

# AVALIAÇÃO QUALITATIVA E QUANTITATIVA DAS LESÕES AGUDAS POR ESMAGAMENTO DO NERVO ISQUIÁTICO DO RATO

## QUALITATIVE AND QUANTITATIVE EVALUATION OF RATS' ACUTE INJURIES CAUSED BY ISCHIATIC NERVE SMASHING

PATRICIA YUMI CANTALEJO NAGIMA MAZZER<sup>1</sup>, CLÁUDIO HENRIQUE BARBIER<sup>2</sup>, NILTON MAZZER<sup>3</sup>, VALÉRIA PAULA SASSOLI FAZAN<sup>4</sup>

### RESUMO

Nervos isquiáticos de ratos esmagados com cargas diferentes foram estudados com o auxílio da microscopia de luz. Pesos de 500 g, 1.000 g, 5.000 g, 10.000 g, e 15.000 g foram utilizados por 10 minutos num dispositivo portátil especialmente desenvolvido para este estudo. As análises morfológicas e morfométricas das fibras mielínicas mostraram que a lesão produzida às fibras neurais e ao tecido neural foi diretamente proporcional à carga aplicada e que uma carga de 500 g é suficiente para produzir um dano severo, com lesão importante das estruturas do endoneuro.

**Decritores:** Rato, Nervo isquiático, Esmagamento, Carga mecânica, Morfometria

### SUMMARY

Rats' ischiatic nerves smashed with different loads were studied with the aid of light microscopy. Weights of 500 g, 1,000 g, 5,000 g, 10,000 g, and 15,000 g were used for 10 minutes in a portable device, especially developed for this study. Morphological and morphometrical analyses of myelinic fibers showed that the injury produced on neural fibers and on neural tissue was directly proportional to the load applied and that a load of 500 g is enough to produce a severe damage, with an important injury of endoneural structures.

**Keywords:** Rat, Ischiatic nerve, Smashing, Mechanical load, Morphometrics

### INTRODUÇÃO

As lesões dos nervos periféricos são cada vez mais freqüentes na rotina dos atendimentos de urgência dos hospitais, em consequência do aumento da violência urbana, dos acidentes de trânsito, profissionais e domésticos<sup>(1)</sup>. A recuperação morfológica e funcional após uma lesão nervosa raramente é completa e perfeita, apesar da aplicação de técnicas modernas e sofisticadas de tratamento. Inúmeros fatores podem influenciar a regeneração da fibra nervosa lesada, tais como a idade do paciente, o tipo de trauma, a localização da lesão, o tempo de desnervação, o tipo e o diâmetro das fibras nervosas acometidas, o método empregado para a reparação nervosa além de outras variáveis individuais<sup>(2)</sup>.

A maior parte dos conhecimentos atuais sobre a regeneração dos nervos, tem sido gerada por investigações experimentais, nas quais inúmeras variáveis são controladas, garantindo a confiabilidade dos resultados. Assim, em nosso meio, vários estudos experimentais têm sido realizados, enfocando a recuperação funcional após lesões por esmagamento<sup>(3)</sup> novas técnicas alternativas de reparo cirúrgico<sup>(1,4)</sup> e o uso de recursos terapêuticos físicos (laser, eletricidade e ultra-som) que possam estimular a regeneração morfológica dos nervos<sup>(2,5)</sup>.

De Medinaceli et al<sup>(6)</sup> concluíram que uma lesão provocada por esmagamento é uma modalidade útil para o estudo de regeneração dos nervos periféricos, pois ela mimetiza um tipo de axoniotmese, na qual os danos são suficientes para romper o axônio, levando à degeneração Walleriana distal, mas o prognóstico de recuperação funcional é bom, devido à preservação das estruturas de sustentação, como a célula satélite, a membrana basal e o tecido conectivo de suporte.

Diversos autores propuseram a utilização de modelos experimentais de lesão nervosa por esmagamento para estudar não só a lesão em si, mas também a regeneração e a recuperação funcional<sup>(2,3,5,7,8)</sup>. Uma

variedade de métodos tem sido usada para realizar a compressão nervosa em animais, sem a necessária padronização, onde cada autor utiliza seu próprio método, predominando as pinças hemostáticas ou outras, de uso rotineiro em operações cirúrgicas<sup>(9)</sup>. Há também dispositivos mais complexos, como as máquinas universais de ensaios e outros<sup>(2,3,5,7)</sup>. O tempo de aplicação da compressão/esmagamento, bem como o comprimento do segmento lesado, varia muito, cada autor utiliza os de sua preferência sem uma argumentação lógica específica a respeito. O fato é que não havia uma padronização clara de nenhum dos parâmetros, o que permite uma grande dificuldade na comparação entre esses estudos.

Entretanto, a lesão por esmagamento produzida manualmente com uma pinça não é controlada e sua gravidade pode variar com a pressão momentânea exercida pelo pesquisador. Este método não é suportado de forma absoluta na literatura, já que poucos trabalhos avaliaram a extensão do dano provocado por estes instrumentos no local da lesão. Esta lacuna motivou primeiro, o uso de uma máquina universal de ensaios para produzir uma lesão controlada<sup>(2,3)</sup> e, segundo, a análise da lesão controlada, agora produzida por um dispositivo de peso morto, para avaliar a proporcionalidade exata entre carga e intensidade da lesão, ainda inexistente na literatura.

O objetivo deste trabalho foi classificar, através da análise morfológica, e quantificar, através da análise morfométrica, as lesões provocadas por diferentes cargas de esmagamento no nervo isquiático do rato, utilizando um dispositivo de peso morto especialmente desenhado e confeccionado para produzir a lesão e a microscopia de luz, para estudá-la.

### MATERIAL E MÉTODO

Para a realização deste trabalho, foi utilizado um dispositivo portátil de peso morto para esmagamento do nervo isquiático do rato (Fi-

Trabalho realizado no Departamento de Biomecânica, Medicina e Reabilitação do Aparelho Locomotor da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP.

Endereço para correspondência: Departamento de Biomecânica, Medicina e Reabilitação do Aparelho Locomotor da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP. Av. Bandeirantes, 3900 – Ribeirão Preto – São Paulo – Brasil – CEP: 14049-900. Fone: (16) 36022513 – E-mail – patnagima@hotmail.com

1 - Doutoranda em Ciências Médicas pelo Departamento de Biomecânica, Medicina e Reabilitação do Aparelho Locomotor da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP.

2 - Professor Titular Departamento de Biomecânica, Medicina e Reabilitação do Aparelho Locomotor da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP.

3 - Professor Associado Departamento de Biomecânica, Medicina e Reabilitação do Aparelho Locomotor da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP.

4 - Professora Doutora do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP.

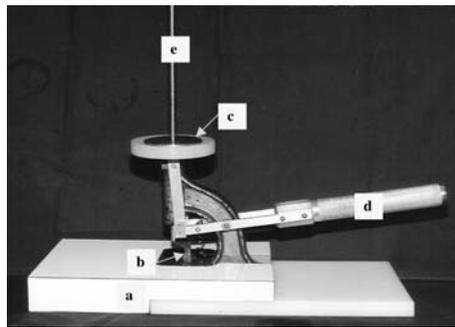
Trabalho recebido em 31/03/06 aprovado em 31/05/06

gura 1), especialmente desenvolvido para substituir a máquina universal de ensaios e a pinça com mola utilizada em trabalhos anteriores e para tornar o processo de esmagamento mais fácil, rápido e confiável, quanto à carga aplicada.

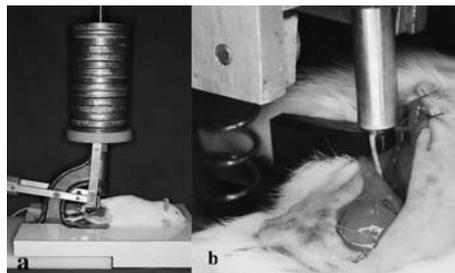
O projeto de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Foram utilizados para o experimento 25 ratos machos da linhagem Wistar, com peso corporal variando entre 250 – 280 g. Os animais foram divididos em 5 grupos experimentais, conforme o peso utilizado no esmagamento. O procedimento de esmagamento foi realizado no nervo isquiático direito em todos os animais, e o esquerdo, foi tomado como controle. O esmagamento era feito por 10 minutos, interessando um segmento intermediário do nervo de 5 mm de comprimento. No grupo 1, o esmagamento foi realizado com uma carga de 500 g, no grupo 2, de 1.000 g, no grupo 3, de 5.000 gramas, no grupo 4, de 10.000 g, e no grupo 5, de 15.000 g.

Os animais foram anestesiados com uma mistura de Ketamina a 10% (0,1ml/100 g peso corpóreo) e Xylazina a 2% (0,07ml/100 g peso corpóreo), administrada por via intra-peritoneal. O nervo isquiático era identificado e um ponto de sutura (Mononylon 10-0, Ethicon®), era passado no epineuro, para identificar o local de realização do esmagamento, 5 mm abaixo da emergência do nervo no forame isquiático maior. Exposto o nervo, o animal era posicionado no dispositivo de esmagamento, e esmagado por 10 minutos (Figura 2). Após a produção da lesão, o animal era removido do dispositivo de esmagamento, e a ferida cirúrgica era suturada e lavada com solução anti-séptica (álcool iodado a 20%), e os animais eram colocados em gaiolas apropriadas para se recuperarem do procedimento.

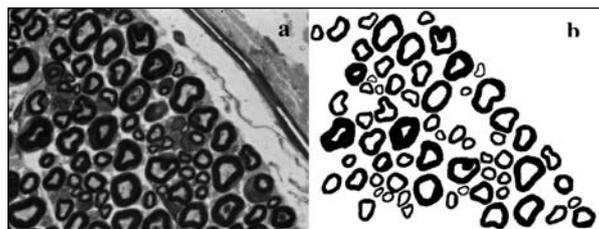
Para a realização dos procedimentos histológicos, todos os animais foram mortos 72 horas após o procedimento de esmagamento, para remoção dos nervos isquiáticos e posterior preparo para as análises morfológicas e morfométricas do segmento esmagado. Os nervos estudados tiveram seções transversais semifinas (05  $\mu$ m de espessura) obtidas com navalhas de vidro através de um ultramicrotomo MT 6000 – XL (RMC Inc.), transferidas para lâminas de vidro com uma gota de água destilada, secadas em platina aquecida a 60 °C e coradas com azul de toluidina a 1% em ácido bórico saturado; tais seções foram utilizadas para estudos de microscopia de luz (Figura 3). Os procedimentos histológicos utilizados nesse trabalho são os mesmos empregados de rotina no preparo de espécimes de nervos para estudos em nível de microscopia de luz<sup>(10)</sup>. O segmento utilizado no presente estudo foi o segmento médio, sendo os proximais e distais armazenados como material reserva. As seções transversais semifinas dos segmentos médios dos nervos retirados foram avaliadas num equipamento que consiste de um microscópio de luz, equipado com uma câmera de vídeo acoplada a um micro computador através de uma placa frame grabber. O software utilizado para realizar a morfometria é o



**Figura 1** - Dispositivo de esmagamento do nervo isquiático do rato. Base de fôrmica lisa (a); base de aço inoxidável (b); alavanca (c); massas aferidas de chumbo (d); haste para encaixe das massas aferidas e compressão do nervo (e).



**Figura 2** - Esmagamento do nervo isquiático no dispositivo. Peso aplicado num segmento de 5 mm de comprimento, por 10 minutos. (a) visão geral do posicionamento do animal, (b) detalhe do nervo isquiático sendo esmagado.



**Figura 3** - Exemplo de campo microscópico com 640 x 470 pixels, digitalizado, no formato RGB, a partir de um fascículo do nervo isquiático. Essa imagem foi digitalizada com objetiva de 100 vezes com imersão a óleo, lente auxiliar (Optovar) de 1,6 vezes e lente da câmera de 0,5 vezes. Coloração = azul de toluidina a 1% (a). Imagem binarizada (b).

Kontron Eletronik Imaging System KS400, Rel. 2.0.

As imagens digitalizadas foram observadas com a intenção de se quantificar a presença de hematoma, infiltrado inflamatório, axônios distróficos, células espumosas, vasos endoneurais íntegros e fibras lesadas (tanto as de pequeno diâmetro quanto as de grande diâmetro). Foram consideradas fibras lesadas, aquelas que apresentaram alterações evidentes em sua bainha de mielina, tais como a presença de “bolas” isoladas de mielina, “quebras” da bainha, axônios muito grandes com bainha muito fina.

Após o término de todo o processo morfométrico, os parâmetros analisados no presente estudo foram: número e densidade de fibras mielínicas normais e lesadas, densidade de fibras mielínicas normais e lesadas, e com a binarização das fibras mielínicas foi possível obter os seguintes parâmetros: área e o diâmetro mínimo das fibras mielínicas e seus respectivos axônios, e razão G.

Com a utilização do software gráfico Sigma Plot foram gerados os histogramas de distribuição de frequência de fibras, axônios e razão G, que são as representações gráficas das distribuições dessas estruturas no nervo analisado.

Para a análise estatística o teste de Kolmogorov-Smirnov foi aplicado para testar a normalidade da distribuição de todos os dados obtidos. Os dados morfométricos médios que apresentaram distribuição normal foram comparados entre os grupos, pela análise de variância para fator único (one way ANOVA), seguida do pós-teste de Tukey. Os dados de distribuição não normal foram comparados pela análise de variância para fator único (one way ANOVA) on Ranks, seguida do pós-teste de Dunn. Os histogramas de distribuição do tamanho das fibras, do tamanho dos axônios e da razão G foram comparados entre os grupos através de uma análise de

variância para fator único (one way ANOVA), seguida de um pós-teste de Tukey para dados com distribuição normal. Para os dados com distribuição não normal, uma análise de variância para fator único (one way ANOVA) on Ranks, seguida de um pós-teste de Dunn foi utilizada. As diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ .

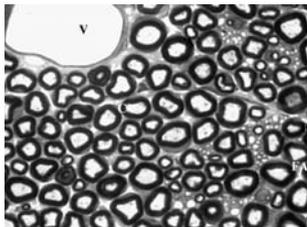
## RESULTADOS

A análise morfológica macroscópica mostrou que o nervo esmagado era visivelmente mais largo, com a espessura muito reduzida, proporcionalmente à carga aplicada, chegando ao ponto de deixá-lo quase translúcido. Nenhum dos nervos se rompeu durante o procedimento.

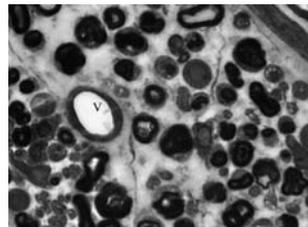
Pela análise morfológica microscópica do endoneuro dos nervos foi analisada a presença de hematoma, infiltrado inflamatório, axônios distróficos, células espumosas, vasos endoneurais íntegros e fibras lesadas (tanto as de pequeno quanto as de grande diâmetro). Estes parâmetros estão apresentados na Tabela 1. As imagens de cada grupo de esmagamento do nervo isquiático com suas alterações

Endoneuro	Vasos íntegros e abertos	Hematoma	Infiltrado inflamatório	Fibras lesadas		Células espumosas	Atrofia axonal	Bolas de mielina	Células distróficas
				Pequenas	Grandes				
500g	+++	++	++	++	+++	+	++	++	+
1.000 g	+++	+	+++	++	+++	+	+++	++	+
5.000 g	++	+	++	+	++	+	++	+	+
10.000 g	+	++	+++	++	+++	++	+++	+++	+
15.000 g	+	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	+

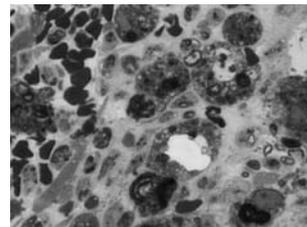
**Tabela 1 -** Avaliação morfológica das alterações do endoneuro pelo sistema de cruzes, onde uma cruz (+) significa discreta quantidade, duas (++) significa moderada, e três cruces (+++) acentuada.



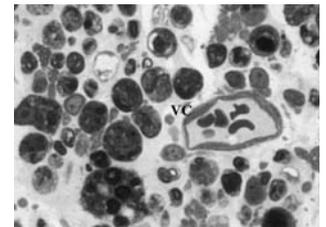
**Figura 4 -** imagem de um nervo controle. Observamos a presença de fibras grandes (A) e pequenas (B) normais, e fibras de grande diâmetro alteradas (C), notar a presença de vaso capilar armado no endoneuro (V), e área de fibra amielínica (AF).



**Figura 5 -** Imagem representativa de uma secção transversal semifina de um nervo isquiático do grupo de esmagamento com 500 g, ilustrando a presença de vasos íntegros e células inflamatórias, lesão de fibras mielínicas de grande diâmetro.



**Figura 6 -** Imagem representativa de uma secção transversal semifina de um nervo isquiático do grupo de esmagamento com 1.000 g, ilustrando a presença de células inflamatórias, lesão de fibras mielínicas de grande diâmetro, e algumas fibras preservadas, presença de hematoma e células espumosas.

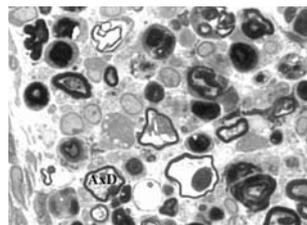


**Figura 7 -** Imagem representativa de uma secção transversal semifina de um nervo isquiático do grupo de esmagamento com 5.000 g, ilustrando a presença de vasos íntegros-V e lesões da mielina (bolas de mielina-BM) e células inflamatórias.

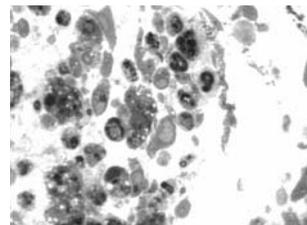
podem ser visualizadas nas Figuras 4, 5, 6, 7, 8, e 9.

Foi realizada a análise morfométrica dos fascículos, e os dados de morfometria do número de fibras mielínicas normais e lesadas dos grupos estudados estão demonstrados na Tabela 2 e na Figura 10. Os dados da densidade de fibras mielínicas normais e lesadas dos grupos estudados estão demonstrados na Tabela 3 e na Figura 11. Comparando os resultados obtidos para o número e densidade de fibras mielínicas normais e lesadas, a análise estatística mostrou diferenças entre o grupo controle e todos os grupos esmagados ( $p < 0.05$ ). Entre os grupos esmagados não houve diferença.

Os valores médios dos dados da morfometria das fibras mielínicas e dos axônios mielinizados (área e diâmetro mínimo da fibra, área e diâmetro mínimo do axônio, e razão G), são demonstrados na Tabela 4. Comparando os resultados obtidos para a área e para o diâmetro mínimo das fibras mielínicas, a análise estatística não mostrou diferença significativa entre os grupos estudados ( $p > 0.05$ ). Comparando os resultados obtidos para a área do axônio, a análise estatística não mostrou diferença significativa entre os grupos estudados ( $p > 0.05$ ). Comparando os resultados obtidos para o diâmetro mínimo do axônio, a análise estatística mostrou diferença significativa entre o grupo controle e os grupos esmagados com 500g, 1000g e 15000g ( $p < 0.05$ ). Não foi observada diferença estatisticamente significativa quando comparamos o grupo controle com os grupos esmagados com 500g e 1000g, e ainda, não houve diferença entre os grupos esmagados. Comparando os resultados obtidos para a razão G, a análise estatística mostrou diferença significativa entre o grupo controle e todos os grupos esmagados, e ainda entre os grupos esmagados com



**Figura 8 -** Imagem representativa de uma secção transversal semifina de um nervo isquiático do grupo de esmagamento com 10.000 g, ilustrando a presença de axônios distróficos-AxD.



**Figura 9 -** Imagem representativa de uma secção transversal semifina de um nervo isquiático do grupo de esmagamento com 15.000 g, ilustrando presença de células espumosas e inflamatórias e perda de tecido endoneural.

1000g e 15000g ( $p < 0.05$ ).

Foi realizada uma análise estatística dos histogramas de distribuição do diâmetro das fibras mielínicas dos axônios mielinizados e da distribuição de frequência da razão G.

Esta análise não mostrou diferença significativa nos histogramas de distribuição do diâmetro mínimo das fibras mielínicas e seus respectivos axônios, bem como na distribuição de frequência da razão G, entre todos os grupos estudados, apesar das evidentes diferenças, como mostram os gráficos de distribuição abaixo.

Quando analisamos as distribuições das fibras de todos os grupos em conjunto, notamos que as distribuições das fibras dos grupos esmagados com 500 g e 1.000 g se assemelham ao controle, com certo desvio das distribuições para a esquerda. Entretanto, quando analisamos as distribuições dos grupos esmagados com 5.000 g e 10.000 g, essas distribuições são semelhantes entre si e muito deslocadas para a esquerda, com perda do padrão bimodal normal e uma grande porcentagem de fibras de pequeno diâmetro. Quando analisamos as distribuições do grupo esmagado com 15.000 g, notamos diminuição severa de todas as classes e desarranjo completo do histograma, o que difere muito de todos os outros grupos (Figura 12).

Interessantemente, ao analisarmos os histogramas das distribuições dos axônios, todos os grupos esmagados são muito semelhantes entre si e muito diferentes do controle. Esses histogramas são desviados para a esquerda, com pico único em torno de 1  $\mu$ m de diâmetro; essa mudança no padrão do histograma é bastante sugestiva de redução muito acentuada dos diâmetros axonais (Figura 13).

Ao analisarmos o conjunto das distribuições da razão G, nota-

mos um alargamento da base de todos os grupos esmagados, com redução acentuada da porcentagem de fibras com razão G 0,6 (como no controle). Por outro lado, houve aumento importante das frequências de razão G maiores e menores que 0,6, indicando um grande número de fibras com desmielinização e atrofia axonal, respectivamente. Ainda pode-se observar que o número de fibras com características de atrofia axonal é maior que o de fibras com desmielinização, nos grupos esmagados (Figura 14).

## DISCUSSÃO

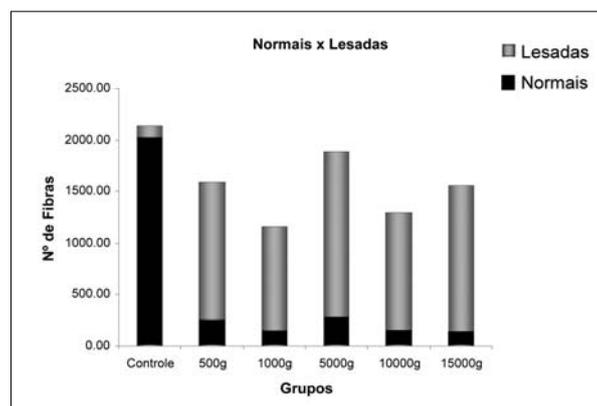
As lesões por esmagamento são de ocorrência relativamente grande, do ponto de vista clínico, razão para conhecê-la com mais detalhes do que os atualmente disponibilizados na literatura médica. Por outro lado, são um modelo praticamente ideal para uso experimental, particularmente na pesquisa sobre modalidades terapêuticas das lesões dos nervos periféricos em geral, pois não há aqui o fator complicador da secção total seguida de sutura.

A literatura especializada é relativamente farta em publicações enfocando aspectos da regeneração dos nervos periféricos, utilizando modelos de lesão por esmagamento. Entretanto, não há um padrão de lesão por esmagamento, cada autor utilizando-se de um equipamento ou técnica diferente, de modo que é altamente discutível a reprodutibilidade de cada método. Chen et al.<sup>(7)</sup> introduziram uma lesão por esmagamento controlado, utilizando uma máquina de esmagamento, com a qual é possível fixar a carga necessária para produzir a lesão. Este mesmo modelo foi empregado com sucesso por outros pesquisadores, no nosso meio, com uma máquina universal de ensaios<sup>(2,3)</sup>, e com uma máquina de esmagamento com carga controlada<sup>(5)</sup>. Todavia, após alguns anos utilizando-o, percebeu-se que o exato grau de lesão produzido não era conhecido, particularmente empregando cargas tão díspares como a seqüência de 100 g, 500 g e 15.000 g preconizada por Chen et al.<sup>(7)</sup>. Este foi o motivo da presente investigação, cujo objetivo foi o de analisar qualitativa e quantitativamente as lesões por esmagamento produzidas com cargas de magnitude crescente rigorosamente controladas, utilizando o rato como animal de experimentação e técnicas de histo-morfometria.

O rato foi o animal escolhido para a realização do experimento devido à facilidade de manuseio e à disponibili-

Carga	N	Número de Fibras normais	Número de Fibras Lesadas
Controle	5	2027 ± 294	114 ± 15
500g	5	268 ± 86*	1323 ± 170#
1000g	5	153 ± 32*	1006 ± 169#
5000g	5	285 ± 96*	1602 ± 652#
10000g	5	154 ± 70*	1142 ± 239#
15000g	5	139 ± 72*	1412 ± 366#

**Tabela 2** - Número de fibras normais e lesadas dos nervos isquiáticos de ratos Wistar segundo as diferentes cargas. Valores expressos em média ± DPM. N = número de animais analisados. Carga = peso utilizado para o esmagamento. \* indica diferença significativa comparada ao grupo controle para o número de fibras normais; # indica diferença significativa comparada ao grupo controle para o número de fibras lesadas.



**Figura 10** - Número de fibras normais (azul) e alteradas (rosa) nos diferentes grupos experimentais. Houve diferença significativa entre o grupo controle e todos os grupos experimentais, nos dois parâmetros. Não houve diferença significativa entre os grupos experimentais.

Carga	N	Densidade de Fibras normais (fibras/mm <sup>2</sup> )	Densidade de Fibras Lesadas (fibras/mm <sup>2</sup> )
Controle	5	16426 ± 2102	939 ± 206
500g	5	1529 ± 534*	7531 ± 1645#
1000g	5	1003 ± 78*	6778 ± 1799#
5000g	5	1557 ± 576*	8480 ± 2740#
10000g	5	1062 ± 695*	7306 ± 2231#
15000g	5	493 ± 321*	5004 ± 2039#

**Tabela 3** - Densidade de fibras normais e lesadas dos nervos isquiáticos de ratos Wistar segundo as diferentes cargas. Valores expressos em média ± DPM. N = número de animais analisados. Carga = peso utilizado para o esmagamento. \* indica diferença significativa comparada ao grupo controle para o número de fibras normais; # indica diferença significativa comparada ao grupo controle para o número de fibras lesadas.

dade, bem como, ao uso consagrado no estudo da regeneração nervosa, e ainda, o fato de que a maioria dos estudos existentes sobre as lesões por esmagamento terem sido realizados tendo o rato como animal de experimentação<sup>(1,2,3,5)</sup>.

A histologia, a eletrofisiologia e a análise funcional do isquiático do rato, são métodos padrões para avaliar a recuperação das lesões nervosas<sup>(1,2,3,5)</sup>. Não temos ainda, na literatura, um método padrão estabelecido para induzir ou provocar uma determinada lesão nervosa durante o esmagamento.

O tempo de esmagamento foi fixado em 10 min, pois é o que reproduz adequadamente o que ocorre em situações clínicas, como acidentes automobilísticos, acidentes em construção e industriais<sup>(3,7)</sup>. Ainda, em nosso laboratório esse tempo tem sido padronizado em todas as pesquisas<sup>(1-3,5)</sup>. Porém na literatura o esmagamento tem variado de dois segundos a 24 horas<sup>(9,11-13)</sup>.

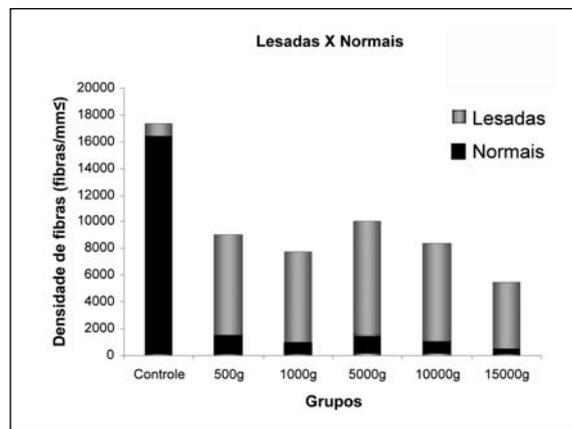
Encontramos vários fatores que dificultaram a discussão dos nossos resultados, pois a literatura, apesar de ser vasta, em geral não abordou os itens da nossa pesquisa.

Com relação à carga utilizada para induzir o esmagamento, poucos trabalhos têm quantificado a sua aplicação na pesquisa. Em alguns dos trabalhos, a máquina universal de ensaios ou outro tipo de máquina foi utilizada, em geral por 10', podendo variar até 10h de esmagamento, e a carga variou de 100g, 500g e 15000g<sup>(3,7)</sup>. A carga fixa em 15000 g foi utilizada por Mendonça et al.<sup>(2)</sup>, e Monte-Raso et al.<sup>(5)</sup>. Em outros trabalhos, foi utilizada uma máquina para realizar compressão de 30 a 80mmHg<sup>(11)</sup>. A nossa pesquisa utilizou um dispositivo portátil de peso-morto para esmagamento do nervo isquiático do rato, com carga estática de 500 g, 1.000g, 5.000 g, 10.000 g, e 15.000 g. Esse dispositivo foi desenvolvido com o intuito de tornar o processo de esmagamento mais fácil, rápido e confiável, quanto à carga aplicada. Mesmo não sendo fidedigna a reprodutibilidade, autores têm produzido o esmagamento com o auxílio de vários instrumentos. A pinça de joalheiro nº 5 tem sido utilizada por autores como Kurtoglu et al.<sup>13</sup>. Outros autores fizeram uso da pinça, sem especificação mais precisa de qual o seu tipo<sup>(9)</sup>. A linha de seda foi utilizada por Okajima et al.<sup>(12)</sup>.

Mesmo com a carga quantificada, poucos trabalhos têm estudado qual a lesão provocada com cada carga, com o objetivo de padronizar o mé-

tudo de indução do esmagamento de um nervo, ou seja, estabelecer um modelo de lesões nervosas por esmagamento. Bridge et al.<sup>(8)</sup> utilizaram uma pinça de joalheiro nº 5, alternando o tempo e a quantidade em vezes, e não a carga, da aplicação, e ainda utilizaram uma pinça hemostática serrilhada, com o objetivo de avaliar e comparar os efeitos destes métodos de induzir a lesão nervosa por esmagamento. Observaram que apesar do método utilizado para induzir a lesão nervosa por esmagamento, o resultado foi similar ao segundo grau de lesão (axoniotmese) com raros fatores de um terceiro grau (regeneração extraepineural), em todos os grupos mostrando a histologia similar. Parece que apesar de vários métodos utilizados para transmitir a lesão nervosa, a resposta funcional e fisiológica para o esmagamento foi a mesma<sup>(14)</sup>. desenvolveram uma pinça não-serrilhada com forças pré-determinadas a serem aplicadas no nervo para produzir lesões de segundo grau. Em nossa pesquisa desenvolvemos um dispositivo para portátil de peso-morto para esmagamento do nervo isquiático do rato, o que permitiu induzirmos uma lesão confiável, com carga variando em 500 g, 1.000 g, 5.000 g, 10.000 g, e 15.000 g.

A maioria dos trabalhos da literatura avaliou a histomorfometria do nervo após duas semanas do esmagamento, fato que não possibilitou a comparação destes resultados com os nossos<sup>(3,8,15)</sup>. Em



**Figura 11** - Densidade de fibras normais (azul) e alteradas (rosa) nos diferentes grupos experimentais. Houve diferença significativa entre o grupo controle e todos os grupos experimentais, nos dois parâmetros. Não houve diferença significativa entre os grupos experimentais.

Nervo	Área da fibra (µm²)	Ø min fibra (µm)	Área do axônio (µm²)	Ø min axônio (µm)	Razão G
Controle	24,83 ± 2,71	4,91 ± 0,29	7,39 ± 1,47	2,60 ± 0,29	0,53 ± 0,03
500g	19,98 ± 9,53	3,95 ± 0,96	4,41 ± 2,49	1,61 ± 0,43	0,42 ± 0,01*
1000g	25,77 ± 17,20	4,23 ± 1,50	7,38 ± 6,44	1,86 ± 0,81	0,44 ± 0,03*#
5000g	17,93 ± 13,11	3,54 ± 1,41	3,80 ± 3,54	1,39 ± 0,64*	0,40 ± 0,02*
10000g	16,05 ± 10,17	3,34 ± 1,14	3,47 ± 3,23	1,31 ± 0,54*	0,42 ± 0,03*
15000g	24,81 ± 687	4,38 ± 0,69	3,78 ± 1,23	1,49 ± 0,21*	0,37 ± 0,03*#

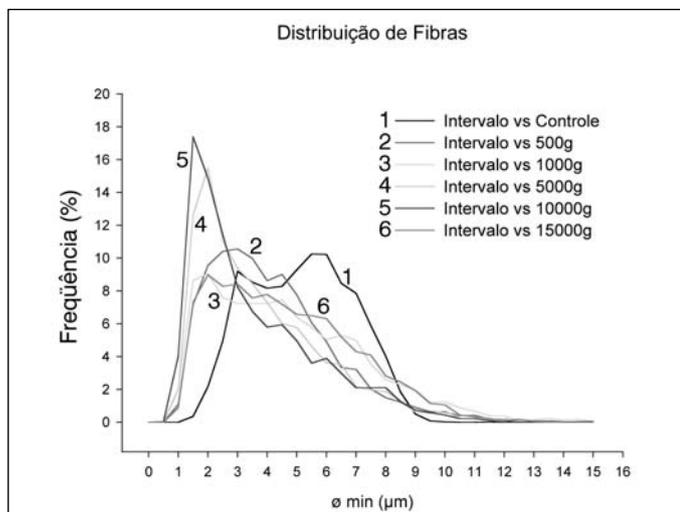
**Tabela 4** - Parâmetros morfométricos médios das fibras mielínicas dos nervos isquiáticos de ratos controles e submetidos ao esmagamento com diferentes cargas. \* indica diferença significativa do grupo controle comparado aos outros grupos experimentais. # indica diferença significativa entre os grupos.

nossa pesquisa, a avaliação histomorfométrica foi realizada com 72 horas após o esmagamento do nervo isquiático.

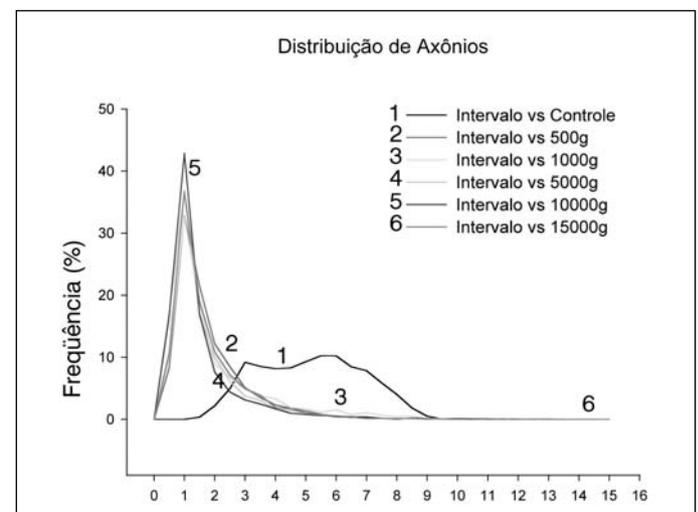
Alguns trabalhos da literatura estudaram o local exato do esmagamento, porém o tempo de análise do segmento esmagado não é correspondente ao nosso tempo<sup>(8)</sup>. Mesmo tendo o mesmo local de análise morfométrica, o tempo de análise não corresponde com o nosso trabalho, não sendo portanto, comparáveis<sup>(15)</sup>. Observar a arquitetura do nervo, qualidade e quantidade das fibras nervosas regeneradas e grau de mielinização. O local do esmagamento também foi analisado, porém o tempo de análise não correspondeu com o do nosso estudo.

Alguns trabalhos da literatura estudaram o local exato do esmagamento, com o tempo de análise do segmento esmagado próximo ao nosso tempo<sup>(16)</sup>. Os resultados nos dias 1 e 5 de ambos os grupos mostraram o mesmo grau de edema difuso, degeneração da maioria dos axônios, e infiltração de macrófagos<sup>(13)</sup>. No segundo dia observaram infiltração difusa de eritrócitos no epineuro em ambos os grupos, a de-

generação de mielina foi mais proeminente em fibras de tamanho grande e médio, as fibras mielinizadas pequenas foram protegidas em ambos os grupos. Na presente investigação, os achados morfológicos variaram desde um envolvimento vascular até franca degeneração walleriana, com ruptura de axônios isolados e respectivas bainhas



**Figura 12** - Distribuição de fibras de todos os grupos experimentais.



**Figura 13** - Distribuição de axônios de todos os grupos experimentais.

de mielina nas cargas até 1.000 g, ruptura do envoltório perineural nas cargas de 5.000 g em apenas um nervo, de 10.000 g em dois nervos e de 15.000 g nos cinco nervos estudados. A presença de vasos íntegros e abertos foi proporcionalmente inversa à intensidade da carga aplicada. A presença de infiltrado inflamatório, de fibras grande diâmetro lesadas, atrofia axonal e bolas de mielina, foi de moderada a intensa em todas as cargas aplicadas. As fibras de pequeno diâmetro foram intensamente lesadas no grupo que utilizou 15.000 g para o esmagamento. As células espumosas se tornaram mais presentes nas cargas de 10.000 g e 15.000 g. Houve presença discreta de células distróficas em todos os grupos esmagados.

Com relação aos achados morfométricos, a presente pesquisa observou que as fibras de pequeno diâmetro ficaram mais preservadas do que as de grande diâmetro, como descreveu Sunderland em 1951, exceto no grupo de 15.000 g, no qual ambas foram extremamente lesadas<sup>(6)</sup>, apesar de terem realizado a análise morfométrica oito semanas após a lesão, também observaram a presença de maior número de fibras de pequeno calibre nos grupos esmagados com pinça de joalheiro nº 5. A razão G foi significativamente maior entre todos os grupos esmagados, quando comparados com o grupo controle, e ainda, entre os grupos de 1.000 g e 15.000 g. No trabalho de Bridge et al<sup>(6)</sup>, a razão G foi maior entre o grupo de esmagamento simples de 60 segundos (esmagamento mais prolongado da pesquisa) e o grupo controle. Com relação ao número e densidade de fibras lesadas e normais, não houve diferença estatística como no trabalho de Bridge et al<sup>(6)</sup>.

Entender a classificação das lesões é importante para determinar o tratamento dos pacientes lesionados. Seddon, em 1943, foi o primeiro a classificar a lesão nervosa em neuropraxia, axoniotmese e neurotme. Este sistema de classificação foi expandido por Sunderland, em 1951, para incluir dois outros padrões de lesão. Uma neuropraxia (primeiro grau de Sunderland) envolve um bloqueio da condução de uma área local, onde anormalidades histológicas podem estar presentes, incluindo a desmielinização segmentar sem anormalidades axonais, porém a recuperação é rápida e completa. A axoniotmese (segundo grau de Sunderland) envolve a lesão do axônio com presença de degeneração Walleriana distal à lesão; a recuperação está associada com o crescimento axonal no tubo endoneural individual

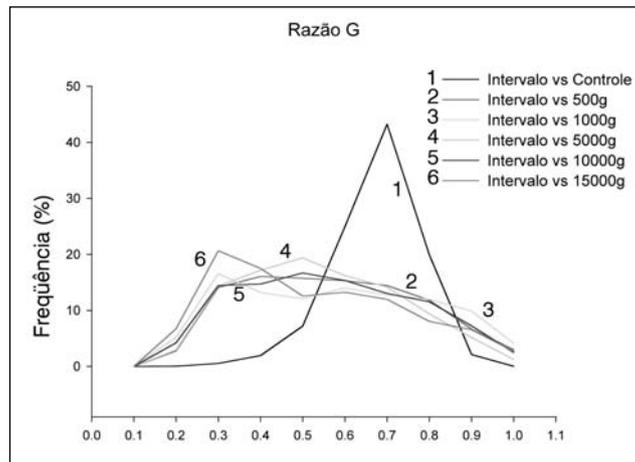


Figura 14 - Razão G de todos os grupos experimentais.

intacto. A lesão de terceiro grau de Sunderland permite uma recuperação funcional variável, pois está associada não somente com a lesão axonal, mas com cicatrizes endoneurais, que pode impedir ou orientar inadequadamente a regeneração axonal. Na lesão de quarto grau de Sunderland o nervo, apesar de estar em continuidade, possui um tipo cicatriz que impede a regeneração funcional. Na neurotme (quinto grau de Sunderland) há uma transecção completa do nervo sem recuperação funcional. Observamos em nossa pesquisa que todas as cargas aplicadas produziram a lesão do tipo neuropraxia e axoniotmese de acordo com a classificação de

Seddon (1943), e, a intensidade da lesão foi dependente da carga utilizada. Assim, a lesão produzida no nervo isquiático do rato com o método utilizado foi mista. Com o intuito de estabelecer paralelo com a classificação de Sunderland (1985), todas as cargas aplicadas na presente pesquisa produziram lesão dos tipos I, II e III, resultando em lesão mista; a lesão tipo IV foi produzida com a utilização dos pesos de 10.000 g e 15.000 g. Por outro lado, foi observado que o número de fibras com características de atrofia axonal foi maior que o de fibras com desmielinização. Esse dado é sugestivo de que a lesão mais importante no modelo de esmagamento ocorre no axônio, caracterizando a classificação de axoniotmese.

## CONCLUSÕES

1. A quantidade de fibras mielínicas lesadas nos nervos isquiáticos de ratos submetidos a lesão por esmagamento foi proporcional à magnitude da carga aplicada, sem diferença significativa com os nervos intocados para as cargas de 100 g e 500 g.
2. Houve predomínio de fibras distróficas em todos os grupos, exceto no de 15.000 g.
3. As fibras de maior diâmetro foram mais afetadas do que as de menor diâmetro para todos os grupos, exceto no de 15.000 g, em que estas últimas igualmente afetadas.
4. O tipo de lesão predominante foi a atrofia axonal, em comparação com a desmielinização.
5. As lesões são mistas com predomínio da axoniotmese.

## AGRADECIMENTO

A CAPES pelo apoio financeiro.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. De Sá JM, Mazzer N, Barbieri CH, Barreira A. The end-to-side peripheral nerve repair functional and morphometric study using the peroneal nerve of rats. *J Neurosci Methods*. 2003; 136:45-53.
2. Mendonça AC, Barbieri CH, Mazzer N. Directly low intensity direct electric current enhances peripheral nerve regeneration in rats. *J Neurosci Methods*. 2003; 129:183-90.
3. Oliveira EF, Mazzer N, Barbieri CH, Selli M. Correlation between functional index and morphometry to evaluate recovery of the rat sciatic nerve following crush injury: experimental study. *J Reconstr Microsurg*. 2001; 17:69-75.
4. Oliveira EF, Mazzer N, Barbieri CH, Deebel EA. The use of muscle graft to repair a segmentary nerve defect. An experimental study using the sciatic nerve of the rats as model. *J Neurosci Methods*. 2004; 133:19-26.
5. Monte Raso VV, Mazzer N, Barbieri CH, Fazan VS. Can therapeutic ultrasound influence the regeneration of peripheral nerves? *J Neurosci Methods*. 2005; 42:185-92.
6. De Medinaceli, L.; Freed, W.J.; Wyatt, R.J. An index of the functional conduction of rat sciatic nerve based on measurements made from walking tracks. *Exp Neurol*. 1982; 77:634-43.
7. Chen L, Seaber AV, Glisson RR, Davies H, Murrell GA, Anthony DC, et al. The functional recovery of peripheral nerves following defined acute crush injuries. *J Orthop Res*. 1992; 10:657-64.
8. Bridge PM, Ball DJ, Mackinnon SE, Nakao Y, Brandt K, Hunter DA, Hertl C. Nerve crush injuries: a model for axonotmesis. *Exp Neurol*. 1994; 127:284-90.
9. Pola R, Aprahamian TR, Bosch-Marcó M, Curry C, Gaetani E, Flex A et al. Age-dependent VEGF expression and intraneural neovascularization during regeneration of peripheral nerves. *Neurobiol Aging*. 2004; 25:1361-8.
10. Fazan VP, Fazan R Jr, Salgado HC, Barreira AA. Aortic depressor nerve myelinated fibers morphology in normotensive Wistar-Kyoto and spontaneously hypertensive rats. *J Anat Nerv Sys*. 1999; 77:133-9.
11. Lundborg G, Myers R, Powell H. Nerve compression injury and increased endoneurial fluid pressure: a "miniature compartment syndrome". *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1983; 46:1119-24.
12. Okajima S, Shirasu M, Hirasawa Y, Ide C. Ultrastructural characteristics and synaptophysin immunohistochemistry of regenerating nerve growth cones following traumatic injury to rat peripheral nerve. *J Reconstr Microsurg*. 2000; 16:637-42.
13. Kurtoglu Z, Ozturk AH, Bagdatoglu C, Turac A, Camdeviren H, Uzmanse D et al. Effect of trapidil on the sciatic nerve with crush injury: a light microscopic study. *Neuroanatomy*. 2004; 3:54-8.
14. Beer GM, Steuter J, Meyer VE. Standardizing nerve crushes with a non-serrated clamp. *J Reconstr Microsurg*. 2001; 17:531-4.
15. Lee M, Doolabh VL, Mackinnon SE, Jost SJ. FK506 promotes functional recovery in crushed rat sciatic nerve. *Muscle Nerve*. 2000; 23:633-40.
16. Algora J, Chen LE, Seaber AV, Wong GH, Urbaniak JR. Functional effects of lymphotoxin on crushed peripheral nerve. *Microsurgery*. 1996; 17:131-5.