

LESÃO POR ESMAGAMENTO DO NERVO ISQUIÁTICO DE RATOS: ESTUDO DA VASCULARIZAÇÃO

RATS' ISCHIATIC NERVE INJURY CAUSED BY SMASHING: A VASCULARIZATION STUDY

CÉLIA APARECIDA STELLUTTI PACHIONI¹, NILTON MAZZER², CLÁUDIO HENRIQUE BARBIERI³, VALÉRIA PAULA SASSOLI FAZAN⁴, CARLOS ROBERTO PADOVANI⁵, CARLOS ALBERTO MORO⁶, CARLOS ALBERTO AGUIAR DA SILVA⁷

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo estudar as alterações microvasculares intraneurais aguda em nervo isquiático de rato submetido a esmagamento por diferentes cargas. Foram utilizados 60 ratos machos da linhagem Wistar, distribuídos em grupos experimentais de acordo com a injeção de vasos e com a carga de esmagamento. Os nervos isquiáticos direitos foram isolados e submetidos ao esmagamento com cargas (0,5 Kg, 1 Kg, 5 Kg, 10 kg e 15 kg) por 10 minutos e os nervos isquiáticos esquerdos foram utilizados como controle. Após esmagamento, os animais foram submetidos à cateterização da aorta abdominal e injeção dos vasos, em seguida 30 nervos direitos e esquerdos foram fixados em formol 10%, desidratados e diafanizados para análise longitudinal dos vasos intraneurais e os restantes retirados em toda a sua extensão, cortados em 3 fragmentos, congelados em isopentano em gelo seco e armazenados em freezer -70°C, seccionados transversalmente para análise e contagem dos vasos intraneurais. As análises macroscópica e microscópica mostraram regiões de hematoma endoneural e epineural nas diferentes cargas de esmagamento. A análise morfométrica sugere que a lesão aos vasos intraneurais foi proporcional à carga de esmagamento, causando hematoma endoneural e epineural, que cria microambiente desfavorável para a regeneração das fibras nervosas.

Descritores: Vascularização; Esmagamento; Nervo Isquiático; Ratos Wistar.

SUMMARY

The objective of this paper was to study acute intraneural microvascular changes in a rat's ischiatic nerve submitted to smashing with different loads. Sixty male Wistar rats were used and distributed into experimental groups according to vessels injection and smashing load. Right ischiatic nerves were isolated and submitted to smashing with loads (0.5 Kg, 1 Kg, 5 Kg, 10 kg, and 15 kg) for 10 minutes and the left ischiatic nerves served as controls. After smashing, the animals were submitted to catheter implantation on abdominal aorta and vessels injection, then 30 right and left nerves were fixed in 10% formal, dehydrated and diaphanized for longitudinal analysis of intraneural vessels and the remaining being fully removed, cut into three fragments, frozen in isopentane with dry ice and stored in a freezer at -70°C, cross-sectioned for analysis and intraneural vessels counting. Gross and microscopic analyses showed regions of endoneural and epineural hematoma on different smashing loads. The morphometrical analysis suggests that intraneural vessels injury was proportional to the smashing load, causing endoneural and epineural hematoma, which creates an unfavorable micro-environment for nervous fibers regeneration.

Keywords: Vascularization; Smashing; Ischiatic nerve; Rats Wistar.

INTRODUÇÃO

As lesões dos nervos periféricos apresentam alterações funcionais tanto sensitivas quanto motoras, e se não forem adequadamente tratadas, podem provocar um déficit importante, com prejuízos não só da qualidade de vida dos pacientes, bem como, do sistema estatal em casos de aposentadoria precoce devido à incapacidade funcional⁽¹⁾.

O nervo periférico possui um sistema microvascular bem desenvolvido no epineuro, perineuro e endoneuro. Seus vasos encontram-se distribuídos em várias camadas no nervo, e são interligados através de numerosas anastomoses⁽²⁾.

A transmissão do impulso nervoso, bem como o transporte axonal, requer um suprimento de energia contínuo proporcionado pelos microvasos intraneurais. O sistema microvascular possui uma grande capacidade de reserva para compensar a mobilização ou lesão dos vasos regionais locais. No epineuro, vasos orientados longitudinalmente exibem um padrão característico, ou seja, os vasos estão presentes em todas as camadas do epineuro, que é,

superficialmente, também como, entre os feixes fasciculares nas camadas profundas do nervo^(3,4).

A importância da vascularização dos nervos periféricos se deve ao fato de os axônios dos nervos periféricos serem vulneráveis à isquemia pela grande distância que existe entre o corpo neuronal e a extensão do axônio⁽⁵⁾.

Diversos estudos propuseram a utilização de modelos experimentais de lesão nervosa por esmagamento para avaliar tanto a lesão em si, como a regeneração e a recuperação funcional^(6,7,8), porém continua pouco conhecida a resposta vascular numa lesão nervosa periférica aguda por esmagamento.

Lesões nervosas periféricas experimentais, no nervo isquiático, podem ser provocadas através de diversos procedimentos, tais como: esmagamento através da compressão, transecção, estiramento e congelamento. Diversos fatores como a magnitude, a duração e o mecanismo do trauma compressivo são importantes para a determinação do grau da lesão⁽⁹⁾.

Quando um nervo é submetido a uma pressão externa, a lesão

Trabalho realizado junto ao Departamento de Biomecânica e Medicina do Aparelho Locomotor da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Campus da Universidade de São Paulo.

Endereço para correspondência: Departamento de Fisioterapia da Faculdade de Ciências e Tecnologia da UNESP – Campus de Presidente Prudente. Rua Roberto Simonsen, 305 – Centro Educacional – Presidente Prudente – SP – Brasil – CEP 19060-900 – E-mail: pachioni@fct.unesp.br

1 - Doutorando no Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, área de concentração: Ortopedia, Traumatologia e Reabilitação da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Campus da USP. Professora Assistente do Departamento de Fisioterapia da Faculdade de Ciências e Tecnologia da UNESP – Campus de Presidente Prudente.

2 - Professor Associado do Departamento de Biomecânica e Medicina do Aparelho Locomotor da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Campus da Universidade de São Paulo.

3 - Professor Titular do Departamento de Biomecânica e Medicina do Aparelho Locomotor da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Campus da Universidade de São Paulo.

4 - Professora Assistente Doutora do Departamento de Cirurgia e Anatomia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Campus da Universidade de São Paulo.

5 - Professor Titular do Departamento de Bioestatística da Faculdade de Medicina da UNESP - Campus de Botucatu)

6 - Mestre em Bioengenharia, Engenheiro do Laboratório de Bioengenharia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Campus da Universidade de São Paulo.

7 - Biólogo, Técnico do Laboratório de Fisiologia Cardiovascular da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Campus da Universidade de São Paulo.

Trabalho recebido em 29/03/06 aprovado em 24/05/06

pode ser provocada tanto pela pressão como pela isquemia. Uma isquemia acontece quando a pressão do esmagamento exceder a pressão de perfusão capilar^(3,10). Portanto, o estudo das alterações vasculares na lesão nervosa especialmente pelo esmagamento merece investigação, uma vez que o mesmo poderia contribuir para melhorar as estratégias de tratamento da lesão nervosa periférica.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados para o experimento ratos machos, adultos, da linhagem Wistar, num total de 60, com peso médio de 250-350 gramas, obtidos no Biotério Central da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Campus da Universidade de São Paulo. Estes foram separados em gaiolas apropriadas e mantidos no Biotério do Laboratório de Fisiologia Cardiovascular da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, pelo menos 48 horas no novo ambiente para aclimação, com dieta à base de ração-padrão e água *ad libitum*.

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CETEA), da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Campus da Universidade de São Paulo.

Os animais foram inicialmente pesados, para cálculo da dose de anestésico (Thionembutal), anestesiados com a dose de 50 mg/Kg de peso corporal, via intraperitoneal, tricotomizados e posicionados em decúbito ventral com suas patas dianteiras e traseiras em completa abdução e fixados à mesa operatória. A anti-sepsia era realizada com solução de álcool iodado a 20%.

Os nervos isquiáticos direitos e esquerdos eram abordados através de uma incisão cutânea longitudinal na face lateral da coxa. Um ponto de sutura (Prolene 6/0, Ethicon) era passado no epineuro para identificar o local de realização do esmagamento. Os nervos isquiáticos direitos de cada grupo experimental eram isolados e submetidos a esmagamento com um dispositivo de diferentes cargas (0,5 Kg, 1,0 Kg, 5,0 Kg, 10,0 Kg e 15,0 Kg) respectivamente, distalmente ao ponto de sutura, durante 10 minutos, sendo que os nervos isquiáticos esquerdos foram utilizados como controle.

O equipamento utilizado no estudo foi desenvolvido no Laboratório de Bioengenharia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, para substituir a máquina de ensaio utilizada em trabalhos semelhantes anteriores e tornar a lesão por esmagamento do nervo isquiático de rato mais fácil e reproduzível.

O equipamento consta de uma plataforma para o apoio do animal (A), com uma estrutura principal (B) que recebe o suporte de apoio para os pesos aferidos (0,5 Kg, 1,0 Kg, 5,0 Kg, 10,0 Kg e 15,0 Kg) com eixo telescópico (C), uma base de apoio para o nervo (D), eixo de aplicação de pressão (E), uma alavanca que serve para acionar os pesos e posicionar o nervo na base de apoio (F) e uma mola para manter a alavanca em equilíbrio (G).

A lesão por esmagamento em um segmento de 5mm do nervo, o qual permanece apoiado em uma base era realizado numa porção intermediária do nervo, distalmente ao ponto de sutura previamente

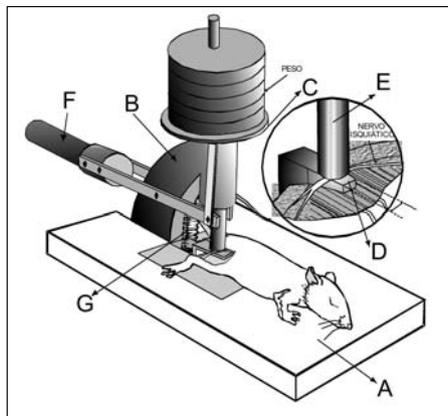


Figura 1 – Ilustração esquemática do equipamento utilizado para produzir o esmagamento do nervo isquiático direito do rato. O esmagamento ocorre em toda a largura do nervo incidindo em 5 mm de comprimento.

passado no epineuro, com os diferentes pesos, durante dez minutos (Figura 1). Os sessenta animais foram divididos em 2 grupos experimentais conforme o protocolo de injeção de vasos e subdivididos em 5 grupos de acordo com a carga utilizada para o esmagamento.

Após 10 minutos de esmagamento com os pesos determinados, 30 animais foram submetidos a cateterização da aorta abdominal com tubo de polietileno PE-50, abaixo da emergência das artérias renais. O tubo de polietileno PE-50 foi conectado a uma seringa de vidro de volume máximo de 20ml e os animais foram perfundidos com injeção manual de 12 a 15ml de uma solução composta de tinta da China e gelatina 5%, dissolvida em formol 10%, aquecida a 37° C em banho-maria.

Imediatamente após o término da perfusão, os nervos isquiáticos direitos (esmagados) e esquerdos (controles) foram coletados e imersos em solução de formol 10% por três dias para a fixação do tecido. Após os três dias imersos em formol 10% foi realizada a desidratação dos nervos isquiáticos, em soluções com concentrações crescentes de álcool: 70%, 80%, 90%, 95% e finalizando com o absoluto, permanecendo 20 minutos em cada solução. A seguir, os nervos foram imersos em xilol por três dias.

Depois de três dias de imersão no xilol, os nervos isquiáticos foram mantidos em uma solução de salicilato de metila e benzoato de benzila, na proporção de 3:2, para diafanização. A análise macroscópica longitudinal da rede vascular dos nervos isquiáticos foi realizada utilizando lupa estereoscópica Leica M651, por transiluminação com negatoscópio Vilber Lourmat e fotografados com máquina fotográfica Olympus acoplada à lupa. As imagens das fotos foram tratadas em programa Nikon instalado em micro-computador.

Os outros trinta animais, após 10 minutos de esmagamento, foram submetidos a cateterização da aorta abdominal, como descrito anteriormente e perfundidos com injeção manual de uma solução composta de tinta da China e gelatina a 5%, dissolvida em soro fisiológico, aquecida a 37° C em banho-maria.

Após o término da perfusão, os animais foram mantidos em freezer -20° C por uma hora. Em seguida, os nervos foram dissecados e retirados em toda a sua extensão, cortados em três fragmentos nas regiões: proximal (acima do local do esmagamento), média (local do esmagamento) e distal (abaixo do local do esmagamento), identificados e imediatamente congelados com isopentano em gelo seco, emblocados com Tissue-Tek. Foram armazenados separadamente em criotubos, em freezer -70° C, e depois seccionados transversalmente (cortes semi-seriados de 20 μ m) em criótomo⁽¹⁹⁾. As diferentes soluções utilizadas para a injeção de vasos se devem ao tipo de análise do material coletado.

Para análise microscópica e contagem dos capilares endoneurais foi feita a escolha de três seções transversais por meio do Software KS 300 e a contagem dos vasos perfundidos nessas três imagens selecionadas de cada região para a obten-

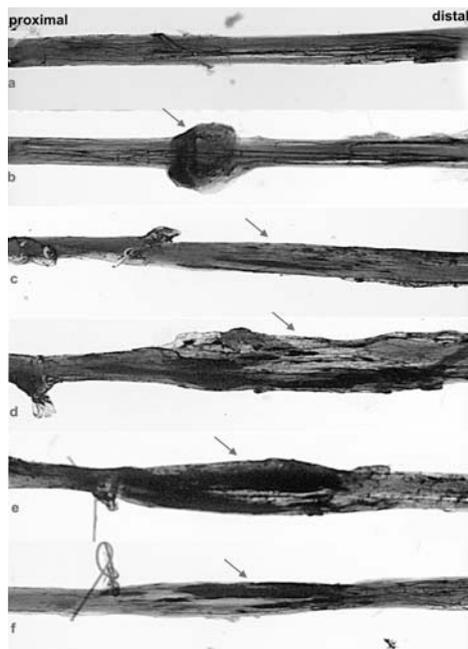


Figura 2 – Fotografias de nervo isquiático de rato controle (a) mostrando sua rede vascular longitudinal e esmagado com 0,5 Kg (b), 1,0 Kg (c), 5,0 Kg (d), 10 Kg (e) e 15 Kg (f), evidenciando hematoma na região média (seta). Aumento 40x.

ção do número médio de vasos preenchidos no lado esmagado e no controle nos diferentes grupos experimentais foi por meio do Software KS Lite.

Os dados referentes à contagem foram submetidos à análise estatística e foi realizada por meio da técnica da análise de variância (ANOVA) não paramétrica para o modelo de medidas repetidas em dois fatores⁽¹²⁾. Diferenças foram consideradas significativas quando $P < 0,05$.

RESULTADOS

A observação macroscópica da rede vascular dos nervos isquiáticos controles sob lupa por transluminação mostrou que o nervo possui padrão vascular bem definido. Inclui uma rede de vasos longitudinais superficiais e espaçados com ramos penetrando transversalmente, que são responsáveis por suprir o fluxo sanguíneo da rede vascular endoneural (Figura 2a). A observação macroscópica dos nervos isquiáticos esmagados foi caracterizada pela presença de uma desorganização da rede vascular com a presença de hematoma e dilatação dos vasos no local do esmagamento e abaixo da lesão de maneira crescente com o aumento da carga de esmagamento (Figuras 2b, 2c, 2d, 2e e 2f).

A análise microscópica dos vasos dos nervos isquiáticos esmagados e dos seus respectivos controles foi efetuada nas regiões acima (proximal) e abaixo (distal) ao local do esmagamento e no local do esmagamento (média).

No grupo controle contralateral, as secções transversais do nervo isquiático esquerdo de todos os animais nas diferentes cargas mostraram um padrão vascular normal (Figura 3a).

No grupo esmagado com 0,5 Kg, na região média (local do esmagamento) foi observado o epineuro intacto com seus vasos preenchidos, um discreto extravasamento da solução injetada indicando um hematoma endoneural com regiões normais de vasos preenchidos, aparentemente de diâmetros menores que os controles (Figura 3b).

No grupo esmagado com 1,0 Kg, na região média

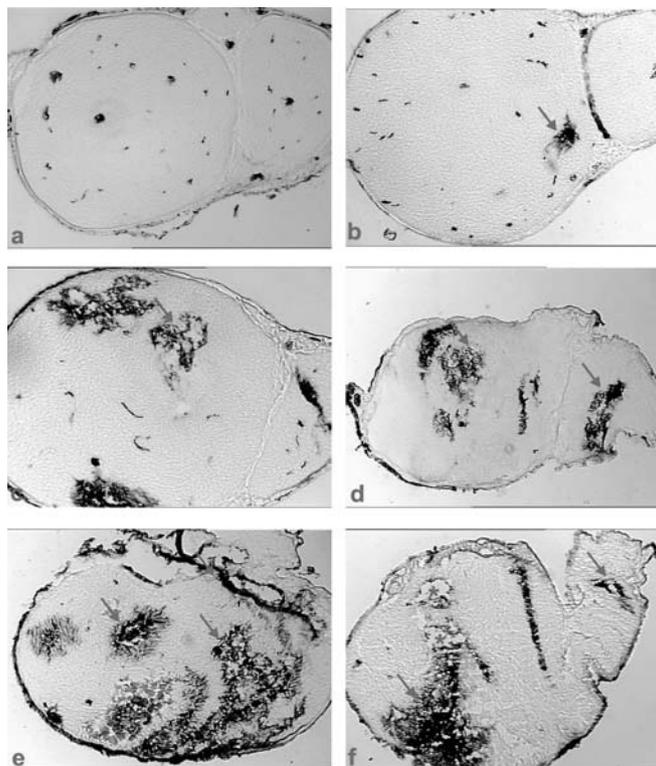


Figura 3 – Fotomicrografias de secção transversal na região média do nervo isquiático de rato controle (a) e esmagado com 0,5 Kg (b), 1,0 Kg (c), 5,0 Kg (d), 10,0 Kg (e) e 15,0 Kg (f). Notar a presença dos vasos intraneurais (capilares) bem preenchidos (a) e a presença de hematoma endoneural (seta), epineural (cabeça de seta) e destruição tecidual (asteriscos). Aumento 100x.

Grupo (G)	Carga (Kg)	Região		
		Proximal	Média	Distal
Esmagado	0,5	36,0±18,0 *	15,0±11,5 #	33,0±11,0.*
	1,0	29,0±15,0 *	13,5± 7,0 #	37,0± 6,0 *
	5,0	41,5± 4,5 *	7,5± 1,5	41,5± 7,0 *
	10,0	35,5± 7,0 *	8,0± 3,5	39,0± 5,0 *
	15,0	42,0±10,5 *	3,5± 9,5	39,0± 8,5 *
Controle	0,5	20,0±18,6	30,0±10,5 Δ	29,5± 7,5
	1,0	24,0±13,5	25,0±13,0 Δ	24,0±10,5
	5,0	38,0±14,5	39,0±13,5 Δ	39,0±11,0
	10,0	34,5±13,0	32,5±10,5 Δ	30,5± 6,0
	15,0	32,0±12,5	36,0±10,5 Δ	36,5± 7,0

($P < 0,05$) (C0,5 = C1,0) vs (C5,0 = C10,0 = C15,0) no grupo esmagado na região média

Δ ($P < 0,05$) para Esmagado vs Controle em todas cargas da região média

* ($P < 0,05$) para (Prox= Distal) vs Média em todas cargas do grupo esmagado

Tabela 1 – Mediana e semi-amplitude total do número de vasos perfundidos, segundo grupo (G), carga (Kg) e região (proximal, média e distal).

Grupo (G)	Carga (Kg)				
	0,5	1,0	5,0	10,0	15,0
Esmagado	30,0±9,5	27,0±8,0	29,0±3,5	27,0±4,5	28,0±5,0 *
Controle	25,5±9,0	29,0±8,0	26,5±11,0	31,5±8,5	34,5±6,0 *

* ($P < 0,05$) para Esmagado vs Controle na carga de 15 Kg.

Tabela 2 – Mediana e semi-amplitude total do número médio de vasos perfundidos, segundo grupo (G) e carga (Kg).

foi também observado o epineuro intacto com seus vasos, porém uma extensão maior do extravasamento da solução injetada indicando hematoma endoneural maior. Alguns vasos preenchidos ainda estavam presentes no endoneuro (Figura 3c).

No grupo esmagado com 5,0 Kg, na região média observamos que a extensão do hematoma foi ainda maior atingindo também os vasos do epineuro. Raros vasos endoneurais preenchidos (Figura 3d).

No grupo esmagado com 10,0 Kg, na região média igualmente podemos observar o hematoma extenso atingindo os vasos epineurais, indicando hematoma epineural e endoneural com discreta destruição tecidual (Figura 3e).

No grupo esmagado com 15,0 Kg na região média aparentemente o hematoma parecia de menor extensão, porém observamos destruição tecidual do nervo, o que provavelmente fez com que a solução injetada se perdesse. Nenhum vaso endoneural intacto foi observado (Figura 3f).

A análise morfométrica dos vasos perfundidos foi efetuada nas regiões proximal, média e distal ao local do esmagamento do nervo isquiático direito e esquerdo de todos os animais de cada grupo. O número de vasos foi comparado entre os grupos esmagado e controle contralateral, entre as cargas de esmagamento nas regiões proximal, média e distal à lesão (Tabelas 1 e 2) (Figura 4).

Quando comparamos as cargas na região média, notamos que houve diferença estatística entre elas dentro do grupo esmagado, isto é verificou-se que nesta região média (do esmagamento), houve uma diminuição significativa do número de vasos nas cargas mais elevadas, ou seja, a partir da carga de 5 kg os resultados foram estatisticamente semelhantes e inferiores às cargas 0,5 e 1,0 kg (Figura 5).

Sintetizando, no grupo esmagado, em todas as cargas, o número de vasos perfundidos mostrou-se significativamente menor na região média ($P < 0,05$). Ainda, nessa situação, o grupo con-

trole apresentou resposta mais alta ($P < 0,05$) que o esmagado (Tabela 1). Ao compararmos a somatória das 3 regiões dos grupos esmagados e controle com as diferentes cargas, notamos que somente com a carga de 15,0 Kg houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos esmagado e controle (Tabela 2). Portanto, a resposta vascular foi estatisticamente significativa quando consideramos a região onde realizamos o esmagamento, o que provavelmente explica a lesão mecânica pela força de estresse ao nervo submetido a esmagamento por diferentes cargas com menor número de vasos preenchidos na região média quando comparamos com as regiões proximal e distal do grupo esmagado.

DISCUSSÃO

Neste estudo foi utilizado um método de perfusão vascular para avaliar a lesão vascular aguda, sem a influência de fixadores que podem distorcer a anatomia e calibre dos vasos. A solução composta de tinta da China e gelatina 5% e soro fisiológico foi perfundida através da artéria aorta abdominal para assegurar todo delineamento da vascularização da região posterior dos ratos enquanto os mesmos eram mantidos sob anestesia até a eutanásia. A maioria dos trabalhos anteriores estudou a vascularização durante o processo de degeneração e regeneração da lesão do nervo isquiático^(13,14,15, 16).

Apesar da lesão de segundo grau de Sunderland (axonotmese) ser o modelo mais comumente utilizado nas pesquisas do nervo periférico, existe uma falta de padronização do método para produzir a lesão nervosa. De fato, vários instrumentos cirúrgicos^(7,19), bem como aparelhos de compressão⁽³⁾ com durações diferentes de esmagamentos são apresentadas na literatura. Tais aparelhos são dependentes, principalmente, da pressão aplicada manualmente à pinça ou para puxar os fios, e são difíceis para controlar e padronizar.

O nervo isquiático do rato foi uma escolha para nosso estudo dos vasos intraneurais devido à sua semelhança aos nervos periféricos humanos. Ele é o maior do corpo, facilmente acessível, com vários fascículos e densa irrigação sanguínea.

Nervos periféricos podem ser submetidos à lesão por esmagamento em uma variedade de circunstâncias, incluindo acidentes automobilísticos, de trabalho, fraturas, luxações. Deficiências funcionais após lesão por esmagamento não estão relacionadas apenas com o impacto do esmagamento, mas incluem componentes importantes tais como a isquemia do membro.

A falta de padronização da aplicação da força pode ser fonte de variação significativa nos resultados entre os estudos experimentais publicados. Com o interesse em estudar a vascularização após a lesão por esmagamento no nervo isquiático de rato, é essencial medir e padronizar a força de esmagamento.

Em nosso estudo, nós introduzimos um aparelho desenvolvido especialmente para produzir uma lesão por esmagamento no nervo isquiático de rato com um sistema padronizado de pesos aferidos de 0,5 a 15 Kg. Ele permite a aplicação direta da força de esmagamento ao nervo periférico, sem influência dos tecidos moles e facilita seu uso em ratos.

Usando este aparelho de esmagamento e o rato como modelo,

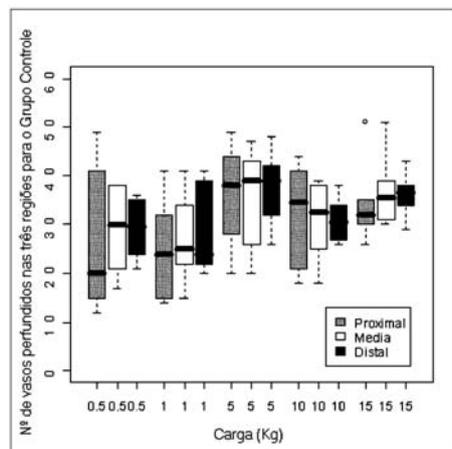


Figura 4 – Número de vasos perfundidos do grupo controle com as diferentes cargas nas regiões proximal, média e distal.

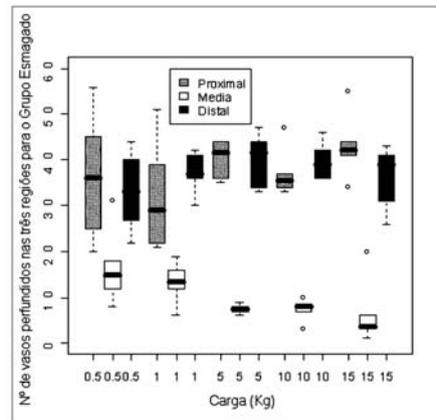


Figura 5 – Número de vasos perfundidos do grupo esmagado com as diferentes cargas nas regiões proximal, média e distal.

nós observamos a influência da força de esmagamento na vascularização do nervo isquiático do rato. O tempo de dez minutos foi escolhido para a duração do esmagamento. Considerando isto, utilizamos uma lesão nervosa por esmagamento padronizada, em termos da carga (pressão) bem como a duração do esmagamento, para evitar variações adicionais.

É conhecido que após a lesão por esmagamento, as alterações morfológicas e funcionais tornam-se piores devido à isquemia relacionada ao esmagamento. Com uma pressão mantida, a oxigenação diminuída pode aumentar a permeabilidade do endotélio dos capilares endoneurais, provocando aumento do edema e a criação da síndrome do compartimento endoneural. Além disso, a isquemia pode ser um fator adicional, interferindo na regeneração nervosa após lesão⁽¹⁷⁾. Vários autores que utilizaram modelo semelhante ao nosso, com cargas de 100g, 500g e 1500g durante 10 minutos, obtiveram resultados onde mostravam a recuperação funcional do nervo após o esmagamento e que esta estava relacionada diretamente à gravidade da lesão, ou seja, era proporcional à carga de esmagamento e que mesmo com cargas elevadas (1500g) a função motora retornou ao normal até 60 dias⁽⁸⁾.

Alguns pesquisadores demonstraram um aumento no espaço vascular bem como um aumento da permeabilidade dos capilares endoneurais após esmagamento de nervo isquiático de sapo, concluindo que a lesão altera a permeabilidade perineural e vascular endoneural e inicia o edema^(15,17) e o edema endoneural pode afetar seriamente as diversas funções das fibras nervosas, mesmo com diferenças no animal, método e duração do esmagamento e tempo de coleta⁽⁶⁾.

Nossos resultados oferecem uma análise das alterações vasculares após a lesão por esmagamento com diferentes cargas. Uma forte associação foi encontrada entre a quantidade de força (carga) e as alterações vasculares. Após a aplicação de uma força de 0,5 Kg e 1,0 Kg, mudanças detectadas foram discreto hematoma, mas com capilares endoneurais ainda preservados e preenchidos. Em contraste, forças de 5,0 Kg, 10,0 Kg e 15 Kg resultaram em alterações mais extensas com hematoma endoneural e epineural com destruição tecidual, além da não preservação de vasos endoneurais. O número de capilares endoneurais aumentou após 2, 4, 6 e 8 semanas após esmagamento, transecção e lesões isquêmicas, mas não após axotomia permanente. Estes resultados sugeriram que neovascularização endoneural pós-traumática é dependente de duas variáveis: o grau de regeneração e o grau da isquemia⁽¹⁷⁾.

Outros pesquisadores investigaram a resposta vascular por meio de análises morfométricas 1, 2, 3, 6 e 9 semanas após a lesão por esmagamento com pinça hemostática por três períodos seqüências de dez segundos. A resposta consistiu em duas fases: a primeira, até uma semana, houve um aumento no tamanho dos vasos. Na segunda fase, até seis semanas após o esmagamento, houve um aumento no número de vasos e de sua densidade. Observaram que o complexo processo de degeneração e regeneração é assistido por uma resposta vasogênica com duas fases que estão ligadas à necessidade funcional e metabólica do tecido⁽¹⁶⁾.

A análise morfométrica dos vasos do nervo isquiático em nosso estudo mostrou um comportamento diferente nas três regiões estudadas, constatando número menor de vasos somente na região do esmagamento, onde provavelmente os vasos sofreram lesão mecânica relacionada à força de estresse do esmagamento. Diversos estudos experimentais têm demonstrado que o efeito combinado lesão mecânica e isquemia é mais severo do que o efeito mecânico ou isquemia isoladamente^(3,10).

Com relação aos mecanismos que promovem as lesões por compressão vários pesquisadores sugerem que as mesmas ocorrem devido a forças mecânicas, isquemia ou ambas.

No presente estudo, associamos o efeito mecânico e o efeito isquêmico, mostrando que o efeito mecânico pode ser mais importante com cargas menores, uma vez que os vasos estavam preservados nesses grupos. O efeito isquêmico se acentua com o aumento de carga uma vez que mostramos destruição dos capilares endoneurais com cargas de 10 e 15 Kg.

Outro ponto importante que verificamos é que a partir da carga de 5 Kg, os resultados foram estatisticamente semelhantes e menores às cargas de 0,5 e 1,0 Kg e que, portanto, nos indica que não há necessidade de utilizarmos cargas acima de 5,0 Kg, pois a mesma é suficiente para lesar os vasos intraneurais, especialmente os capilares endoneurais.

Pesquisadores investigaram esta questão utilizando modelos de compressão com carga fixa (150 mmHg), aplicada por períodos que variavam entre 10 minutos e 4 horas ou por um tempo fixo de 2 horas com várias cargas (0, 20, 50, 150 e 300 mmHg). Os resultados mostraram que as alterações estruturais após a compressão aguda decorrem muito mais dos eventos celulares relacionados com forças mecânicas do que daqueles induzidos por isquemia⁽¹⁹⁾.

Isto se deve, segundo alguns autores, ao fato de que a compressão aguda é realizada em intervalo muito pequeno para produzir alterações isquêmicas no nervo. Além disso, as alterações patológicas encontradas pelo autor, foram consistentes com a lesão mecânica e diferiam de alterações produzidas em modelos experimentais de isquemia. As diferenças eram na distribuição, tempo de duração e no tipo de fibras atingidas e dessa forma, as modificações estruturais nas lesões agudas por compressão estariam relacionadas às forças de estresse da compressão do que à isquemia. Contudo, estes argumentos não descartam completamente a possibilidade do componente isquêmico contribuir

para uma acentuação na gravidade da lesão após um período de dias ou semanas⁽¹⁰⁾.

Segundo alguns pesquisadores quando os tecidos são submetidos à carga ou pressão, eles se deformam e gradientes de pressão são formados, redistribuindo o tecido comprimido em direção a áreas de baixa pressão⁽⁴⁾.

A análise microscópica dos vasos do nervo isquiático mostrou regiões de hematoma endoneural e epineural nas diferentes cargas utilizadas indicando que as forças de esmagamento utilizada em nossa pesquisa foi suficiente para lesar os vasos intraneurais, especialmente os capilares endoneurais, porém os valores críticos de pressão e duração com respeito à lesão nervosa são desconhecidos. O hematoma é o resultado do aumento da permeabilidade vascular pela lesão direta da parede dos capilares ocasionada pela força do esmagamento.

Em um estudo do micro-ambiente endoneural em lesão por esmagamento com pinça hemostática por 30 segundos (lesão aguda) ou 3 horas (lesão prolongada) contradizem o conceito de que a lesão micro-vascular seja um componente importante do esmagamento do nervo periférico e concluem que a compressão aguda do nervo não lesa *vasa nervorum*⁽¹⁹⁾. A lesão nas fibras nervosas em compressão ou esmagamento agudo (breve) parece resultar mais freqüentemente dos efeitos mecânicos⁽²⁰⁾.

No presente estudo, mostramos claramente que existe comprometimento vascular importante nas lesões por esmagamento, especialmente nos grupos com cargas elevadas. A destruição dos vasos deverá levar à isquemia e lentificação dos processos de regeneração. A formação do hematoma endoneural certamente criará um micro-ambiente desfavorável para a regeneração das fibras nervosas que também foram lesadas nesse modelo.

CONCLUSÕES

O esmagamento causa lesão direta dos vasos endoneurais, com a formação de hematoma endoneural de gravidade diretamente proporcional à carga (força) de esmagamento. A aplicação de cargas leves (0,5 e 1,0 Kg) preserva a integridade de alguns capilares endoneurais, sendo essa preservação prejudicada de igual maneira com cargas a partir de 5,0 Kg. A lesão dos vasos intraneurais e a formação de um hematoma endoneural são fatores que podem prejudicar a regeneração nervosa sendo que os mesmos interferiram com a função nervosa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Sunderland S. The anatomy and physiology of nerve injury. *Muscle & Nerve* 1990; 13:771-84.
2. Bell MA, Weddell AG. A morphometric study of intrafascicular vessels of mammalian sciatic nerve. *Muscle Nerve* 1984; 7:524-34.
3. Lundborg G, Dahlin LB. Anatomy, function and pathophysiology of peripheral nerves and nerve compression. *Hand Clin.* 1996;12:185-93.
4. Rempel D, Dahlin L, Lundborg G. Pathophysiology of nerve compression syndromes: response of peripheral nerves to loading. *J Bone Joint Surg Am.* 1999; 81:1600-10.
5. Reina MA, Lopez A, Villanueva MC, De Andres JA, Leon GL. Morphology of peripheral nerves, their sheaths, and their vascularization. *Rev Esp Anestesiol Reanim.* 2000; 47:464-75.
6. 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.
7. Bridge PM, Ball DJ, Mackinnon SE, Nakao Y, Brandt K, Hunter DA et al. Nerve crush injuries: a model for axonotmesis. *Exp Neurol.* 1994; 127:284-90.
8. 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.
9. Diao E, Andrews A, Diao J. Animal models of peripheral nerve injury. *Op Techn Orthop.* 2004; 14:153-62.
10. Schmelzer JD, Zochodne DW, Low PA. Ischemic and reperfusion injury of rat peripheral nerve. *Med Sci.* 1989; 86:1639-42.
11. Zochodne DW, Nguyen C. Increased peripheral nerve microvessels in early experimental diabetic neuropathy: quantitative studies of nerve and dorsal root ganglia. *J Neurol Sci.* 1999; 166:40-46.
12. Johnson RA, Wichern DW. Applied multivariate statistical analysis. 4th ed. New Jersey: Prentice-Hall; 1998.
13. Rydevik B, Lundborg G, Bagge U. Effects of graded compression on intraneural blood flow. An in vivo study on rabbit tibial nerve. *J Hand Surg.* 1981; 6:3.
14. Nukada H. Post-traumatic endoneurial neovascularization and nerve regeneration: a morphometric study. *Brain Res.* 1988; 449:89-96.
15. Weerasuriya A. Patterns of change in endoneurial capillary permeability and vascular space during nerve regeneration. *Brain Res.* 1990; 510:135-9.
16. Podhajsky RJ, Myers RR. The vascular response to nerve crush: relationship to Wallerian degeneration and regeneration. *Brain Res.* 1993; 623:117-23.
17. 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.
18. Dyck PJ, Lais A, Giannini C, Engelstad JK. Structural alterations of nerve during cuff compression. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 9828-32.
19. Zochodne DW, Ho LT. Endoneurial microenvironment and acute nerve crush injury in the rat sciatic nerve. *Brain Res.* 1990; 535: 43-48.
20. Ochoa J, Fowler TJ, Gilliat RW. Anatomical changes in peripheral nerves compressed by a pneumatic tourniquet. *J Anat.* 1972;113:433-55.