGRINA-SANDOVAL, J.; BAÑUELOS-PINEDA, J.; SARABIA-ESTRADA, R.; GÓMEZ-RODILES, C.C.; ALBARRÁN-RODRÍGUEZ, E.; ZAITSEVA, G.P.; PITA-LÓPEZ, M.L. Immunological study of a chitosan prosthesis in the sciatic nerve regeneration of the axotomized dog. **Journal of biomaterials applications**, v.18, n.1, p.15-23, 2003.
76. SANDERS, W.P.; TRUUMEEES, E. Imaging of the Postoperative Spine. **Seminars in ultrasound, ct and mri**, p.523-535, 2004.
77. SEIM, H. B. Conditions of the toracolumbar spine. **Seminars in Veterinary Medicine Surgery (Small Animals)**, v.4, p.235-253, 1996.
78. SEIM, H.B. Neurocirurgia In: FOSSUM, T. W. **Cirurgia de Pequenos Animais**. 2 ed. USA: Roca, 2005. 1408p.
79. SLATTER, D. **Manual de Cirurgia de Pequenos Animais**. 2ed. São Paulo: Manole, 1998, 2830p.
80. SONGER, M.N., GHOSH, L., SPENCER, D.L. Effects of sodium hyaluronate on peridural fibrosis after lumbar laminotomy and discectomy. **Spine**, Chicago, v.15, n.6, p.550-554. 1990.
81. SWAIN, S.F. Vertebral body plating for spinal immobilization. **Journal of American Veterinary Medicine Associate**, Schaumburg, v.158, n.10, p.1683-1696, 1971.
82. THADANI, V.; PENAR, P.L.; PARTINGTON, J.; KALB, R.; JANSSEN, R.; SCHONBERGER, L.B.; RABKIN, C.S.; PRICHARD, J.W. Creutzfeldt-Jakob disease probably acquired from a cadaveric dura mater graft: Case report. **Journal of Neurosurgery**, New Haven, v.69, p.766-769. 1988.
83. TREVOR, P.B.; MARTIN, R.A.; SAUNDERS, G.K.; TROTTER, E.J. Healing characteristics of free and pedicle fat grafts after dorsal laminectomy and durotomy in dogs. **Veterinary Surgery**, Blacksburg, v.20, p.282-290, 1991.
84. TROTTER, E.J., CRISSMAN, J., ROBSON, D., BABISH, J. Influence of nonbiologic implants on laminectomy membrane formation in dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v.49, p.634-643, 1988.

85. TROTTER, E.J. Dorsal laminectomy for treatment of thoracolumbar disk disease. In: BOJRAB, M.J. **Current Techniques in Small Animal Surgery**, 3^{ed}. Lea & Febiger, Philadelphia, p. 608–621. 1990.
86. TSUJI, H. **Comprehensive Atlas of Lumbar Spine Surgery**. St. Louis: Mosby-Year Book, 1991, 327p.
87. TUDURY, E.A.; FIALHO, S.A.G.; PAULO, N.M.; RAISER, A.G. Avaliação de dois métodos para prevenção de cifose pós-operatória na laminectomia dorsal de cães. **Revista do centro de ciencias rurais**, Santa Maria, v.15, n.1, p.57-68, 1984.
88. TUDURY, E.A.; RAHAL, S.C.; GRAÇA, D.L.; HADDAD, J.N.; ARIAS, M.V.B.; NETO, O.P. Consequência da laminectomia dorsal do tipo Funkquist A em cães normais. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.31, n.1, p.73-79, 2001.
89. VAN AKKERVEEKEN, P.F.; VAN DE KRAAN, W.; MULLER, J.W. The fate of the free graft: a prospective clinical study using CT-scanning. **Spine**, v.11, p.501–504, 1986.
90. WANG, Q.; XIANG, Y.; HOU, C.; WU, Y.; YANG, X.; GU, X.; XU, W.; KANG, Y. The effect of chitosan in prevention of fibrous scar tissue formation after laminectomy. **Chinese journal of surgery**, Shanghai, v.36, n.6, p.379-381, 1998.
91. WARREN, W.L.; MEDARY, M.B.; DUREZA, C.; BELLOTTE, J.B.; FLANNAGAN, P.P.; OH, M.Y.; FUKUSHIMA, T. Dural repair using acellular human dermis: Experience with 200 cases—Technique assessments. **Neurosurgery**, Pittsburgh, v.46, p.1391–1396. 2000.
92. WHEELER, S. J.; SHARP, N. J. H. **Diagnóstico e Tratamento Cirúrgico das Afecções Espinais do Cão e do Gato**. São Paulo: Manole, 1999, 224p.
93. WIKIMEDIA COMMONS. File: Medula espinhal GIF. In: <http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Medulaespinhal.GIF>. A Wikimedia project, 9 february 2009. Acesso em: 23/04/2009.
94. XIONG, M.; SONG, Y.; LIU, L. An experimental study of prevention of peridural adhesion following laminectomy. **Chinese journal of reparative and reconstructive surgery**, Chengdu, v.12, n.5, p.272-275, 1998.
95. YAMADA, K.; MIYAMOTO, S.; NAGATA, I.; KIKUCHI, H.; IKADA, Y.; IWATA, H.; YAMAMOTO, K. Development of a dural substitute from synthetic bioabsorbable polymers. **Journal of Neurosurgery**, Sakyo-ku, v.86, n.6, p.1012-1017. 1997.
96. YOSOF, N.L.B.M.; LIM, L.Y. e KHOR, E. Preparation and characterization of chitin beads as a wound dressing precursor. **Journal of Biomedical Materials Research**, Tokyo, Japan, v.54, p.59-68, 2001.
97. ZHOU, J.; ELSON, C.; LEE, T.D.G. Redution in postoperative adhesion formation and re-formation after an abdominal operation with the use of N, O-

carboxymethyl chitosan. **Journal Surgery**. Nova Scotia, Canadá. p.307-312. 2004.