UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

CÉLIA APARECIDA STELLUTTI PACHIONI

Lesão por esmagamento do nervo isquiático de ratos: estudo da vascularização

> Ribeirão Preto 2006

CÉLIA APARECIDA STELLUTTI PACHIONI

Lesão por esmagamento do nervo isquiático de ratos: estudo da vascularização

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, área de concentração: Ortopedia, Traumatologia e Reabilitação da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Campus da USP – Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Nilton Mazzer

Ribeirão Preto 2006

Dedicatória

A Deus, que esteve ao meu lado em todos os momentos sendo alimento e fortaleza para o meu espírito.

Aos meus filhos e marido, por toda confiança, incentivo, participação e amor incondicional.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Nilton Mazzer, minha homenagem especial, pela orientação, pelos ensinamentos e amizade.

A Profa. Dra. Valéria Paula Sassoli Fazan, pelos ensinamentos, pela disponibilidade e carinho.

Ao Prof. Dr. Cláudio Henrique Barbieri por toda ajuda e sugestões.

Ao Laboratório de Fisiologia Cardiovascular, na pessoa do Prof. Dr. Rubéns Fazan, pela acolhida.

Aos técnicos Carlos Alberto Aguiar da Silva e Ruben Fernando de Melo do Laboratório de Fisiologia Cardiovascular pela valiosa ajuda, empenho e disponibilidade.

A técnica Vani Maria Alves Correa, do Laboratório de Histotecnologia do Departamento de Biologia Celular e Molecular e Agentes Patogênicos, pelo auxílio nos cortes dos nervos, pela disposição e alegre companhia.

Ao Prof. Dr. Carlos Roberto Padovani, pela colaboração na análise estatística.

Aos funcionários do Laboratório de Bioengenharia, Francisco Carlos Mazzocato, Luis Henrique Alves Pereira e Maria Terezinha de Morais pela atenção dispensada e em especial ao Carlos Alberto Moro pela colaboração na confecção do dispositivo.

Aos professores do Departamento de Biomecânica, Medicina e Reabilitação do Aparelho Locomotor pelos ensinamentos.

As secretárias do Departamento de Medicina Biomecânica do Aparelho Locomotor, Maria de Fátima Feitosa Lima, Elisângela Bernardes de Oliveira e Rosa Pereira Brittes Alves, pela atenção e carinho dedicados. Aos colegas da Pós-Graduação, pelo agradável período de convivência.

Ao Departamento de Fisioterapia da Faculdade de Ciências e Tecnologia da UNESP – Campus de Presidente Prudente especialmente aos docentes do Setor de Ortopedia e Traumatologia, pelo apoio enquanto estive afastada.

Aos secretários do Departamento de Fisioterapia da FCT-UNESP, Marcos e Susel pela ajuda e paciência.

Ao amigo Marcos pelo precioso trabalho de digitação e correção.

A aluna Valéria Ferreira Garcez, da Pós-Graduação em Fisiologia da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo – Campus de Ribeirão Preto, pelo auxílio nas fotomicrografias.

A Profa. Dra. Mamie Mizusaki Iyomasa, da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo – Campus de Ribeirão Preto, pela colaboração e amizade.

A Prof. Dra. Ana Maria Osório Araya Balan, docente do Departamento de Física, Química e Biologia da Faculdade de Ciências e Tecnologia da UNESP – Campus de Presidente Prudente, pela ajuda com a microscopia.

As desenhistas Flora e Maria da Faculdade de Ciências e Tecnologia da UNESP – Campus de Presidente Prudente, pelo excelente trabalho na elaboração das ilustrações.

Aos amigos e familiares que, mesmo distantes, me incentivaram e apoiaram durante esta caminhada.

Aos animais sacrificados em nome da ciência, meu reconhecimento.

A todos que de algum modo contribuíram para que este trabalho fosse realizado, obrigada.

A vida é uma peça de teatro que não permite ensaios... Por isso, cante, ria, dance, chore e viva intensamente cada momento de sua vida... antes que a cortina se feche e a peça termine sem aplausos.

Charles Chaplin

RESUMO

PACHIONI, Célia Aparecida Stellutti. Lesão por esmagamento do nervo isquiático de ratos: estudo da vascularização. 2006. 92 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.

Este trabalho teve como objetivo estudar as alterações microvasculares intraneurais agudas em nervo isquiático de rato submetido à esmagamento por diferentes cargas. Foram utilizados sessenta ratos machos da linhagem Wistar, distribuídos em dois grupos experimentais de acordo com o protocolo de injeção de vasos e subdivididos de acordo com a carga de esmagamento. Os nervos isquiáticos direitos de cada grupo experimental foram isolados e submetidos ao esmagamento com diferentes cargas (0,5 Kg, 1,0 Kg, 5,0 Kg, 10,0 kg e 15,0 kg) por 10 minutos e os nervos isquiáticos esquerdos foram utilizados como controle. Após o esmagamento, 30 animais foram submetidos ao Protocolo I, que constou de: cateterização da aorta abdominal, perfusão manual da solução composta de tinta da China e gelatina 5% em formol 10%, dissecação e retirada dos nervos direitos e esquerdos, desidratação e diafanização para análise longitudinal dos vasos intraneurais. Os outros trinta animais foram submetidos ao Protocolo II, que constou de: cateterização da aorta abdominal e perfundidos com solução composta de tinta da China e gelatina 5% em soro fisiológico e, após, mantidos em freezer -20° por uma hora. Em seguida os nervos foram dissecados e retirados em toda a sua extensão, cortados em 3 fragmentos, congelados em isopentano em gelo seco e armazenados em freezer -70°C, seccionados em cortes transversais semi-seriados em criostato para análise e contagem dos vasos intraneurais. Os resultados mostraram regiões de hematoma endoneural e epineural nas diferentes cargas utilizadas indicando que as forças de esmagamento foram suficientes para lesar os vasos intraneurais do nervo isquiático, especialmente com cargas elevadas. A análise morfométrica mostrou um comportamento diferente nas três regiões estudadas, constatando menor número de vasos na região do esmagamento e não nas regiões acima e abaixo da mesma. Estes resultados sugerem lesão localizada dos vasos intraneurais que foi proporcional à carga de esmagamento, causando hematoma endoneural e epineural, o que criará um microambiente desfavorável para a regeneração das fibras nervosas que também foram lesadas nesse modelo.

Palavras-chave: vascularização, esmagamento, nervo isquiático, rato.

ABSTRACT

PACHIONI, Célia Aparecida Stellutti. **Crush injury of the rat sciatic nerve**: vascularization study. 2006. 92 f. Thesis (Doctoral) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.

The objective of this work was to study the acute intraneurial microvascular changes in the rat sciatic nerve submitted to a crush injury by different loads. Sixty Wistar male rats were used and distributed into two experimental groups according to vessel injection protocol and subdivided according to the crush load. The right sciatic nerves of each experimental group were isolated and submitted to crush by different loads (0,5 Kg, 1,0 Kg, 5,0 Kg, 10,0 kg and 15,0 kg) for ten minutes. The left sciatic nerves were used as controls. After the crush, thirty animals were submitted to Protocol I, which consisted of: abdominal aorta catheterization, manual perfusion withf a solution composed of China ink and gelatin 5% in formaldehyde 10%. After that the right and left nerves were collected, fixed in formaldehyde10%, dehydrated and diaphanized for longitudinal analysis of the intraneurial vessels. The other thirty animals were submitted to Protocol II, which consisted of: abdominal aorta catheterization, as described above and perfused with a solution of China ink and gelatin 5% in physiologic saline and then placed in a freezer at -20°C for one hour. After that the nerves were dissected and removed in their entire length, cut into three fragments, frozen in isopentane and dry ice and placed in a freezer at -70 °C, cut in semi-serial histological transverse sections for analysis and intraneurial vessel quantification. The results showed endoneurial and epineurial haematoma areas in the different groups, indicating that the crush forces were enough to damage the intraneurial vessels, specially with high loads. The morphometrical analysis showed a different profile in the three fragments, with smaller number of vessels in the crush region then above and below, suggesting that the damage to intraneurial vessels was proportional to the crush load, causing endoneurial and epineurial haematoma, which creates an unfavorable microenvironment for the regeneration of the nerve fibers that were also damaged in that model.

Key-words: sciatic nerve, crush injury, vascularization, rat.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Abordagem do nervo isquiático na coxa direita, após divulsão	
	da fáscia entre o bíceps femural e o grupo dos glúteos. Aumento 100x	38
Figura 2 -	Ilustração esquemática do dispostivo utilizado para produzir o	00
r igula 2	esmagamento do nervo isquiático direito do rato O	
	esmagamento ocorre em toda a largura do nervo incidindo em	
	5 mm de comprimento	40
Figura 3 -	Diagrama ilustrativo da relação entre as artérias majores para o	10
r igura o	nervo isquiático na pata posterior do rato localização do	
	esmagamento e seccões dos fragmentos coletados	45
Figura 4 -	Fotomicrografias do nervo isquiático de rato imediatamente	10
rigura +	anós o esmagamento com diferentes pesos. Aumento 16x	51
Figura 5 -	Fotografias de pervo isquiático de rato controle (a) mostrando	01
r igura o	sua rede vascular longitudinal e esmagado com 0.5 Kg (b)	
	evidenciando hematoma na região média (seta). Aumento 40x	52
Figura 6 -	Fotografias do nervo isquiático controle (a) e esmagado com	52
r igura o	1.0 Kg (b) mostrando desorganização da rede vascular	
	intraneural com formação de hematoma na região média (seta)	
	Aumento 40x	52
Figura 7 -	Fotografias do nervo isquiático controle (a) e esmagado com	02
i iguru /	5.0 Kg (b) mostrando hematoma acompanhado de dilatação	
	capilar distal à lesão (seta). Aumento 40x	53
Figura 8 -	Fotografias do nervo isquiático controle (a) e esmagado com	
ga. a c	10.0 Kg (b), mostrando aumento do hematoma acompanhado	
	de dilatação capilar distal à lesão (seta). Aumento 40x	53
Figura 9 -	Fotografias do nervo isquiático controle (a) e esmagado com	
5	15,0 Kg (b), mostrando hematoma acompanhado de dilatação	
	capilar distal à lesão (seta). Aumento 40x	54
Figura 10 -	Fotomicrografias de secção transversal na região média do	
	nervo isquiático de rato controle (a) e esmagado com 0,5 Kg	
	(b). Notar a presença dos vasos intraneurais (a) e discreto	
	hematoma intraneural (b) (seta). Aumento 100x	56

Figura 11 -Fotomicrografias de secção transversal na região média do nervo isquiático de rato controle (a) e esmagado com 1,0 Kg (b). Notar a presença dos vasos intraneurais (capilares) bem preenchidos (a) e a presença de hematoma endoneural (b) 57 (setas). Aumento 100x Figura 12 -Fotomicrografias de secção transversal na região média do nervo isquiático de rato controle (a) e esmagado com 5,0 Kg (b). Notar a presença dos vasos intraneurais (capilares) bem preenchidos (a) e a presença de hematoma endoneural e epineural (b) (setas). Aumento 100x 58 Figura 13 -Fotomicrografias de secção transversal na região média do nervo isquiático de rato controle (a) e esmagado com 10,0 Kg (b). Notar a presença dos vasos intraneurais (capilares) bem preenchidos (a) e a presença de hematoma endoneural e epineural (b) (setas). Aumento 100x 59 Figura 14 -Fotomicrografias de secção transversal na região média do nervo isquiático de rato controle (a) e esmagado com 15,0 Kg (b). Notar a presença dos vasos intraneurais (capilares) bem preenchidos (a) e a presença de hematoma endoneural e epineural (seta) e destruição tecidual (b) (asteriscos). Aumento 60 100x Figura 15 -Fotomicrografias de secção transversal nas regiões proximal (a) e distal (b) do nervo isquiático de rato do grupo esmagado com 1,0 Kg. Notar os vasos endoneurais e epineurais mais dilatados na região distal (b) (setas). Aumento 100x 61 Figura 16 -Fotomicrografias de secção transversal nas regiões proximal (a) e distal (b) do nervo isquiático de rato do grupo esmagado com 15,0 Kg. Notar os vasos endoneurais e epineurais mais dilatados na região distal (b) (setas). Aumento 100x 62 Fotomicrografias de secção transversal nas regiões proximal Figura 17 -(a) e distal (b) do nervo isquiático controle contralateral do animal esmagado com 1,0 Kg. Notar a presença dos vasos 63 endoneurais e epineurais bem preenchidos. Aumento 100x

- Figura 18 Fotomicrografias de secção transversal nas regiões proximal
 (a) e distal (b) do nervo isquiático controle contralateral do animal esmagado com 15,0 Kg. Notar a presença dos vasos endoneurais e epineurais bem preenchidos. Aumento 100x 64
- Figura 19 Número de vasos perfundidos do grupo esmagado e controle com as diferentes cargas nas regiões proximal, média e distal .. 69
- Figura 20 Número de vasos perfundidos do grupo esmagado e controle com as diferentes cargas nas regiões proximal, média e distal .. 70
- Figura 21 Somatória do número médio de vasos perfundidos do grupo esmagado e controle com as diferentes cargas nas três regiões 71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Grupos experimentais, divididos por carga de esmagamento e	
Tabela 2 -	número de animais para cada protocolo	42
	Mediana e semi-amplitude total do número de vasos perfundidos	
	segundo Grupo (Esmagado e Controle), Carga (Kg) e Região	
Tabela 3 -	(Proximal, Média e Distal)	65
	Mediana e semi-amplitude total do número médio de vasos	
	perfundidos segundo Grupo (Esmagado e Controle) e Carga (Kg)	67

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16	
1.1 Estrutura do nervo periférico	17	
1.2 Sistema microvascular intraneural	19	
1.3 Lesão nervosa periférica	23	
1.4 Lesão nervosa por esmagamento	27	
2 OBJETIVO	35	
3 MATERIAL E MÉTODOS	37	
3.1 Animais de experimentação	37	
3.2 Anestesia e procedimento cirúrgico	37	
3.3 Dispositivo utilizado para produzir o esmagamento	39	
3.4 Grupos experimentais	41	
3.5 Protocolo de injeção de vasos	42	
3.5.1 Protocolo I	42	
3.5.2 Protocolo II	43	
3.6 Técnicas de avaliação	46	
3.6.1 Avaliação longitudinal (macroscópica) dos vasos intraneurais dos nervos		
isquiáticos	46	
3.6.2 Avaliação transversal (microscópica) dos vasos intraneurais dos nervos		
isquiáticos	46	
3.6.2.1 Descrição do processo de digitalização de imagens	47	
3.7 Análise estatística	48	
3.7.1 Análise intra-grupo	48	
3.7.2 Análise entre grupos	48	
4 RESULTADOS	50	
1.1 Aspectos gerais		
4.2 Análise longitudinal (macroscópica) dos vasos intraneurais dos nervos		
isquiáticos	51	

4.3	Análise transversal (microscópica) dos vasos intraneurais dos nervos			
	isquiáticos	54		
4.4	Análise morfométrica dos vasos intraneurais dos nervos isquiáticos	65		
5 DI	5 DISCUSSÃO			
6 C	6 CONCLUSÕES			
REF	FERÊNCIAS	85		

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Os nervos periféricos lesados se regeneram, e para o estudo desta regeneração foram empregados diversos modelos experimentais para investigar os fenômenos que envolvem a fisiopatologia da lesão nervosa e sua regeneração.

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.

Os estudos dos fenômenos envolvidos na degeneração e regeneração de uma lesão nervosa periférico foram realizados considerando alguns aspectos tais como: os métodos de reparação (TERENGHI, 1995; IDE, 1996; DANIELSSON; DAHLIN; POVLSEN, 1996; SONDELL; LUNDBORG; KANJE, 1999; AKASSOGLOU *et al.*, 2003; BONTIOTI; KANJE; DAHLIN, 2003; GEORGE; BUEHL; SOMMER, 2004; THORNTON *et al.*, 2005), a avaliação funcional (LEE *et al.* 2000; VAREJÃO *et al.*, 2003; GEORGE *et al.*, 2003), porém o estudo da vascularização na lesão nervosa tem recebido pouca atenção (HOBSON *et al.*, 1997; HOBSON; GREEN; TERENGHI, 2000).

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 da severidade da lesão. Assim, quando um nervo é submetido a uma pressão externa, a lesão pode ser provocada tanto pela pressão como pela isquemia. Uma isquemia acontece quando a pressão do esmagamento exceder a pressão de perfusão capilar (MELLICK; CAVANAGH, 1968; SCHMELZER; ZOCHODNE; LOW, 1989; LUNDBORG; DAHLIN, 1989; GUDEMEZ *et al.*, 2002; XU; ZOCHODNE, 2002).

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 (SJOBERG; KANJE, 1990; CHEN *et al.*, 1992; TANAKA; ZHANG; WEBSTER, 1992; BRIGDE *et al.*, 1994; ALGORA *et al.*, 1996; WIDERBERG; LUNDBORG; DAHLIN, 2001; OLIVEIRA *et al.*, 2001; 2004), porém continua pouco conhecida a resposta vascular numa lesão nervosa periférica aguda por esmagamento.

1.1 Estrutura do nervo periférico

Os nervos periféricos são constituídos de feixes de fibras ou axônios com suas bainhas de mielina as quais lhes conferem a cor esbranquiçada. Os axônios que irão constituir os nervos periféricos originam-se de corpos celulares de neurônios localizados na substância cinzenta do tronco cerebral; no corno anterior da medula espinal, ou daqueles neurônios situados perifericamente nos gânglios sensitivos, dos nervos espinais ou em gânglios do sistema nervoso autônomo.

Nos vertebrados, os nervos periféricos são envolvidos por uma camada externa de tecido conjuntivo denso, o epineuro, que reveste o nervo e que envia prolongamentos de tecido fibroso moderadamente denso para os espaços entre os feixes de fibras nervosas, o perineuro. Cada um destes feixes é revestido por uma bainha de células achatadas e justapostas, derivadas do epineuro, que atua como barreira às substâncias difusíveis (macromoléculas).

Dentro desta bainha perineural encontram-se localizados os axônios, envolvidos por uma bainha de mielina, as células de Schwann, mastócitos, fibroblastos, fibras colágenas, reticulares e células endoteliais da rede capilar endoneural, que, no conjunto, constituem o endoneuro. Estas estruturas são responsáveis pela continuidade e integridade das fibras nervosas e também pela condução de capilares até a intimidade dos axônios para a nutrição dos mesmos (FAWCETT; KEYNES, 1990; IDE, 1996).

As fibras nervosas podem ser do tipo mielínicas ou amielínicas. Nas fibras mielinizadas, a bainha de mielina aparece como uma série de segmentos cilíndricos dispostos em múltiplas camadas em espiral ao redor do axônio, derivadas das células de Schwann.

Portanto, nos axônios mielínicos, encontra-se externamente a ele, em seqüência de dentro para fora: a bainha de mielina, o citoplasma, o núcleo das células de Schwann e as fibras colágenas e reticulares de revestimento que no conjunto constituem o endoneuro (LUNDBORG, 2003).

O termo membrana endoneuro é empregado para denominar a membrana basal da célula de Schwann fora da bainha de mielina, como as fibras de colágeno, e as fibras reticulares responsáveis pela manutenção da arquitetura da fibra nervosa. A membrana endoneural encontra-se preservada durante a degeneração Walleriana, porém ela pode ao longo do tempo colapsar ou ser preenchida por colágeno se a regeneração não acontecer durante um curto período de tempo (SEDDON, 1975; TERENGHI, 1995).

Millesi e Terzis (1984) enfatizaram as diferenças do emprego dos termos endoneural e endoneuro. O termo endoneural deve ser empregado para se referir ao local, já o termo endoneuro deve ser utilizado para se referir a ele propriamente dito. O perineuro é a denominação da membrana de um fascículo individual. A sua camada interna é formada por células, tipo epiteliais, e a camada externa é formada por tecido conectivo e colágeno.

Estes autores reforçaram a diferença da denominação perineural (localizado ao redor do nervo) e da denominação perineuro (pertencendo ao perineuro). O termo, fascículo e funículo podem ser utilizados sinonimamente, eles são constituídos por grupos de fibras nervosas cercadas pelo perineuro. O epineuro refere-se ao tecido conectivo colagenoso do nervo periférico que circunda os fascículos circunferencialmente e entre eles.

1.2 Sistema microvascular intraneural

O suprimento nutricional ao tronco nervoso é proporcionado por um sistema microvascular muito bem desenvolvido, mostrando plexo vascular em todas as camadas do nervo. Ao longo do seu curso, o tronco nervoso recebe um suprimento vascular segmentar. Os vasos segmentares geralmente chegam ao nervo de maneira enovelada e relaxada que não restringe a excursão do tronco nervoso. Quando os vasos regionais chegam ao tronco nervoso, eles se dividem em ramos descendentes e ascendentes correndo longitudinalmente em camadas superficiais e profundas do epineuro. Esses vasos também formam numerosos colaterais aos vasos na bainha perineural. No interior dos fascículos, existe um padrão longitudinal de vasos endoneurais, principalmente capilares. Quando os vasos atravessam a parte mais interna do perineuro para o endoneuro, eles freqüentemente mostram um curso oblíquo, constituindo um mecanismo de válvula, fazendo-os vulneráveis à pressão (LUNDBORG; DAHLIN, 1996).

Quando um tronco nervoso é submetido ao trauma, irritação mecânica ou compressão, o edema pode se formar rapidamente no epineuro, mas, por causa da barreira de difusão na bainha perineural, o edema não penetra dentro dos fascículos. A camada perineural atua como um tecido de proteção importante para as fibras nervosas dentro dos fascículos (OLSSON; REESE, 1971; OCHOA; FOWLER; GILLIATT, 1972).

Em contraste, os vasos endoneurais não permitem extravasamento de proteínas, constituindo a barreira sangue-nervo análoga à barreira sangue-cérebro. O micro-ambiente endoneural, portanto, normalmente está preservado pela combinação das barreiras de difusão no endotélio dos capilares endoneurais e camada perineural. Se o edema pode ser induzido no espaço endoneural do tronco nervoso, o resultado é um aumento na pressão do fluido endoneural e uma interferência rápida com a microcirculação endoneural (LUNDBORG; MYERS; POWELL, 1983).

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. 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 grande epineuro, vasos orientados longitudinalmente exibem um padrão característico, ou seja, os vasos estão presentes em todas as camadas do epineuro, que é, superficialmente, bem como, entre os feixes fasciculares nas camadas profundas do nervo (LUNDBORG; DAHLIN, 1996: REMPEL; DAHLIN; LUNDBORG, 1999; DAHLIN, 2004).

Os vasos sanguíneos penetram o nervo em intervalos regulares. Esses vasos podem ter até 1,0 mm de diâmetro, raramente excedendo 2,5 cm de comprimento. O nervo possui uma densa rede de vasos entre e dentro dos funículos, isto permite que um grande segmento de nervo seja liberado de suas conexões sem prejuízo aparente da irrigação. A isquemia de um nervo leva a colagenização e a fibrose dos funículos, ocasionando retardo ou obstáculo intransponível para regeneração (BACSICH; WYBURN, 1945; NICHOLSON; SEDDON, 1957).

Segundo Bell e Weddell (1984a) os aspectos incomuns dos vasos endoneurais sugeriram uma comparação morfométrica detalhada com a microvascularização do músculo esquelético.

Bell e Weddell (1984b) descreveram os vasos sanguíneos do nervo isquiático no rato como vasos maiores e mais espaçados do que os do músculo esquelético. Canais vasculares correm por grandes distâncias ao longo do nervo no epineuro e endoneuro. Observaram que são comuns as anastomoses entre as arteríolas e vênulas. Os vasos menores eram maiores do que os capilares comuns, e acreditavam que o leito vascular do nervo era uma rede anastomótica contínua.

Lundborg (1975) descreveu um padrão complexo de fluxo vascular através desta rede: direções de fluxo diferentes são encontradas simultaneamente em diferentes pontos ao longo de um dado vaso como resultado de uma ligação anastomótica, e a direção do fluxo pode reverter em resposta ao trauma ou estimulação simpática.

Esta circulação adaptável é altamente competente mesmo em situações adversas. Ela é mais importante para o balanço iônico e ambiente osmótico do compartimento endoneural para a função das fibras nervosas do que para a nutrição metabólica das mesmas. Ela pode agir como um reservatório local com o volume relativamente constante do sangue movimentando-se através de condutos grandes e pode ser rapidamente restaurada.

Resultados quantitativos demonstraram que enquanto o nervo tem um volume vascular tão grande quanto o músculo adjacente, existe um número de grandes capilares e conseqüentemente uma área de superfície total menor para a troca, portanto, as demandas metabólicas no sangue podem ser menores no nervo. O volume de sangue do nervo e tecido muscular pode ser comparável e é igual, entretanto a distribuição do volume do sangue nos dois tecidos é muito diferente (BELL; WEDDELL, 1984b).

Segundo Reina *et al.* (2000) a importância da vascularização dos nervos periféricos se deve ao fato de os axônios serem vulneráveis à isquemia pela grande distância que existe entre o corpo neuronal e a extensão do axônio.

Para assegurar uma adequada irrigação, os nervos periféricos possuem dois sistemas independentes que se anastomosam entre si. O sistema extrínseco que é formado por artérias, arteríolas, vênulas e se encontram no epineuro; e o sistema intrínseco, formado pelo conjunto de capilares longitudinais, que se encontram dentro dos fascículos e em relação ao endoneuro. As anastomoses entre ambos sistemas vasculares estão formadas por vasos que se encontram no epineuro e perineuro, e graças a eles os nervos podem resistir aos estados de isquemia.

Os vasos endoneurais possuem características próprias que lhes conferem uma particularidade funcional, diante de situações de isquemia e de hipovolemia. Os capilares endoneurais são maiores que em outros tecidos, embora, a distância entre os capilares seja maior, comparada com o cérebro ou o músculo. O grande tamanho dos capilares contrasta com a escassa auto-regulação desses vasos, que têm uma escassa contratilidade, porque os nervos são sensíveis às trocas de volume e à pressão de perfusão. A isto se soma a grande distância intercapilar, que pode tornar ineficiente a perfusão endoneural, já que devemos lembrar que o fluxo sanguíneo do nervo é dependente da distância capilar, o qual torna estes tecidos mais vulneráveis ao edema endoneural.

1.3 Lesão nervosa periférica

Os nervos periféricos são alvos constantes de lesões de origem traumática como esmagamento, compressão, estiramento, avulsão e secção parcial e total, que resultam na parada da transmissão de impulsos nervosos e, por conseguinte, na perda ou diminuição da sensibilidade e motricidade no território inervado (OGARD; STOCKERT, 1994; AZZE; MATTAR JUNIOR, 2000).

Inúmeras alterações nervosas e musculares ocorrem em conseqüência da lesão de um nervo periférico. Embora os nervos periféricos se regenerem, quando restauradas as funções nervosas perdidas, sabe-se que a recuperação funcional raramente é completa e perfeita, às vezes, apesar da aplicação de técnicas sofisticadas de reconstrução (MENDONÇA; BARBIERI; MAZZER, 2003).

Existem vários fatores que influenciam na regeneração da fibra nervosa lesada, como a natureza e o nível da lesão, período de desnervação, tipo e diâmetro da fibra nervosa. Fibras de diâmetro e funções diferentes (motoras, sensitivas e simpáticas) se regeneram com velocidades diferentes, o mesmo ocorre com as fibras de diferentes troncos nervosos. Outros fatores, como a idade do paciente, a intercorrência de agentes químicos, temperatura e variações individuais também interferem na velocidade de regeneração de um nervo periférico (SUNDERLAND, 1978, 1985, 1990; ZOCHODNE, 2000; RASO, 2002).

Quando um nervo periférico é intensamente lesado, a porção do nervo distal à lesão sofre mudanças degenerativas. Augusto Waller, já em 1850, demonstrou que um processo degenerativo progressivo se instala no coto distal no nervo lesado, incluindo a degradação da substância axonal e a atrofia dos envoltórios da fibra nervosa. No coto proximal também ocorre uma degeneração da substancia axonal, que é fagocitada por macrófagos e pelas células de Schwann, e esse processo envolve uma extensão variável da fibra nervosa, sendo proporcional à gravidade da lesão e ao diâmetro da fibra. Esse processo é também conhecido como Degeneração Walleriana, dele resulta um tubo neural vazio, preparado para receber o novo axoplasma produzido pelo corpo celular do neurônio, já é o início do processo de regeneração (SPENCE, 1991; TATAGIBA *et al.*, 2003).

Uma regeneração axonal acontece pelo transporte intra-axonal do material sintetizado no corpo celular, que é impulsionado ao longo do axônio através de movimentos amebóides, que iniciam na raiz do coto proximal do axônio lesado. Para que uma regeneração nervosa se efetive, alem da síntese e transporte do

material axoplasmático, deve haver a confluência de outros fatores positivos, tais como alterações físico-químicas e ultra-estruturais no meio adjacente, proliferação de células de Schwann e fibroblastos, e a regeneração da bainha de mielina (MENDONÇA; BARBIERI; MAZZER, 2003; POLA *et al.*, 2004).

As lesões dos nervos periféricos foram classificadas em graus, baseados na intensidade do comprometimento das estruturas do nervo e na intensidade das manifestações clínicas.

A classificação de Seddon (1943) descreve três tipos de lesão nervosa periférica: neuropraxia, axoniotmese e neurotmese.

A neuropraxia representa o grau mais leve de lesão neural e é caracterizada pela redução ou bloqueio completo da condução através do segmento do nervo. A continuidade axonal é mantida e a condução do nervo é preservada proximal e distalmente ao segmento lesado. A sensibilidade e as funções simpáticas podem ser poupadas parcialmente.

A axoniotmese representa um grau mais severo de lesão nervosa e é caracterizada por interrupção dos axônios com preservação do tecido conectivo circunjacente o qual suporta a regeneração axonal. A degeneração distal Walleriana dos axônios podem ocorrer em um período de muitos dias, após o que a estimulação elétrica do coto distal desconectado não oferecerá resposta de aumento de condução ou resposta muscular.

A recuperação poderá ocorrer através da regeneração axonal, devido à preservação do tecido conectivo que serve de guia, constituído de células de Schwann e sua lâmina basal, e componentes celulares e moleculares da matriz extracelular. As células de Schwann proliferam e formam tubos ou condutos longitudinais (bandas de Bungner) através dos quais os axônios se regeneram.

Todas as funções neurológicas estão afetadas, e a eletroneurografia vai mostrar alterações de desnervação.

A neurotmese é o grau mais grave de lesão do nervo periférico. A desconexão do axônio, a mielina e o tecido conectivo compõem as características histológicas deste tipo de lesão, por este motivo a regeneração não pode ocorrer.. Na evolução da cicatrização, apesar da continuidade externa poder ocorrer, a fibrose intraneural que aparece vai bloquear a regeneração axonal. A estrutura do nervo está totalmente desoganida e interrompida.

Posteriormente, Sunderland (1951), propôs uma classificação mais detalhada e baseada em anatomia e funcionalidade pós-trauma dividindo-as em 5 graus: nos graus I e II que correspondem a neuropraxia de Seddon, nos graus III e IV correspondem a subdivisões de axoniotmese. No grau III, o endoneuro está lesado com continuidade do perineuro. No grau IV, há desconexão adicional do perineuro e no grau V há a correspondência com a neurotmese, ou seja, desconexão total de todas as camadas inclusive do epineuro.

O valor prognóstico dessas classificações reside no fato de que quanto maior o grau de lesão pior é a probabilidade de uma regeneração total, além do que variáveis como formação de fibrose e lesão vascular poderiam afetar a evolução de uma reconstrução cirúrgica tecnicamente adequada (AGUIAR; TEDESCO-MARCHESE; SPARAPANI, 2003).

1.4 Lesão nervosa por esmagamento

Os fenômenos envolvidos na regeneração podem ser estudados através de vários modelos experimentais, mas o modelo da lesão por esmagamento tem a vantagem de não envolver as variáveis introduzidas na lesão por secção seguida de sutura. Porém o que se percebe é uma dificuldade na comparação dessas pesquisas devido a grande variedade de formas de esmagamento com pinças de joalheiro, máquina de ensaio e aparelhos desenvolvidos com variações no tempo de esmagamento.

O modelo de lesão por esmagamento tem sido adotado por vários autores, que enfatizam o fato de o esmagamento preservar pelo menos em parte a estrutura do nervo, facilitando a regeneração, e de não haver necessidade de realizar a sutura, que implica no treinamento prévio com as técnicas micro-cirúrgicas e na disponibilidade de instrumental e material adequados, em geral de alto custo (GRAGG; THOMAS, 1964; De MEDINACELLI; FREED; WYATT, 1982; BAIN; MACKINNON; HUNTER, 1989; BRIDGE *et al.*, 1994; MENDONÇA; BARBIERI; MAZZER, 2003).

Mira (1979) realizou estudos quantitativos da variação do número e diâmetro das fibras nervosas durante o processo de regeneração, após lesão por esmagamento do nervo isquiático, em ratos, analisando os resultados entre 10 a 720 dias após a lesão nervosa. Demonstrou que o número de fibras nervosas mielinizadas em regeneração retornou ao normal já na quarta semana, o que ocorreu somente no segundo mês no caso da secção seguida de sutura imediata.

Rydevik e Lundborg (1977) e Rydevik, Lundborg e Bagge (1981) utilizaram compressão local de 50 a 600 mmHg por períodos de tempo variando de quinze minutos a seis horas em nervo tibial de coelho. Os resultados demonstraram que um trauma discreto ao nervo (50 mmHg) por duas horas induziu edema epineural pelo aumento da permeabilidade dos vasos epineurais que foram mais suscetíveis do que os vasos endoneurais e que compressões maiores e ou de duração mais prolongada causaram lesão também aos vasos endoneurais, levando à formação de edema intrafascicular que é mais proeminente nas bordas do segmento do nervo comprimido, já ilustrado por Bentley e Schlapp (1943).

Lundborg, Myers e Powell (1983) utilizaram compressão externa de 30mmHg ou 80mmHg em um segmento do nervo isquiático de rato por duas a oito horas. Com 30mmHg houve um retardo do fluxo sanguíneo venular no epineuro e quando a pressão foi maior (80 mmHg) reduziu também nos capilares endoneurais, chegando a uma completa estase de todo fluxo sanguíneo intraneural no segmento do nervo comprimido (isquemia). Estes dados foram confirmados por Ogata e Naito (1986).

Nukada (1988) demonstrou que o número de capilares endoneurais aumentou após duas, quatro, seis e oito semanas após esmagamento, transecção e lesões isquêmicas, mas não axotomia permanente. Estes resultados sugerem que neovascularização endoneural distal pós-traumática é dependente de duas variáveis, o grau de regeneração e a severidade da isquemia. O crescimento axonal parece ser a grande determinante da formação de novos capilares endoneurais póstrauma, enquanto a isquemia nervosa causa neovascularização e regeneração nervosa prejudicadas. Weerasuriya (1988) em um modelo de lesão por transecção no nervo isquiático de sapo investigou o período e as alterações na permeabilidade capilar endoneural durante a degeneração Walleriana. Os resultados deste estudo sugeriram que a destruição dos axônios e/ou sinais químicos das células de Schwann induzem um aumento na permeabilidade de seus capilares.

Em investigação posterior Weerasuriya (1990) utilizou um modelo de lesão por esmagamento do nervo isquiático de sapo para verificar as alterações na permeabilidade capilar endoneural durante a regeneração em um período de três dias a doze semanas após o esmagamento. Os resultados demonstraram que a permeabilidade dos capilares endoneurais aumentou em dois picos separados, sendo o primeiro até três semanas e o segundo até nove semanas após a lesão.

Schmelzer, Zochodne e Low (1989) em um modelo de isquemia severa do nervo por meio de uma oclusão das artérias por uma ou três horas, estudaram a isquemia e reperfusão na condução nervosa, fluxo sangüíneo e integridade da barreira sangue-nervo. Seus dados indicaram que isquemia do nervo periférico resulta em lesão por reperfusão, bloqueio de condução e ruptura da barreira sanguenervo.

Zochodne e Ho (1990) em estudo seguinte utilizaram um modelo pinça de joalheiro por trinta segundos e por três horas em nervo isquiático de rato para provocar lesão por esmagamento.

Seus resultados não proporcionaram evidencia que "no reflow" ocorre em lesão por esmagamento mesmo quando mantida com isquemia severa por período de tempo (três horas) conhecido para induzir "no reflow". Eles sugerem que a lesão nervosa no esmagamento e possivelmente na compressão aumenta pela lesão mecânica direta das fibras. Provavelmente estivessem ocorrendo diferentes mecanismos de lesão.

Dick *et al* (1990) utilizaram compressão do nervo fibular de rato com pressão fixa de 150 mmHg aplicada por períodos de tempo que variaram de dez minutos a quatro horas ou por um tempo fixo de duas horas com pressões variando de 0 a 300 mmHg. Seus resultados mostraram que as alterações estruturais durante a compressão aguda estavam mais relacionadas às forças de estresse do esmagamento que a isquemia, e confirmam os dados de Ochoa, Fowler e Gilliatt (1972).

Dahlin e Rydevik (1991) e Dahlin e Thambert (1993) demonstraram lesões estruturais e funcionais nas compressões de nervos periféricos, enfatizando que os vasos intraneurais (*vasa nervorum*) foram ocluídos à aplicação de pressões elevadas, causando isquemia focal. Além disso, ocorreram alterações estruturais das fibras nervosas, com desorganização dos envoltórios neurais, inclusive a bainha de Schwann, levando à deterioração da função nervosa. Demonstraram, ainda, que há interrupção do transporte axonal bidirecional em pressões iguais ou maiores que 200 mmHg, aplicadas por 8 horas.

Chen *et al.* (1992) utilizaram um aparelho especialmente designado para esmagamento de 5-mm de segmento do nervo isquiático de rato com cargas de 100g (13 mm Hg), 500g (50 mm Hg) e 15000g (1000 mmHg) por 10 minutos. Seus resultados confirmam a hipótese que o edema endoneural pode afetar seriamente as diversas funções das fibras nervosas. Após aplicação de forças de esmagamento leves, as alterações foram edema discreto e paralisia do membro afetado, que persistiu por poucos dias, porém com cargas de esmagamento altas houve lesão local extensa com edema e hemorragia e paralisia funcional por período mais prolongado ao redor de sessenta dias.

Nukada, Powell e Myers (1993) estudaram a distribuição espacial da lesão nervosa após oclusão de um grande vaso individual em nervo isquiático de rato. Seus dados sugeriram que níveis leves de isquemia causam edema endoneural, enquanto níveis moderados de isquemia produziram desmielinização e a isquemia severa produziu degeneração Walleriana.

Podhajsky e Myers (1993) empregaram um modelo de lesão por esmagamento no nervo isquiático do rato com pinça número cinco por três períodos seqüenciais de 10 segundos para investigar a resposta vascular por meio de análises morfométricas 1, 2, 3, 6 e 9 semanas após a lesão. 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.

Bridge *et al.* (1994) utilizaram pinças hemostáticas de relojoeiro para produzir lesões por esmagamento no nervo isquiático de ratos, com diferentes tempos de aplicação de pressão. Concluíram que a lesão produzida era do tipo axonotmese, sem diferenças estatisticamente significativas entre os grupos, e que o método era confiável e reprodutível. Entretanto, a pressão aplicada não era medida.

Kakinoki *et al.* (1995) investigaram o efeito da vascularidade no conduto nervoso na regeneração do nervo periférico. Demonstraram que os vasos que foram pré-inseridos no conduto nervoso aceleraram a regeneração por meio da rápida formação capilar no tubo.

Zochodne e Nguyen (1997) estudaram a angiogenese de microvasos no nervo isquiático de rato lesado por transecção. O estudo foi realizado pela análise do padrão dos microvasos perfundidos com tinta da Índia e por imagens quantitativas. Os resultados indicaram evidencia da angiogenese após sete dias, indicado por um aumento no número total e no diâmetro dos vasos perfundidos. Após quatorze dias, novos vasos foram proeminentes no epineuro ou entre as camadas do perineuro.

Hobson, Green e Terenghi (2000) estudaram a relação morfológica entre a regeneração nervosa e os vasos sanguíneos após axotomia por meio de um estudo histoquímico. Seus resultados sugerem que tubulização neural bem vascularizada, orientada longitudinalmente pode melhorar a regeneração nervosa.

Oliveira *et al.* (2001) estudaram a regeneração do nervo isquiático após lesões por esmagamento com cargas controladas de 100 g, 500 g, 15.000 g, numa máquina de ensaio. Avaliaram os resultados por meio da análise das impressões da marcha (Índice Funcional do Isquiático) e da morfometria dos nervos e demonstram que a recuperação funcional e morfológica foi proporcional à gravidade da lesão. Concluíram também que houve correlação entre ambos os tipos de avaliação, afirmando que apenas a avaliação funcional, que não requer o sacrifício do animal, fornece informações suficientes sobre a regeneração do nervo lesado.

Gudemez *et al.* (2002) em um modelo de esmagamento do nervo isquiático do rato, testaram a eficácia de um hormônio esteróide adrenocortical androgênio (DHEA) na prevenção da lesão por reperfusão e aumento da recuperação nervosa após lesão por esmagamento. Concluíram que embora reduzida a lesão por reperfusão, novos estudos são necessários para confirmar o efeito no tecido neural. Diao, Andrews e Diao (2004) realizaram uma revisão para discutir o uso de modelos animais de lesão nervosa periférica. Estes modelos são úteis para obter informações a respeito de lesões nervosas clínicas em três áreas: compressão nervosa, esmagamento nervoso e laceração do nervo. Com relação à lesão por compressão aguda, os autores concluem que esta pode causar prejuízo permanente da microcirculação intraneural devido à lesão mecânica dos vasos associada com a lesão do nervo, no entanto o papel dos diferentes fatores biomecânicos não está bem estabelecido, assim como não estão totalmente compreendidas as alterações estruturais, celulares e moleculares. Estas informações ajudariam identificar o ponto no qual o processo da lesão nervosa se torna irreversível.

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.

2 OBJETIVO

2 OBJETIVO

Estudar as alterações microvasculares intraneurais agudas, em nervo isquiático de rato, provocadas pelo esmagamento com diferentes cargas, através da análise do padrão dos microvasos perfundidos com tinta da China, comparando o número de capilares endoneurais com seu respectivo controle.

3 MATERIAL E MÉTODOS
3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais de experimentação

Foram utilizados para o experimento ratos machos, adultos, da linhagem Wistar, num total de 60, com peso corporal variando entre 250-350 gramas, obtidos no Biotério Central da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. 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 aclimatação, 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, em 1 de dezembro de 2003.

3.2 Anestesia e procedimento cirúrgico

Todos os procedimentos descritos foram realizados no Laboratório de Fisiologia Cardiovascular da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. 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 cerca de 5 mm distalmente à emergência do nervo a partir do forame isquiático maior para identificar o local de realização do esmagamento e para facilitar a visualização do nervo após a injeção dos vasos (Figura 1). 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 (Figura 2).



Figura 1 – Abordagem do nervo isquiático na coxa direita, após divulsão da fáscia entre o bíceps femural e o grupo dos glúteos. Aumento 16x.

3.3 Dispositivo utilizado para produzir o esmagamento

O dispositivo utilizado no estudo foi desenvolvido no Laboratório de Bioengenharia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Este dispositivo foi desenvolvido 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 dispositivo foi adaptado a partir de uma prensa manual utilizada em armarinhos e consta de uma plataforma para o apoio do animal (A), com uma estrutura principal (B) que recebe um eixo telescopável (C) com suporte de apoio para os pesos aferidos (0,5 Kg, 1,0 Kg, 5,0 Kg, 10,0 Kg e 15,0 Kg), uma base de apoio para o nervo (D), eixo de aplicação de pressão (E), uma alavanca que serve para acionar os pesos (F) e uma mola para manter a alavanca em equilíbrio, não alterando a carga (G). A aplicação da força consiste no acionamento da alavanca (F), que possui uma trava para suportar o peso durante o posicionamento do nervo na base de apoio. Após o posicionamento, a trava é liberada permitindo desta forma, a aplicação da força no nervo (D).

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 passado no epineuro, com os diferentes pesos, durante dez minutos (Figura 2). Este tempo foi escolhido porque clinicamente, nervos podem ser submetidos à força de esmagamento desta duração em várias circunstâncias, incluindo acidentes automobilísticos e de construções (CHEN *et al.*, 1991, 1992; OLIVEIRA *et al.*, 2001).



- Figura 2 Ilustração esquemática do dispositivo 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.
 - A- plataforma
 - B- estrutura principal
 - C- eixo telescopável com suporte para os pesos
 - D- base de apoio para o nervo
 - E- eixo de aplicação de pressão
 - F- alavanca
 - G- mola

3.4 Grupos experimentais

Os sessenta animais foram divididos em dois grupos experimentais de acordo com os procedimentos realizados e posteriormente subdivididos (Tabela 1), conforme descrito a seguir.

Grupo I: 12 animais foram submetidos a dissecção e isolamento do nervo isquiático direito e a uma compressão com carga de 0,5 Kg durante 10 minutos e em seguida subdivididos em dois grupos, conforme o protocolo de injeção dos vasos.

Grupo II: 12 animais foram submetidos a dissecção e isolamento do nervo isquiático direito e a uma compressão com carga de 1,0 Kg durante 10 minutos e em seguida subdivididos em dois grupos, conforme o protocolo de injeção dos vasos.

Grupo III: 12 animais foram submetidos a dissecção e isolamento do nervo isquiático direito e a uma compressão com carga de 5,0 Kg durante 10 minutos e em seguida subdivididos em dois grupos, conforme o protocolo de injeção dos vasos.

Grupo IV: 12 animais foram submetidos a dissecção e isolamento do nervo isquiático direito e a uma compressão com carga de 10,0 Kg durante 10 minutos e em seguida subdivididos em dois grupos, conforme o protocolo de injeção dos vasos.

Grupo V: 12 animais foram submetidos a dissecção e isolamento do nervo isquiático direito e a uma compressão com carga de 15,0 Kg durante 10

minutos e em seguida subdivididos em dois grupos, conforme o protocolo de injeção de vasos.

Os nervos isquiáticos esquerdos de cada animal dos diferentes grupos experimentais foram utilizados como grupo controle.

Tabela 1 – Grupos experimentais, divididos por carga de esmagamento e número de animais para cada protocolo

Grupos	Carga (Kg)	Número de Animais		
		Protocolo I	Protocolo II	
Grupo I	0,5 Kg	6	6	
Grupo II	1,0 Kg	6	6	
Grupo III	5,0 Kg	6	6	
Grupo IV	10,0 Kg	6	6	
Grupo V	15,0 Kg	6	6	
	TOTAL	30	30	

3.5 Protocolo de injeção de vasos

3.5.1 Protocolo I

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 37º C em banho-maria baseado em Colli, Forjaz e Ferreira (1982).

Imediatamente após o término da perfusão, os nervos isquiáticos direitos (esmagados) e esquerdos (controles) foram dissecados e retirados em toda sua extensão 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 e posterior análise sob lupa estereoscópica, e para serem fotografados.

3.5.2 Protocolo II

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 37º C em banho-maria.

Após o término da perfusão, os animais foram mantidos em freezer -20º 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) (Figura 3), 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 mμ) em criótomo, para posterior análise e contagem dos capilares endoneurais (ZOCHODNE; NGUYEN, 1997, 1999).

As diferentes soluções utilizadas para a injeção de vasos se devem ao tipo de análise das técnicas de avaliação (análise longitudinal e transversal) dos vasos intraneurais dos nervos isquiáticos.



Figura 3 – Diagrama ilustrativo da relação entre as artérias maiores para o nervo isquiático na pata posterior do rato, localização do esmagamento e secção dos fragmentos coletados.

3.6.1 Avaliação longitudinal (macroscópica) dos vasos intraneurais dos nervos isquiáticos

Os trinta nervos direitos esmagados e os respectivos nervos esquerdos, submetidos ao Protocolo I controles foram mantidos em solução de salicilato de metila e benzoato de benzila para análise da rede vascular longitudinalmente, sob lupa esteróscopica 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 microcomputador.

3.6.2 Avaliação transversal (microscópica) dos vasos intraneurais dos nervos isquiáticos

Os outros trinta nervos direitos esmagados e seus respectivos controles, submetidos ao Protocolo II foram separados em três fragmentos nas regiões: proximal (acima do local do esmagamento), média (local do esmagamento) e distal (abaixo do local do esmagamento). Os três fragmentos foram seccionados transversalmente em criostato Micron em cortes semi-seriados de 20 mµ, estirados

em laminas gelatinizadas, lavados rapidamente em água destilada, seguidos de xilol e montados com Enthelan e lamínula. Após foi feita a escolha de três cortes íntegros de cada fragmento para a contagem do número de vasos perfundidos e análise do padrão vascular.

3.6.2.1 Descrição do processo de digitalização de imagens

O processo de digitalização de imagens foi realizado com o auxílio de um equipamento constituído por um microcomputador e um microscópio de luz Axiovert / Carl Zeiss acoplado com recursos fotográficos.

Após a escolha das três secções transversais, foram digitalizadas imagens de cada região proximal, média e distal ao local do esmagamento dos nervos isquiáticos direitos (esmagados) e esquerdos (controles) por meio do Software KS 300 e armazenadas para análise e contagem dos capilares endoneurais.

A contagem dos vasos foi feita nas três imagens selecionadas de cada região para a obtenção do número médio de vasos preenchidos no lado esmagado e no controle nos diferentes grupos experimentais, em cada segmento estudado.

O Software KS Lite foi utilizado para a contagem dos vasos perfundidos. Os dados referentes à contagem foram submetidos à análise estatística.

3.7 Análise estatística

3.7.1 Análise intra-grupo

O estudo do número de vasos perfundidos nas regiões proximal, média e distal à lesão segundo grupos e diferentes cargas foi realizada por meio de uma da análise de variância (ANOVA) não paramétrica para o modelo de medidas repetidas em dois fatores (JOHNSON; WICHERN, 1998).

3.7.2 Análise entre grupos

Em relação ao número médio de vasos perfundidos segundo grupo e carga utilizou-se da análise da variância (ANOVA) não paramétrica para o modelo com dois fatores (NORMAN; STREINER, 1994).

Diferenças foram consideradas significativas quando P<0,05.

4 RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 Aspectos gerais

Imediatamente após o esmagamento foi observado, em todos os nervos isquiáticos, dos diferentes grupos, que a área esmagada dos mesmos ficou muito fina, de coloração pálida, mas a continuidade do nervo não foi interrompida (Figura 4).

Observamos diferenças anatômicas no trajeto do nervo isquiático de alguns animais com relação ao início da trifurcação do nervo, e após a perfusão verificou-se que em alguns animais os nervos ficavam mais escuros que em outros. Não houve nenhuma intercorrência durante os procedimentos de esmagamento e de injeção dos nervos.



Figura 4 – Fotomicrografias do nervo isquiático de rato imediatamente após o esmagamento com diferentes pesos. Aumento 16x.

4.2 Análise longitudinal (macroscópica) dos vasos intraneurais dos nervos isquiáticos

Foram analisados os nervos isquiáticos esmagados e controles perfundidos com tinta da China, mantidos em solução de salicilato de metila e benzoato de benzila.

A observação macroscópica da rede vascular dos nervos isquiáticos controles sob lupa por transiluminação 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 (Figuras 5a, 6a, 7a, 8a e 9a).

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 5b, 6b, 7b, 8b e 9b).



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



Figura 6 – Fotografias do nervo isquiático controle (a) e esmagado com 1,0 Kg (b), mostrando desorganização da rede vascular intraneural com formação de hematoma na região média (seta). Aumento 40x.



Figura 7 – Fotografias do nervo isquiático controle (a) e esmagado com 5,0 Kg (b), mostrando hematoma acompanhado de dilatação capilar distal à lesão (seta). Aumento 40x.



Figura 8 – Fotografias do nervo isquiático controle (a) e esmagado com 10,0 Kg (b), mostrando aumento do hematoma acompanhado de dilatação capilar distal à lesão (seta). Aumento 40x.



Figura 9 – Fotografias do nervo isquiático controle (a) e esmagado com 15,0 Kg (b), mostrando hematoma acompanhado de dilatação capilar distal à lesão (seta). Aumento 40x.

4.3 Análise transversal (microscópica) dos vasos intraneurais dos nervos isquiáticos

A análise microscópica dos vasos dos nervos isquiáticos esmagados (Figuras 10b, 11b, 12b, 13b e 14b) e dos seus respectivos controles (Figuras 10a, 11a, 12a, 13a e 14a) foi efetuada nas regiões acima (proximal) e abaixo (distal) ao local do esmagamento e no local do esmagamento (média).

O exame das secções transversais do nervo isquiático, visto ao microscópio de luz, mostrou que o nervo possui de 2 a 4 fascículos nos três segmentos estudados e é constituído de tecido conjuntivo perineural e endoneural com muitos vasos intraneurais (capilares endoneurais). Esses se mostraram de diâmetros variados conforme mostra as Figuras 10a e 10b.

No grupo controle, as secções transversais semi-seriadas do nervo isquiático esquerdo de todos os animais nas diferentes cargas mostraram um padrão vascular normal na região proximal (Figuras 17a e 18a), na região média (Figuras 10a, 11a, 12a, 13a e 14a) e região distal (Figuras 17b e 18b).

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 10b).

No grupo esmagado com 1,0 Kg, na região média 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 11b).

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 12b).

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 13b).

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 14b).

Nas regiões proximal e distal dos diferentes grupos esmagados, o padrão vascular dos nervos isquiáticos encontrava-se aparentemente normal

(Figuras 15a, 15b, 16a e 16b). Para exemplificar escolhemos imagens nos grupos com cargas de esmagamento de 1,0 Kg e 15,0 Kg e seus respectivos controles (Figuras 17a, 17b, 18a e 18b).

Nos animais esmagados com 0,5 Kg e 1,0 Kg observamos dilatação dos vasos epineurais na região distal, que desaparece nos animais com esmagamento de 5,0 Kg, 10,0 Kg e 15,0 Kg. Além disso, nos animais esmagados com 10,0 Kg e 15,0 Kg, vasos endoneurais aparentemente mais dilatados estavam presentes na região distal ao esmagamento (Figuras 15b e 16b).



Figura 10 – Fotomicrografias de secção transversal na região média do nervo isquiático de rato controle (a) e esmagado com 0,5 Kg (b). Notar a presença dos vasos intraneurais (a) e discreto hematoma intraneural (b) (seta). Aumento 100x.



Figura 11 – Fotomicrografias de secção transversal na região média do nervo isquiático de rato controle (a) e esmagado com 1,0 Kg (b). Notar a presença dos vasos intraneurais (capilares) bem preenchidos (a) e a presença de hematoma endoneural (b) (setas). Aumento 100x.



Figura 12 – Fotomicrografias de secção transversal na região média do nervo isquiático de rato controle (a) e esmagado com 5,0 Kg (b). Notar a presença dos vasos intraneurais (capilares) bem preenchidos (a) e a presença de hematoma endoneural e epineural (b) (setas). Aumento 100x.



Figura 13 – Fotomicrografias de secção transversal na região média do nervo isquiático de rato controle (a) e esmagado com 10,0 Kg (b). Notar a presença dos vasos intraneurais (capilares) bem preenchidos (a) e a presença de extenso hematoma endoneural e epineural (b) (setas). Aumento 100x.



Figura 14 – Fotomicrografias de secção transversal na região média do nervo isquiático de rato controle (a) e esmagado com 15,0 Kg (b). Notar a presença dos vasos intraneurais (capilares) bem preenchidos (a) e a presença de hematoma endoneural, epineural (seta) e destruição tecidual (asteriscos). Aumento 100x.



Figura 15 – Fotomicrografias de secção transversal nas regiões proximal (a) e distal (b) do nervo isquiático de rato do grupo esmagado com 1,0 Kg. Notar os vasos endoneurais e epineurais mais dilatados na região distal (b) (setas). Aumento 100x.



Figura 16 – Fotomicrografias de secção transversal nas regiões proximal (a) e distal (b) do nervo isquiático de rato do grupo esmagado com 15,0 Kg. Notar os vasos endoneurais e epineurais mais dilatados na região distal (b) (setas). Aumento 100x.



Figura 17 – Fotomicrografias de secção transversal nas regiões proximal (a) e distal (b) do nervo isquiático controle do animal esmagado com 1,0 Kg. Notar a presença dos vasos endoneurais e epineurais bem preenchidos. Aumento 100x.



Figura 18 – Fotomicrografias de secção transversal nas regiões proximal (a) e distal (b) do nervo isquiático controle do animal esmagado com 15,0 Kg. Notar a presença dos vasos endoneurais e epineurais bem preenchidos. Aumento 100x.

4.4 Análise morfométrica dos vasos intraneurais dos nervos isquiáticos

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, entre as cargas de esmagamento nas regiões proximal, média e distal à lesão (Tabelas 2 e 3).

Tabela 2 –	Mediana	e semi-	amplitude to	tal	do número	de vas	sos pe	erfu	undidos
	segundo	Grupo	(Esmagado	е	Controle),	Carga	(Kg)	е	Região
	(Proximal	, Média	e Distal)						

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

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

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

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

No grupo controle, o número total de vasos preenchidos em todos os grupos, na região proximal variou de $20,0\pm18,6$ a $38,0\pm14,5$, na região média variou de $25,0\pm13,0$ a $39,0\pm13,5$ e na região distal variou de $24,0\pm10,5$ a $39,0\pm11,0$ (Tabela 2 e Figuras 19 e 20).

No grupo esmagado, o número de vasos preenchidos em todos os grupos, na região proximal variou de $29,0\pm15,0$ a $42,0\pm10,5$, na região média variou de $3,5\pm9,5$ a $15,0\pm11,5$ e na região distal variou $33,0\pm11,0$ a $39,0\pm8,5$ (Tabela 2 e Figuras 19 e 20).

Ao compararmos o número de vasos dos nervos isquiáticos direitos esmagados (grupo esmagado) com as diferentes cargas nas três regiões em relação aos controles, observamos que nas regiões proximal e distal à lesão não houve diferença estatística significante, porém na região média (local do esmagamento) notamos diferença estatística significante com todas as cargas de esmagamento no grupo esmagado.

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 5,0 Kg os resultados foram estatisticamente semelhantes e inferiores às cargas 0,5 Kg e 1,0 Kg.

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 controle apresentou resposta mais alta (P<0,05) que o esmagado (Tabelas 2 e 3).

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

Tabela 3 – Mediana e semi-amplitude total do número médio de vasos perfundidos segundo Grupo (Esmagado e Controle) e Carga (Kg)

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

Ao realizarmos a somatória dos vasos perfundidos do nervo isquiático das três regiões, ou seja, o número médio de vasos perfundidos do nervo isquiático de rato das diferentes cargas no grupo controle variou de $25,5\pm9,0$ a $34,5\pm6,0$ e no grupo esmagado variou de $27,0\pm4,5$ a $30,0\pm9,5$ (Tabela 3 e Figuras 21 e 22).

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 significante entre os grupos esmagado e controle (Tabela 3).

E quando comparamos as cargas entre si, dentro do grupo esmagado, considerando novamente a somatória do número total de vasos perfundidos nas três regiões, observamos que podemos variar a carga que a resposta não se altera (Tabela 3).

Portanto, a resposta vascular foi estatisticamente significante 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.

A técnica utilizada para poder explicar as medianas em forma de gráficos foi a de boxplots. A principal característica dos boxplots é a de possibilitar verificação e a distribuição dos dados. A linha dentro dos boxplots é a mediana observada para tal variável.



Figura 19 – Número de vasos perfundidos do grupo esmagado e controle com as diferentes cargas nas regiões proximal, média e distal.



Figura 20 – Número de vasos perfundidos nas regiões proximal, média e distal do grupo esmagado e controle com as diferentes cargas.



Figura 21 – Somatória do número médio de vasos perfundidos do grupo esmagado e controle com as diferentes cargas nas três regiões.



Figura 22 – Número de vasos perfundidos segundo as diferentes regiões e cargas, nos grupos esmagado (E) e controle (C).
5 DISCUSSÃO

5 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 (RYDEVIK; LUNDBORG; BAGGE, 1981; OGATA; NAITO, 1986; NUKADA, 1988; WEERASURIYA, 1988, 1990; PODHAJSKY; MYERS, 1993; HOBSON *et al.*, 1997).

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 (BRIDGE *et al.*, 1994; ZOCHODNE; HO, 1990), bem como aparelhos de compressão (RYDEVICK; LUNDBORG, 1977; WIDERBERG; LUNDBORG; DAHLIN, 2001) 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 de compressão, 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 sangüínea.

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 significante 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.

Neste estudo foi introduzido um dispositivo desenvolvido especialmente para produzir uma lesão por esmagamento no nervo isquiático de rato com um sistema padronizado de pesos aferidos de 0,5 a 15,0 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 dispositivo de esmagamento e o rato como modelo foi observada a influência da força de esmagamento na vascularização do nervo isquiático. 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.

Para eliminar a preocupação de que o calibre do vaso poderia ser influenciado por fixadores, como utilizado em estudos anteriores, foram estudados

tecidos não fixados coletados após terem sido perfundidos e imediatamente ao sacrifício do animal.

A combinação da tinta da China, gelatina e soro fisiológico permitiu investigação dos vasos epineurais e endoneurais, não possível com outras técnicas de perfusão onde o extravasamento dos vasos epineurais obscurecia a avaliação precisa para qualquer vaso.

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 (LUNDBORG; MYERS; POWELL, 1983; PODHAJSKY; MYERS, 1993).

Chen *et al.* (1992) confirmaram a hipótese que 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 colheita.

Apesar das diferenças em animal, métodos de esmagamento, duração do esmagamento e tempo de colheita, nossos resultados se assemelham aos de Dahlin e Rydevik (1991). Eles investigaram alterações de curto tempo até 2 horas após uma compressão com manguito com pressão de 20-600 mm Hg por 15 minutos ou 2 horas de duração em modelo de coelho; e avaliaram a subseqüente micro-circulação, permeabilidade vascular, transporte axonal, velocidade de condução nervosa e estrutura da fibra nervosa. Seus resultados demonstraram que a permeabilidade dos vasos intraneurais aumenta com subseqüente formação de edema intrafascicular e mudanças no fluxo sangüíneo nervoso mesmo com pressões baixas de 20 a 30 mmHg e que tanto, a quantidade bem como a duração da pressão são importantes fatores na indução da deteriorização motora.

Os 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 15,0 Kg resultaram em alterações mais extensas com hematoma endoneural e epineural com destruição tecidual, além da não preservação de vasos endoneurais.

Weerasuiya (1988, 1990) 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.

Podhajsky e Myers (1993) 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.

Esses resultados são consistentes com nosso estudo, onde também observamos um aumento, ou seja, uma dilatação dos vasos no local do

esmagamento bem como na região distal devido ao efeito mecânico direto associado com a estase no fluxo e a pressão microvascular alterada, como prováveis fatores da dilatação observada na primeira fase do trabalho de Podhajsky e Myers (1993).

Diversos estudos experimentais (SCHMELZER; ZOCHODNE; LOW, 1989; LUNDBORG; DAHLIN, 1996; GUDEMEZ *et al.*, 2002) tem demonstrado que o efeito combinado lesão mecânica e isquemia é mais severo do que o efeito mecânico ou isquemia isoladamente.

Com relação aos mecanismos que promovem as lesões por compressão, vários pesquisadores sugerem que as mesmas ocorrem devido à 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 10,0 Kg e 15,0 Kg.

Outro ponto importante que verificamos é que a partir da carga de 5,0 Kg, os resultados com relação ao número menor de vasos na região média foram estatisticamente semelhantes e inferiores às cargas de 0,5 Kg e 1,0 Kg e, portanto, 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.

Dick *et al.* (1990) 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 varias 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.

Segundo Schemelzer, Zochodne e Low (1989), isto se deve 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, de acordo com Dick *et al* (1990), 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.

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, diferentemente das regiões proximal e distal à lesão, onde os vasos foram preservados.

Segundo Rempel, Dahlin e Lundborg (1999) 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.

Rydevik e Lundborg (1977) demonstraram que lesões microvasculares podem ser observadas nas zonas marginais após pressões de 200 mmHg aplicada diretamente ao nervo e que essas alterações na permeabilidade dos vasos intraneurais pode representar indicação de lesão nervosa.

Olsson e Reese (1971) demonstraram que o edema endoneural induzido pelo esmagamento dos nervos é distribuído dentro dos fascículos, principalmente na direção distal.

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.

De acordo com Nukada (1988) o número de capilares endoneurais aumentou após 2, 4, 6 e 8 semanas pós-esmagamento, transecção e lesões isquêmicas, mas não após axotomia permanente. Estes resultados sugeriram que neovascularização endoneural distal pós-traumática é dependente de duas variáveis: o grau de regeneração e a severidade da isquemia.

Zochodne e Ho (1990) em seu 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*, porém a pressão aplicada pela pinça não foi medida. A lesão nas fibras nervosas em compressão ou esmagamento agudo (breve) parece resultar mais freqüentemente dos efeitos mecânicos ilustrados por Ochoa, Fowler e Gilliatt (1972). Existem razões para não acreditarmos que os nervos esmagados sejam apenas expressos pelas lesões mecânicas com mudanças estruturais dos axônios e bainha de mielina. Pelo contrário, os distúrbios locais no nervo podem ser baseados nas disfunções microvasculares e edema endoneural com aumento da pressão do fluido endoneural.

Oliveira *et al.* (2001) que utilizaram modelo semelhante ao nosso, com cargas de 100g, 500g e 15000g 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 e que mesmo com cargas elevadas (15000g) a função motora retornou ao normal até 60 dias.

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.

6 CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

 Neste modelo experimental a utilização de um dispositivo aplicando carga de esmagamento variada e duração padronizada em 10 minutos revelou forte associação entre a força aplicada e as alterações vasculares.

 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 Kg e 1,0 Kg) preserva a integridade
de alguns capilares endoneurais e vasos epineurais, sendo essa preservação
prejudicada de igual maneira com as 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 possível que os mesmos interfiram com a função nervosa.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS^{*}

AGUIAR, P. H. P.; TEDESCO-MARCHESE, A. J.; SPARAPANI, F. Classificação das lesões traumáticas do sistema nervoso periférico. In: TATAGIBA, M.; MAZZER, N.; AGUIAR, P. H. P.; PEREIRA, C. U. **Nervos periféricos**: diagnóstico e tratamento clínico e cirúrgico. Rio de Janeiro: Revinter, 2003.

AKASSOGLOU, K.; AKPINAR, P.; MURRAY, S.; STRICKLAND, S. Fibrin is a regulator of Schwann cell migration after sciatic nerve injury in mice. **Neuroscience** Letters, v. 338, p. 185-188, 2003.

ALGORA, J.; CHEN, L; SEABER, A. V.; WONG, G. H. W.; URBANIAK, J. R. Functional effects of lymphotoxin on crushed peripheral nerve. **Microsurgery**, v. 17, p. 131-135, 1996.

AZZE, J. R.; MATTAR, J. R. Lesões dos nervos periféricos. In: PARDINI JUNIOR, A. G. **Traumatismos da mão**. 3. ed. Rio de Janeiro: Medsi, 2000.

BACSICH, P.; WYBURN, G. M. The effect of interference with the blood supply on the regeneration of peripheral nerves. **Journal of Anatomy**, v. 79, p. 74, 1945.

BAIN, J. R.; MACKINNON, S. E.; HUNTER, R. T. Functional evalution of complete sciatic peroneal, and posterior tibial nerve lesions in the rat. **Plastic and Recconstructive Surgery**, v. 83, p. 129-138, 1989.

BELL, M. A; WEDDELL, A. G. M. A descriptive study of the blood vessels of the sciatic nerve in the rat, man and other mammals. **Brain**, v. 107, p. 871-898, 1984a.

BELL, M. A.; WEDDELL, A. G. M. A morphometric study of intrafascicular vessels of mammalian sciatic nerve. **Muscle & Nerve**, v. 7, p. 524-534, 1984b.

BENTLEY, F.H.; SCHLAPP, W. The effects of pressure on conduction in peripheral nerve. **Journal of Physiology**, v. 102. p. 72, 1943.

^{*} De Acordo com: Universidade de São Paulo. Sistema Integrado de Bibliotecas. Grupo DiTeses. Diretrizes para apresentação de dissertações e teses da USP: documento eletrônico e impresso. São Paulo: SIBi-USP, 2004.

BONTIOTI, E. N.; KANJE, M.; DALHIN, L. B. Regeneration and functional recovery in the upper extremity of rats after various types of nerve injuries, **Journal of the Peripheral Nervous System**, v. 8, p. 159-168, 2003.

BRIDGE, P. M.; BALL, D. J.; MACKINNON, S. E.; NAKAO, Y.; BRANDT, K.; HUNTER, D. A; HERTL, C. Nerve crush injuries: a model for axonotmesis. **Experimental Neurology**, v. 127, p. 284-290, 1994.

CHEN, L.; SEABER, A. V.; GLISSON, R. R.; DAVIES, H.; MURRELL, G. A. C.; ANTHONY, D. C.; URBANIAK, J. R. The functional recovery of peripheral nerves following defined acute crush injuries. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 10, p. 657-664, 1992.

CHEN, L.; SEABER, A. V.; GLISSON, R. R.; MIKAT, E. M.; URBANIAK, J. R. Morphologic and morphometric analyses of rat femoral arteries after crush injury. **Microsurgery**, v. 12, p. 402-411, 1991.

COLLI, B. O.; FORJAZ, S. V.; FERREIRA, A. L. Lesões da parede da artéria carótida da cobaia após clampagem temporária com destaque para a rede de Vasa Vasorum. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 40, p. 307-326, 1982.

DAHLIN, L. B. The biology of nerve injury and repair. Journal of the American Society for Surgery of the Hand, v. 4, p. 143-155, 2004.

DAHLIN, L. B.; RYDEVIK, B. Pathophysiology of nerve compression. In: GELBERMAN, R. H. **Operate nerve repair and reconstruction**. Philadelphia: J. B. Linppicoot Company, v. 2, p. 847-863, 1991.

DAHLIN, L. B.; THAMBERT, C. Acute nerve compression at low pressures has a conditioning lesion effect on rat sciatic nerves. **Acta Orthopaedica Scandinavica**, v. 64, p. 479-481, 1993.

DANIELSSON, P.; DAHLIN, L.; POVLSEN, B. Tubulization increases axonal outgrowth of rat sciatic nerve after crush injury. **Experimental Neurology**, v. 139, p. 238-243, 1996.

De MEDINACELI, L.; FREED, W. J.; WYATT, R. J. An index of the functional condution of rat sciatic nerve base don measurements made from walking tracks. **Experimental Neurology**, v. 77, p. 634-643, 1982.

DIAO, E.; ANDREWS, A.; DIAO, J. Animal models of peripheral nerve injury. **Operative Techniques in Orthopaedics,** v. 14, p. 153-162, 2004.

DYCK, P. J.; LAIS, A.; GIANNINI, C.; ENGELSTAD, J. K. Structural alterations of nerve during cuff compression. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 87, p. 9828-9832, 1990.

FAWCETT, J. W.; KEYNES, R. J. Peripheral nerve regeneration. **Annual Reviews Neuroscience**, v. 13, p. 43-60, 1990.

GEORGE, A.; BUEHL, A.; SOMMER, C. Wallerian degeneration after crush injury of rat sciatic nerve increases endo- and epineurial tumor necrosis factor-alpha protein. **Neuroscience Letters**, v. 372, p. 215-219, 2004.

GEORGE, L. T.; MYCKATYN, T. M.; JENSEN, J. N.; HUNTER, D. A.; MACKINNON, S. E. Functional recovery and histomorphometric assessment following tibial nerve injury in mouse. **Journal of Reconstructive Microsurgery**, v. 19, p. 41-47, 2003.

GRAGG. B. G.; THOMAS, P. K. The condution velocity of regenerated peripheral nerve fibres. **Journal of Physiology**, v. 171, p. 164-175, 1964.

GUDEMEZ, E.; OZER, K.; CUNNINGHAM, B.; SIEMIONOW, K.; BROWNE, E.; SIEMIONOW, M. Dehydroepiandrosterone as an enhancer of functional recovery following crush injury to rat sciatic nerve. **Microsurgery**, v. 22, p. 234-241, 2002.

HOBSON, M. I.; BROWN, R.; GREEN, C. J.; TERENGHI, G. Inter-relationships between angiogenesis and nerve regeneration: a histochemical study. **British** Journal of Plastic Surgery, v. 50, p. 125-131, 1997.

HOBSON, M. I.; GREEN, C. J.; TERENGHI, G. VEGF enhances intraneural angiogenesis and improves nerve regeneration after axotomy. **Journal of Anatomy**, v. 197, p. 591-605, 2000.

IDE, C. Peripheral nerve regeneration. **Neuroscience Research**, v. 25, p. 101-121, 1996.

JOHNSON, R. A.; WICHERN, D. W. **Applied multivariate statistical analysis**. 4. ed. New Jersey: Prentice-Hall, 1998. 642p.

KAKINOKI, R.; NISHIJIMA, N.; UEBA, Y.; OKA, M.; YAMAMURO, T. Relationship between axonal regeneration and vascularity in tubulation- an experimental study in rats. **Neuroscience Research**, v. 23, p. 35-45, 1995.

LEE, M.; DOOLABH, V. L.; MACKINNON, S. E.; JOST, S. J. FK506 promotes functional recovery in crushed rat sciatic nerve. **Muscle & Nerve**, v. 23, p. 633-640, 2000.

LUNDBORG, G. Structure and function of the intraneural microvessels as related to trauma, edema formation, and nerve function. **The Journal of Bone and Joint Surgery**, v. 57-A, n. 7, p. 938-948, 1975.

LUNDBORG, G. Nerve injury and repair- a challenge to the plastic brain. **Journal of the Peripheral Nervous System**, v. 8, p. 209-226, 2003.

LUNDBORG, G; DAHLIN, L. B. Pathophysiology of nerve compression. In: SZABO, R. M. **Nerve compression syndromes**. USA: Slack Incorporated, 1989.

LUNDBORG, G.; DAHLIN, L. B. Anatomy, function, and pathophysiology of peripheral nerves and nerve compression. **Hand Clinics**, v. 12, n. 2, p.185-193, 1996.

LUNDBORG, G.; MYERS, R.; POWELL, H. Nerve compression injury and increased endoneurial fluid pressure: a "miniature compartment syndrome". **Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry**, v. 46, p. 1119-1124, 1983.

MELLICK, R. S.; CAVANAGH, J. B. Changes in blood vessel permeability during degeneration and regeneration in peripheral nerves. **Brain**, v. xci, p. 141-160, 1968.

MENDONÇA, A. C.; BARBIERI, C. H.; MAZZER, N. Directly applied low intensity direct eletric current enhances peripheral nerve regeneration in rats. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 129, p. 183-190, 2003.

MILLESI, H.; TERZIS, J. K. Nomenclature in peripheral nerve surgery. **Plastic Surgery**, v. 11, n. 1, p. 3-8, 1984.

MIRA, J. C. Quantitative studies of the regeneration of rat myelinated nerve fibres: variations in the number and size of regenerating fibres after repeated localized frezing. **Journal of Anatomy**, v. 129, n. 1, p. 77-93, 1979.

NICHOLSON, O. R.; SEDDON, H. J. Nerve practive. Results of treatment of median and ulnar nerve lesion. **British Medicine Journal**, v. 11, p. 1065-1071, 1957.

NORMAN, G. R.; STREINER, D. L. **Biostatistics**: the bare essentials. Saint Louis: Mosby Yearbook, 1994. 260p.

NUKADA, H. Post-traumatic endoneurial neovascularization and nerve regeneration: a morphometric study. **Brain Research**, v. 449, p. 89-96, 1988.

NUKADA, H.; POWELL, H. C.; MYERS, R. R. Spacial distribuition of nerve injury after occlusion of individual major vessels in rat sciatic nerves. **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology**, v. 52, p. 452-459, 1993.

OCHOA, J.; FOWLER, T. J.; GILLIATT, R. W. Anatomical changes in peripheral nerves compressed by a pneumatic tourniquet. **Journal of Anatomy**, v. 113, p. 433-455, 1972.

OGARD, W. K; STOCKERT, B. W. Neuropatias Periféricas. In: UMPHRED, D. A. **Fisioterapia neurológica**. 2. ed. São Paulo: Manole, 1994. Cap. 12, p. 331-344.

OGATA, K.; NAITO, M. Blood flow of peripheral nerve; effects of dissection, stretching and compression. **Journal Hand Surgery**, v. 11B, p. 10, 1986.

OLIVEIRA, E. F.; MAZZER, N.; BARBIERI, C. H.; SELLI, M. Correlation between funcional index and morphometry to eveluate recovery of the rat sciatic nerve following crush injury: experimental study. **Journal of Reconstructive Microsurgery**, v. 17, n. 1, p. 69-75, 2001.

OLIVEIRA, E. F.; MAZZER, N.; BARBIERI, C. H.; DEL BEL, E. A. The use of a muscle graft to repair a segmentary nerve defect. An experimental study using the sciatic nerve of rats as model. **Experimental Neurology**, v. 133, p. 19-26, 2004.

OLSSON, Y.; REESE, T. S. Permeability of vasa nervorum and perineurium in mouse sciatic nerve studied by fluorescence and electron microscopy. **Journal Neuropathology Experimental Neurology**, v. 30, p. 105-119, 1971.

PODHAJSKY, R. J.; MYERS, R. R. The vascular response to nerve crush: relationship to Wallerian degeneration and regeneration. **Brain Research**, v. 623, p. 117-123, 1993.

POLA, R.; APRAHAMIAN, T. R.; BOSCH-MARCÉ, M.; CURRY, C.; GAETANI, E.; FLEX, A.; SMITH, R. C.; ISNER, J. M.; LOSORDO, D. W. Age-dependent VEGF expression and intraneural neovascularization during regeneration of peripheral nerves. **Neurobiology of Aging**, v. 25, p. 1361-1368, 2004.

RASO, V. V. M. Os efeitos do ultra-som terapêutico no tratamento das lesões por esmagamento do nervo ciático de ratos. 2002. 57 f. Dissertação (Mestrado em Interunidades Bioengenharia) – Escola de Engenharia de São Carlos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2002.

REINA, M. A.; LOPEZ, A.; VILLANUEVA, M. C.; de ANDRES, J. A.; LEON, G. L. Morphology of peripheral nerves, their sheaths, and their vascularization. **Rev. Esp. Anestesiol. Reanim.**, v. 47, n. 10, p. 464-475, 2000.

REMPEL, D.; DAHLIN, L.; LUNDBORG, G. Pathophysiology of nerve compression syndromes: response of peripheral nerves to loading. **The Journal of Bone and Joint Surgery**, v. 81-A, p. 1600-1610, 1999.

RYDEVIK, B.; LUNDBORG, G. Permeability of intraneural microvessels and perineurim following acute, graded experimental nerve compression. **Scand. Journal Plastic Reconstr. Surgery**, v. 11, p. 179-187, 1977.

RYDEVIK, B.; LUNDBORG, G.; BAGGE, U. Effects of graded compression on intraneural blood flow. An in vivo study on rabbit tibial nerve. **Journal Hand Surgery**, v. 6, p. 3, 1981.

SCHMELZER, J. D; ZOCHODNE, D. W; LOW, P.A. Ischemic and reperfusion injury of rat peripheral nerve. **Medical Sciences**, v. 86, p. 1639-1642, 1989.

SEDDON, H. J. Three types of nerve injury. Brain, v. 66, p. 237-288, 1943.

SEDDON, H. **Surgical disorders of the peripheral nerves**. London and New York: Churchill Livingstone, 1975.

SJÖBERG, J.; KANJE, M. The initial period of peripheral nerve regeneration and the importance of the local environment for the conditioning lesion effect. **Brain Research**, v. 529, p. 79-84, 1990.

SPENCE, A. P. Anatomia humana básica. São Paulo: Manole, 1991. Cap. 15, p. 419-443.

SONDELL, M.; LUNDBORG, G.; KANJE, M. Vascular endothelial growth factor stimulates Schwann cell invasion and neovascularization of acellular nerve grafts. **Brain Research**, v. 846, p. 219-228, 1999.

SUNDERLAND, S. A classification of peripheral nerves injuries producing loss of function. **Brain,** v. 74, p. 491-516, 1951.

SUNDERLAND, S. **Nerves and nerve injuries**. 2. ed. London and New York: Churchill Livingstone, 1978.

SUNDERLAND, S. Nervios periféricos y sus lesiones. Barcelona: Salvat, 1985.

SUNDERLAND, S. The anatomy and physiology of nerve injury. **Muscle & Nerve**, v. 13, p. 771-784, 1990.

TANAKA, K.; ZHANG, Q.; WEBSTER, H. Myelinated fiber regeneration alter sciatic nerve crush: morphometric observations in young adult and aging mice and the effects of macrophage suppression and conditioning lesions. **Experimental Neurology**, v. 118, p. 53-61, 1992.

TATAGIBA, M.; MAZZER, N.; AGUIAR, P. H. P.; PEREIRA, C. U. **Nervos periféricos**: diagnóstico e tratamento clínico e cirúrgico. Rio de Janeiro: Revinter, 2003. 233p.

TERENGHI, G. Peripheral nerve injury and regeneration. **Histology and Histopathology**, v. 10, p. 709-718, 1995.

THORNTON, M. R.; MANTOVANI, C.; BIRCHALL, M. A.; TERENGHI, G. Quantification of N-CAM and N-cadherin expression in axotomized and crushed rat sciatic nerve. **Journal of Anatomy**, v. 206, p. 69-78, 2005.

VAREJÃO, A. S. P.; CABRITA, A. M.; MEEK, M. F.; BULAS-CRUZ, J.; FILIPE, V. M.; GABRIEL, R. C.; FERREIRA, A. J.; GEUNA, S.; WINTER, D. A. Ankle kinematics to evaluate functional recovery in crushed rat sciatic nerve. **Muscle & Nerve**, v. 27, p. 706-714, 2003.

XU, Q; ZOCHODNE, D. W. Ischemia and failed regeneration in chronic experimental neuromas. **Brain Research**, v. 946, p. 24-30, 2002.

ZOCHODNE, D. W. The microenvironment of injured and regenerating peripheral nerves. **Muscle & Nerve**, v. 9, p. 33-38, 2000.

ZOCHODNE, D. W.; HO, L. T. Endoneurial microenvironment and acute nerve crush injury in the rat sciatic nerve. **Brain Research**, v. 535, p. 43-48, 1990.

ZOCHODNE, D, W.; NGUYEN, C. Angiogenesis at the site of neuroma formation in transected peripheral nerve. **Journal of Anatomy**, v. 190, p. 23-30, 1997.

ZOCHODNE, D. W.; NGUYEN, C. Increased peripheral nerve microvessels in early experimental diabetic neuropathy: quantitative studies of nerve and dorsal root ganglia. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 166, p. 40-46, 1999.

WEERASURIYA, A. Patterns of change in endoneurial capillary permeability and vascular space during Wallerian degeneration. **Brain Research**, v. 445, p. 181-187, 1988.

WEERASURIYA, A. Patterns of change in endoneurial capillary permeability and vascular space during nerve regeneration. **Brain Research**, v. 510, p. 135-139, 1990.

WIDERBERG, A.; LUNDBORG, L.; DAHLIN, B. Nerve regeneration enhancement by tourniquet. **Journal of Hand Surgery**, v. 26B, p. 347-351, 2001.