



Mara Lúcia Costamillan Zittlau

# ANÁLISE DOS ELEMENTOS DO TECIDO CONJUNTIVO NA RESPOSTA À INJEÇÃO INTRAFASCICULAR DO ANESTÉSICO ROPIVACAÍNA EM NERVOS CIÁTICOS DE COELHOS

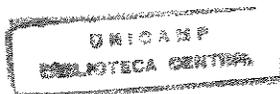
Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo (a) candidato a) Mara Lúcia Costamillan Zittlau e aprovada pela Comissão Julgadora.

A large, stylized handwritten signature in black ink, likely belonging to the author, Mara Lúcia Costamillan Zittlau.

21/2/00

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da UNICAMP para obtenção do Título de Mestre em Biologia Celular e Estrutural, na área de Biologia Celular

Orientador : Prof. Dr. Sebastião Roberto Taboga



2000 3 21

UNIDADE BC  
N.º CHAMADA:  
T/UNICAMP  
269a  
Ex.  
COMBO BC/ 41446  
PROC. 278/00  
C  D   
PREÇO R\$ 11,00  
DATA 11-02-00  
N.º CPD

CM-00142422-8

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

**Zittlau, Mara Lúcia Costamillan**

**Z69a**

Análise dos elementos do tecido conjuntivo na resposta à injeção intrafascicular do anestésico ropivacaína em nervos ciáticos de coelhos/Mara Lúcia Costamillan Zittlau.-- Campinas, SP: [s.n.], 2000.  
52f. ilus.

Orientador: Sebastião Roberto Taboga  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas,  
Instituto de Biologia.

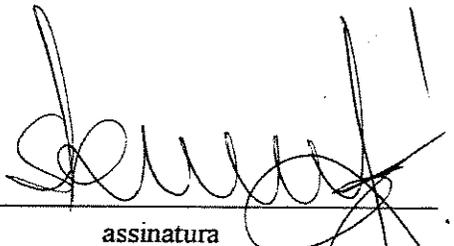
1. Nervo ciático. 2. Tecido conjuntivo. 3. Anestesia local. I.  
Taboga, Sebastião Roberto. II. Universidade Estadual de Campinas.  
Instituto de Biologia. III. Título.

Campinas, 21 de fevereiro de 2.000

**Banca Examinadora**

**Titulares**

Prof. Dr. Sebastião Roberto Taboga  
(orinetador)



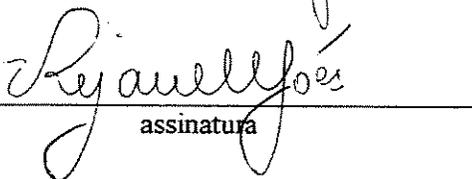
assinatura

Prof. Dr. Hernandes Faustino de Carvalho



assinatura

Profa. Rejane Maira Góes



assinatura

**Suplente**

Prof. Dr. Júlio César André

assinatura

*Ao meu filho Bruno, fonte infinita de amor*

*Ao meu marido Paulo, pelo respeito e apoio a  
minha carreira profissional*

*Aos meus pais, pelos princípios que norteiam  
minha vida e por terem me proporcionado o  
estudo, acreditando ser a Educação o maior  
patrimônio que se pode legar.*

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer as pessoas e as instituições que colaboraram para a execução deste trabalho:

Ao meu orientador Professor Doutor Sebastião Roberto Taboga pela boa vontade em me orientar neste trabalho.

Aos Professores Doutores Hernandes Faustino de Carvalho, Rejane Maira Góes e Júlio César André pela leitura cuidadosa dos manuscritos e sugestões na forma final da tese.

Ao Doutor Rubens Rodrigues pela sua contribuição na análise das lâminas e sugestões sobre a tese.

Ao Doutor e professor José Ponte pelo seu incentivo à pesquisa.

Aos Doutores Eduardo Scortegagna e Augusto José Olivais pela sua ajuda na cirurgia experimental.

Aos professores da disciplina de Histologia da UFP – Maristela Siviero e Heitor Verardi pelo auxílio na análise das lâminas.

As técnicas Rosana Silistino de Souza do Departamento de Biologia - IBILCE- UNESP e Elaine N. Ferraz do Departamento de Histologia da UPF pelo suporte fundamental na parte histotécnica.

Ao Departamento de Biologia Celular – IB/UNICAMP pela oportunidade do mestrado interinstitucional com a Universidade de Passo Fundo.

Ao apoio financeiro da CAPES.

# SUMÁRIO

	Página
<b>INTRODUÇÃO</b>	1
Considerações gerais sobre a estrutura do nervo	1
Considerações gerais sobre anestésicos e seus mecanismos de ação	3
Implicações clínicas dos acidentes com anestésicos	8
<b>JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA DO TEMA</b>	12
<b>OBJETIVO</b>	12
<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	13
Animais	13
Injeções de ropivacaína e de solução fisiológica	14
Coleta e processamento das amostras	14
Colorações histológicas	15
<b>RESULTADOS</b>	18
<b>DISCUSSÃO</b>	37
As 48 horas iniciais após a injeção do anestésico: Processos inflamatórios agudos	37
Os 7 dias após a injeção do anestésico: Proliferação celular, fibrose e regeneração axonal	39
Outros eventos associados à recuperação neuronal: Envolvimento de células do tecido conjuntivo	40
Considerações finais	41
<b>CONCLUSÕES GERAIS</b>	43
<b>RESUMO</b>	44
<b>ABSTRACT</b>	46
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	48

# INTRODUÇÃO

## Considerações gerais sobre a estrutura do nervo

Para o melhor entendimento da estrutura dos nervos, prolongamentos neuronais no sistema nervoso periférico, em análises histológicas ou até mesmo histopatológicas, são necessárias algumas colocações de ordem geral, principalmente no que se refere à estrutura das membranas conjuntivas envolventes.

Um nervo em corte histológico transversal pode ser facilmente avaliado, se formos capazes de identificar e separar morfológicamente a porção neural da porção conjuntiva. Assim, as membranas conjuntivas envolventes do nervo são chamadas de perineuro, epineuro e endoneuro, na dependência de sua localização no fascículo neural (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1999).

O **epineuro** consiste de um tecido moderadamente denso que interliga os fascículos neurais entre si, sendo a mais periférica das membranas conjuntivas. Neste tecido existe esparsamente distribuída uma quantidade apreciável de tecido adiposo unilocular. Além disto, podem ser encontrados quase que exclusivamente fibroblastos e raros componentes celulares responsáveis pela defesa (ROSS *et al.*, 1993). Na região do epineuro, podem ser identificados grandes vasos, como artérias e veias de médio calibre, principalmente em nervos de grande porte como o ciático (ORTIZ-HIDALGO & WELER, 1992).

O **perineuro**, originalmente descrito por Henle no século XIX, teve uma variada nomenclatura antes da denominação atual. Os termos pelo qual este componente foi conhecido são: mesotélio, perilema, neurotélion, perineurotélion e o mais aceito e difundido na área, perineuro (SHANTAVEERAPPA & BOURNE, 1966). Histologicamente, o perineuro consiste de lamelas concêntricas de células achatadas, os fibroblastos, separadas por camadas de colágeno. O número de camadas varia segundo o nervo em questão. O número de camadas também pode ser alterado na dependência de algumas patologias (ASBURY & JOHNSON, 1978). Das membranas conjuntivas envolventes do nervo, parece que o perineuro é a única que está relacionada com a barreira hemato-neural do sistema nervoso periférico (ORTIZ-HIDALGO & WELER, 1992).

O **endoneuro** é a região que contém os axônios circundados pela célula de Schwann. É constituído por fibras delgadas de colágeno e fibras reticulares, fibroblastos esparsos, capilares e raras células do sistema imunológico. Em corte transversal da região endoneural, 90% da área é ocupada pelo núcleo da célula de Schwann, 5% por fibroblastos e 5% pelos outros componentes. O colágeno é altamente organizado na região endoneural, como nas outras membranas mais externas dos nervos. As finas fibras de colágeno organizam-se adjacentes às membranas da bainha de mielina, separadas somente por uma fina membrana basal (STERNBERG, 1992).

Estes tecidos conjuntivos, além de desempenharem um papel de defesa contra injúrias e choques mecânicos, também desempenham papel importante na regeneração,

suprimento nutricional e proliferação celular para manutenção da população fibroblástica. Vale lembrar também que para estas membranas conjuntivas dirigem-se e alojam-se as células migratórias de defesa do sistema imune, como leucócitos, macrófagos, mastócitos e plasmócitos (BILBAO, 1995).

O tecido conjuntivo que envolve os fascículos neurais e contribui para a estrutura do nervo é um tecido conjuntivo propriamente dito constituído por células que de acordo com a caracterização estrutural e funcional podem ser classificadas como células residentes ou autóctones, que compreendem os fibroblastos, os adipócitos os macrófagos fixos (histiócitos) e os mastócitos. Outros tipos celulares presentes no tecido conjuntivo são chamados de células migratórias e compreendem principalmente às células do sistema imune, os leucócitos, os plasmócitos e os macrófagos não fixos. Todas estas células desempenham papel importante na resposta às injúrias teciduais e conseqüente processos de regeneração tecidual (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1999).

### **Considerações gerais sobre anestésicos e seus mecanismos de ação**

Os anestésicos locais são substâncias que bloqueiam a condução nervosa de forma reversível, sendo sua aplicação seguida de recuperação completa da função do nervo. O sítio de ação dos anestésicos locais é a membrana plasmática, onde bloqueiam o processo de excitação-condução do estímulo nervoso (CARVALHO, 1994).

Os anestésicos locais interrompem a condução do estímulo nervoso por bloquear

a condutância dos canais de sódio e conseqüentemente impedir a deflagração do potencial de ação. A ligação dos anestésicos locais da família aminoamidas aos canais de sódio depende da conformação destes canais, sendo portanto um fenômeno dependente da voltagem. A afinidade pela configuração fechada do canal é baixa, enquanto que a conformação ativada do canal é extremamente favorável à interação com o anestésico (COURTNEY, 1987).

Outro mecanismo pelo qual os anestésicos locais podem interromper a condutância ao sódio independe de sua ligação com a estrutura protéica e hidrossolúvel do canal. Desta maneira poderia haver infiltração do anestésico na parte lipídica da membrana, desorganizando e expandindo a bicamada lipídica, obstruindo os canais por contigüidade. A maioria dos anestésicos locais age tanto por interação com os canais protéicos como por expansão da membrana plasmática (CARVALHO, 1994).

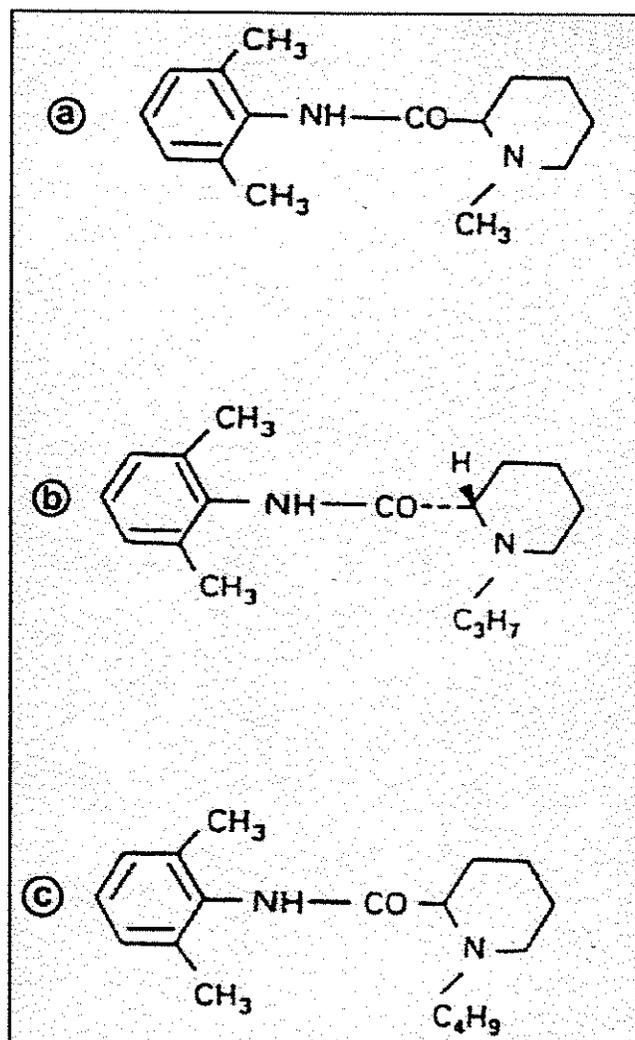
Os anestésicos locais variam em seus efeitos clínicos e essas diferenças dependem de sua estrutura química. Apresentam três partes fundamentais em sua fórmula química geral de acordo com COVINO & VASSALO (1985): **Radical aromático** - o qual é a porção lipossolúvel da droga, responsável por sua penetração no nervo; sendo que no anestésico estudado neste trabalho o radical aromático é a xilidina. **Cadeia Intermediária** - é o esqueleto da molécula do anestésico. Variações nesta cadeia intermediária levam a variações tanto na potência como na toxicidade dos anestésicos locais. **Grupo amina** - é a porção ionizável da molécula, a qual sofre influência do pH do meio e determina a velocidade de ação do anestésico local (Figura

1). De acordo com a natureza química da ligação entre o anel aromático e o grupamento amina, os anestésicos locais são divididos em dois grandes grupos: *ésteres e amidas*. Os ésteres são biotransformados rapidamente no plasma, pela colinesterase plasmática, enquanto que os amidas dependem de transformação pelo retículo endoplasmático liso hepático (CARVALHO, 1994).

A ropivacaína é um anestésico local que apresenta cadeia intermediária do grupo amida, e depende de biotransformação hepática. Trata-se de base fraca, portanto insolúvel em água. Para que se tornem hidrossolúveis são preparados, para uso comercial, a base de ácido clorídrico, isto é, na forma de cloridrato .

Este novo anestésico local amino-amida pertence ao grupo dos pipecolilxilidida e é um enantiômero puro (S-enantiômero) onde; a molécula pipecolilxilidida contém um átomo de carbono assimétrico que confere uma característica quiral a este tipo de droga.

A existência de um composto com propriedades anestésicas locais, do grupo amino-amida, de longa duração e relacionado à bupivacaína, foi divulgado por Covino em 1986. (COVINO BG – One hundred years plus two of Regional Anesthesia. Labat lecture, 1986, 11<sup>th</sup> Annual Scientific Meeting of American Society of Regional Anesthesia. San Antonio, Texas-USA.)



**Figura 1.** Fórmulas químicas dos anestésicos do grupo dos pipecoloxilidídeos. **a:** mepivacaína **b:** ropivacaína e **c:** bubivacaína. A posição do carbono assimétrico está mostrada na molécula da ropivacaína (retirado de EKËNSTRAM *et al.*, 1957).

O mais interessante é que este composto permaneceu guardado e incógnito por quase 40 anos, ou seja, em 1957, Ekenstram e colaboradores sintetizaram uma série homóloga de compostos com substituições N-alquílicas (metil, propil e butil) na estrutura pipecolilxilidida. Quando a substituição ocorreu com a introdução do radical metil, foi obtido o N-metil pipecolilxilidida (mepivacaína); com o radical butil, o composto resultante foi o N-butil pipecolilxilidina (bupivacaína); finalmente com o radical propil, obteve-se o N-propil pipecolil xilidida que viria a ser a ropivacaína, a que, por razões desconhecidas não foi investigada na ocasião (EKENSTRAM *et al.*, 1957).

Este anestésico local do tipo amida apresenta alto pKa e baixa lipossolubilidade; ou seja pKa de 8,07 e um coeficiente de partição em n-heptano/água (lipossolubilidade) de 6,1 ( $\pm$  0,6); sua meia vida é menor que a bupivacaína, mas a ligação as proteínas plasmáticas é semelhante a ela, ligando-se à 95% às proteínas plasmáticas. Seu peso molecular é 274 kDa na forma básica e 310 kDa na forma de sal (SIMONETTI, 1995).

Esta droga é metabolizada predominantemente pela enzima citocromo P450 microsomal, nos hepatócitos. Em estudos *in vitro* a ropivacaína é metabolizada na forma de vários metabólitos: 2,6-pipecolilxilidida; 3-hidroxiropivacaina e 4-hidroxiropivacaína.

A partir de estudos *in vitro* em nervos de animais, constatou-se que a ropivacaina apresentou-se mais seletiva para fibras nervosa responsáveis pela transmissão da dor (

Fibras A $\delta$  e C ) do que para fibras motoras (Fibras A $\beta$ ). A ropivacaína apresenta efeito vascular bifásico, causando efeito vasoconstritor em baixas concentrações e efeito vasodilatador em altas concentrações. (MARKHAM & FAULDS, 1996).

Quanto à sua toxicidade sistêmica, a escolha do enantiômetro S(-) do composto propil pipecolilxilidida foi precedida de estudos realizados comparativamente entre seus isômeros ópticos, em termos de estereoespecificidade para os canais de sódio do nervo e do coração. O enantiômero S(-) ou ropivacaína se mostrou eficaz como um agente anestésico local e expressivamente menos cardiotoxico, necessitando-se de uma investigação mais acurada sobre a toxicidade sistêmica (McCLURE, 1996).

### **Implicações clínicas dos acidentes com anestésicos**

Por muitos anos têm havido controvérsias sobre a utilidade e segurança da anestesia regional, tanto da anestesia espinal como da anestesia peridural. Entretanto, o uso destas técnicas para várias situações cirúrgicas tem aumentado muito nas últimas décadas . As cirurgias ambulatoriais têm aberto um novo campo para anestesia espinal e os bloqueios centrais proporcionam novas possibilidades no pós-operatório e no tratamento da dor crônica. Sobre certas condições o bloqueio central oferece vantagens através da redução da perda sangüínea, reduzindo o risco de complicações tromboembólicas (CHRISOPHERSON *et al*, 1993).

O crescente conhecimento sobre os efeitos fisiológicos dos bloqueios e sobre a

farmacologia dos anestésicos locais, bem como o melhor treinamento dos anesthesiologistas, e o desenvolvimento de técnicas anestésicas cada vez mais apuradas, tem contribuído para uma maior aceitação da anestesia regional pelos cirurgiões e pelos pacientes (KATZ *et al.*, 1980).

Tanto a anestesia espinal como a anestesia peridural, proporcionam condições cirúrgicas ideais, promovendo boa analgesia intraoperatória e pós-operatória, tanto quanto um excelente relaxamento muscular intraoperatório. Além disso, existem outros benefícios óbvios. Estas técnicas podem resultar em uma diminuição do sangramento cirúrgico intraoperatório, levando com isto a uma diminuição nas transfusões sangüíneas durante as cirurgias, além de alterações cardiorespiratórias mínimas, inerentes da técnica, provavelmente existem diminuindo a mortalidade e a morbidade (KATZ *et al.*, 1980).

As complicações neurológicas conseqüentes da anestesia peridural ou subaracnóidea são pouco freqüentes, porém sua gravidade e o caráter muitas vezes definitivo do quadro clínico justificam medidas profiláticas rigorosas na utilização das técnicas. Cuidados especiais devem ser tomados para se evitar traumas nervosos e vasculares, contaminação com agentes infecciosos e injeção de substâncias inadequadas (NÓBREGA *et al.*, 1990).

O mecanismo pelo qual as complicações neurológicas ocorrem após anestesia regional não é completamente entendido. Existem pelo menos dois tipos de fatores que

parecem estar relacionados com o bloqueio anestésico, (1) aqueles relacionados com o trauma mecânico e (2) aqueles resultantes de efeitos tóxicos do próprio anestésico local e isquemia transitória. Em muitos casos poderia haver uma combinação de um ou mais fatores. No trauma mecânico inclui-se o trauma da agulha, trauma da injeção, compressão e extensão causada por fatores externos (SELANDER, 1993).

Efeitos tóxicos podem se dar pela injeção direta do agente infiltrado no tecido nervoso ou efeito indireto causado pela isquemia transitória ou uma reação proliferativa ao redor do tecido, o qual poderia levar a alterações degenerativas.

A isquemia pode ser causada por fatores extraneurais ou intraneurais. A isquemia extraneural pode ser causada por agentes de ação vasoconstritora adicionados ao anestésico local os quais podem diminuir a pressão de perfusão intraneural enquanto que a isquemia intraneural pode ser causada por alteração na barreira hemato-neural, ocorrendo edema, ou seja um aumento na pressão endoneural e insuficiência na perfusão capilar.

Na maioria dos casos a razão é provavelmente multifatorial, ou seja, uma lesão mecânica poderia alterar a barreira hemato-neural com edema e isquemia. Uma injeção intrafascicular do anestésico local pode causar efeito tóxico, reação inflamatória ou reação degenerativa secundária. Além disso, algumas doenças sistêmicas e neurológicas poderiam tornar o paciente mais susceptível às reações adversas neuronais (SELANDER, 1993).

O aumento no número de complicações neurológicas se deve sem dúvida, ao aumento das técnicas regionais, tanto epidural quanto espinhal. Na analgesia pós operatória contínua, na exposição ao anestésico local por um tempo maior e no uso de opióides no espaço peridural e subaracnóideo. Têm sido relatados casos de síndrome da cauda eqüina (caracterizada por incontinência urinária e fecal, perda da sensibilidade na área perineal e diminuição da força em membros inferiores) provavelmente causada pela exposição direta da cauda eqüina a altas concentrações de anestésicos locais (KENNETH *et al.*, 1994).

Complicações após anestesia peridural parecem ser mais freqüentes do que após bloqueio espinhal. De acordo com as complicações neurológicas e queixas reportadas pelo Conselho de Responsabilidade Médica da Suécia, as complicações epidurais são duas vezes mais freqüentes que as espinhais (DAHLGREN & TORNEBRANDT, 1995). Independente do tipo de anestesia, a hipotensão arterial, hipoxemia e alterações metabólicas poderiam causar danos às estruturas neuronais, além do dano de nervos periféricos causados por compressão ou estiramento dependendo da posição do paciente durante o ato cirúrgico.

Felizmente as complicações neurológicas severas após bloqueio central ou bloqueio periférico são raras, porém sua gravidade e o caráter definitivo do quadro clínico podem ter um impacto significativo na qualidade de vida dos pacientes que sofreram tais seqüelas.

## **JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA DO TEMA**

Durante o bloqueio de nervos periféricos o anestésico local penetra no nervo produzindo perda funcional. Embora se saiba muito sobre a farmacocinética e a relação constante do anestésico local com a inibição da atividade do impulso nervoso *in vitro*, em nervo isolado muito pouco é sabido sobre a relação entre a perda funcional e o uso de anestésico local intrafascicular *in vivo* bem como em relação às alterações morfológicas que ocorrem com a injeção intrafascicular do anestésico local.

## **OBJETIVO**

O objetivo deste trabalho é identificar as alterações microscópicas com ênfase às membranas conjuntivas do nervo periférico após a injeção intrafascicular do anestésico local ropivacaína (Naropin), em comparação com um grupo controle, e outro grupo experimental que recebeu solução fisiológica.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Animais**

No presente estudo foram utilizados 20 coelhos adultos, pesando de 3 a 5 Kg. Os coelhos foram aclimatizados no laboratório do Biotério Central da Universidade de Passo Fundo por 10 dias antes do experimento, com livre acesso para água e alimento. Os animais foram divididos aleatoriamente em 3 grupos:

**Grupo I:** Animais controles (2 animais). Os nervos ciáticos direito e esquerdo foram removidos logo após o sacrifício.

**Grupo II:** Animais com coletas dos nervos ciáticos feitas depois de 48 horas da injeção intrafascicular (9 animais).

**Grupo III:** Animais com coletas dos nervos ciáticos feitas depois de 7 dias da injeção intrafascicular (9 animais).

Imediatamente após a coleta os nervos obtidos dos três grupos foram processados pelas técnicas histológicas.

## **Injeções de ropivacaína e de solução fisiológica**

Os coelhos foram anestesiados com injeção intramuscular de uma solução composta por Ketamina (50mg/Kg), Xilazina (5mg/Kg), e em seguida submetidos à cirurgia na qual foram localizados os nervos ciáticos de ambos os membros posteriores na região posterior da coxa.

Após a exposição do nervo foi feita então, a injeção intrafascicular de solução de cloridrato de Ropivacaína – Naropin 0,75% (0,2mL) no nervo ciático do membro posterior direito e de solução fisiológica (0,2mL) no nervo ciático do membro posterior esquerdo. No local da punção pela agulha, os nervos foram marcados com fio mononylon 4,0 para determinação do local da punção.

Então, a incisão foi fechada e os animais foram individualmente devolvidos às suas gaiolas e mantidos com livre acesso à alimentação e água. No pós-operatório imediato foram ministrados aos animais injeção intramuscular de anti-inflamatório e antibiótico.

## **Coleta e processamento das amostras**

Após 48 horas e 7 dias (Grupo II e Grupo III respectivamente) os animais foram anestesiados com Ketamina 50mg/Kg – intramuscular. Então, sob efeito do anestésico procedeu-se a punção endovenosa injetando-se Thionembatal (5mg/Kg), que leva os

animais a um processo de profunda anestesia. A seguir os animais foram sacrificados através de uma punção intracardíaca com "abocath" 14 diretamente no ventrículo direito com injeção de solução de Karnowsky (GLAUERT, 1975). Seguiu-se uma perfusão usando uma bomba de infusão contínua (Nutrimat II – B. Braun ) onde perfundi-se o fixador de Karnowsky (solução de paraformaldeído a 5% e de glutaraldeído a 2,5% em tampão fosfato Sörensen pH 7,2 - 0,1M), durante 25 minutos num volume de 400mL. Após a perfusão, o nervo ciático foi exposto, retirado, banhado *in locu* com o fixador e mantido sob imersão no mesmo fixador por 48 horas a 4°C.

De cada nervo foram removidos três fragmentos levando-se em conta o fio de mononylon marcador da punção. Os três fragmentos foram assim classificados: proximal, mediano e distal.

Os fragmentos foram, então lavados em água corrente, desidratados em etanol, embebidos com historesina Leica "overnight" e, depois da inclusão e polimerização da resina, foram feitos cortes histológicos de 1 - 2  $\mu$ m de espessura em micrótomo rotativo manual Reichert Jung.

## **Colorações histológicas**

### **Coloração pela hematoxilina-eosina (HE)**

O cortes foram corados pela hematoxilina de Harris por cinco minutos, diferenciados em álcool ácido (nove partes de álcool 70% e uma parte de ácido

clorídrico 1N) e lavados em água corrente, por 10 minutos. Posteriormente, passaram por um rápido banho em álcool 80% e foram contracorados em solução de eosina-floxina (10:1-V/V) por 2 minutos, secados ao ar e montados em bálsamo do Canadá (BEHMER *et al.*, 1976).

### **Coloração pelo Azul de Toluidina**

A secções de 2 $\mu$ m do nervo ciático incluído em historresina foram coradas pelo azul de toluidina 0,025% em tampão McIlvaine pH 4,0 por 15 minutos, lavadas em água, secadas ao ar e montadas em bálsamo do Canadá (MELLO & VIDAL, 1980).

### **Coloração pelo método do Picrossírius-hematoxilina**

Os cortes foram corados pela solução de picrossírius (sirius red F3B200 a 0,1% em solução saturada de ácido pícrico), por 60 minutos em estufa 60° C, lavados rapidamente em água destilada, corados pela hematoxilina de Harris por 8 minutos e lavados em água corrente por 10 minutos (JUNQUEIRA *et al.*, 1979). Em seguida secados ao ar e montados em bálsamo do Canadá.

### **Análise e documentação fotográfica**

A análise e documentação fotográfica do material em estudo se deu em

## RESULTADOS

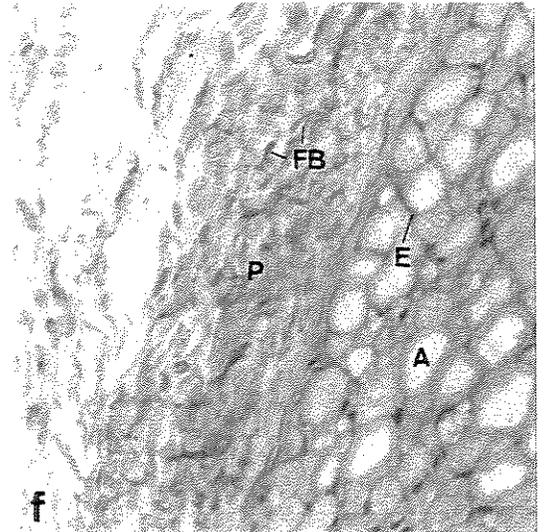
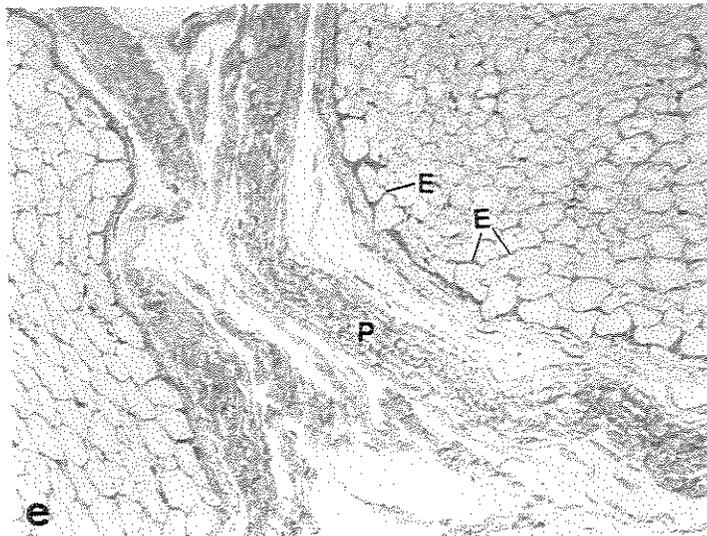
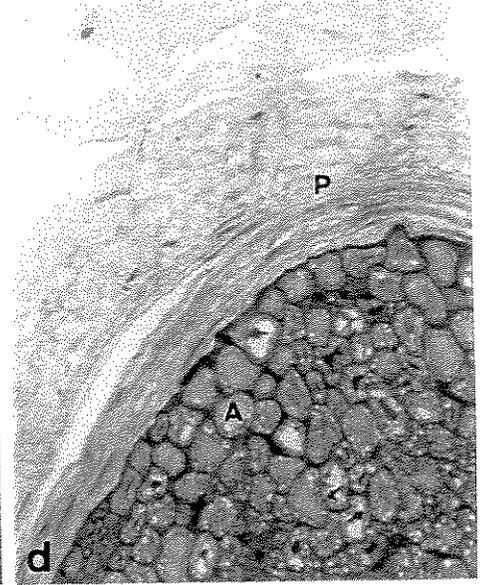
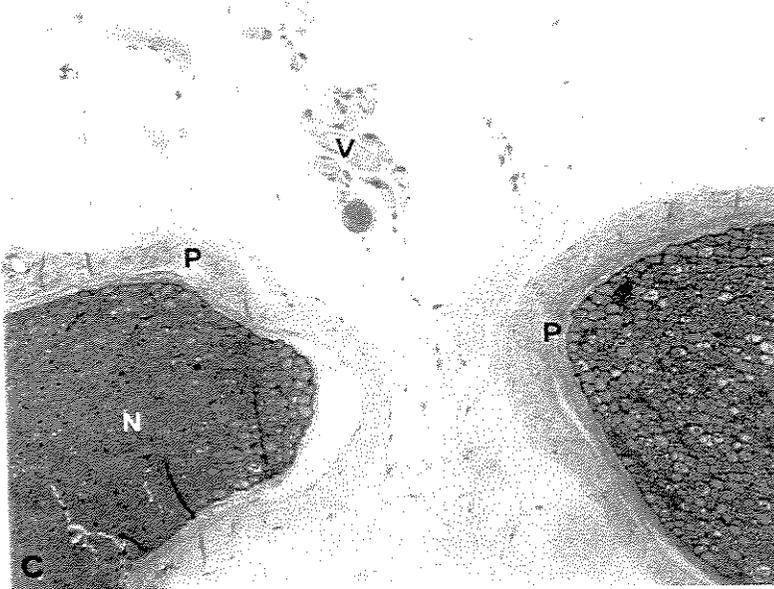
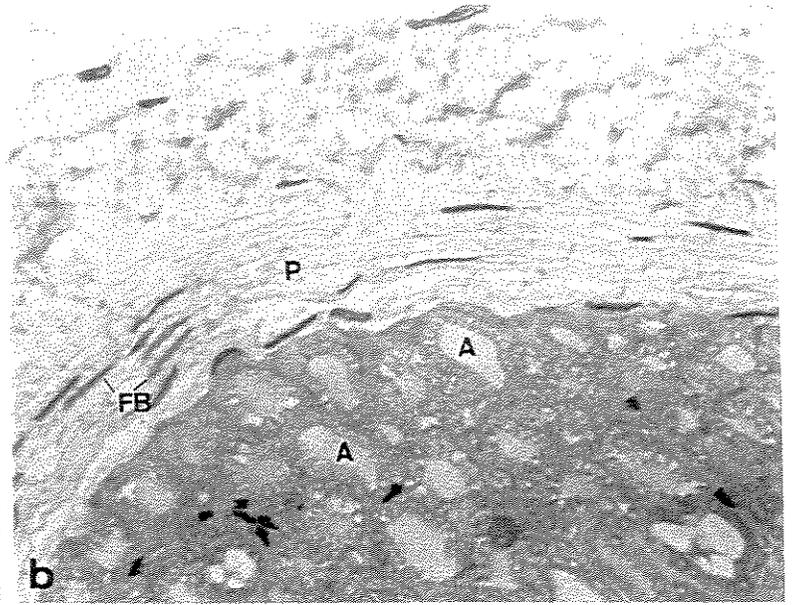
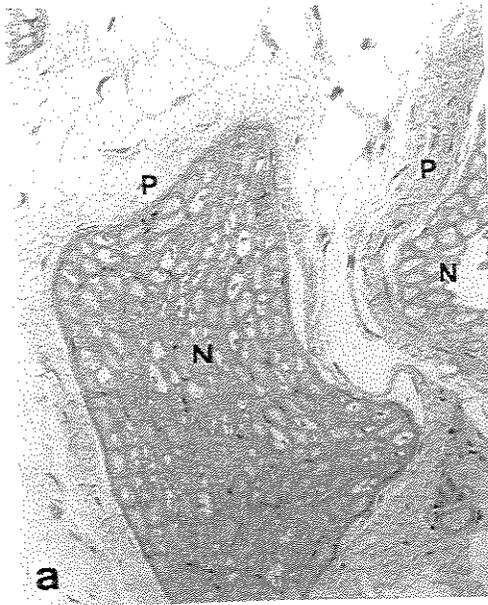
A organização histológica do nervo ciático íntegro de coelhos normais não difere muito daquela descrita para outros mamíferos. Apresenta um agrupamento de fascículos neurais variando entre 7-10 na quantidade e variando também na espessura dos fascículos, dependendo do tamanho e da idade do animal. Nos animais em estudo, os cortes histológicos transversais revelaram sempre uma quantidade de fascículos neurais variando entre 5-7 unidades.

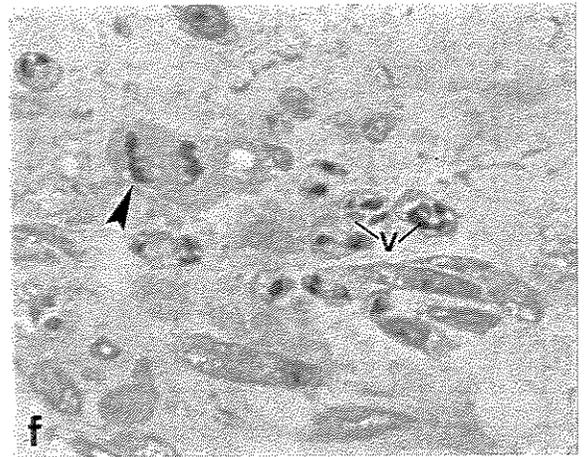
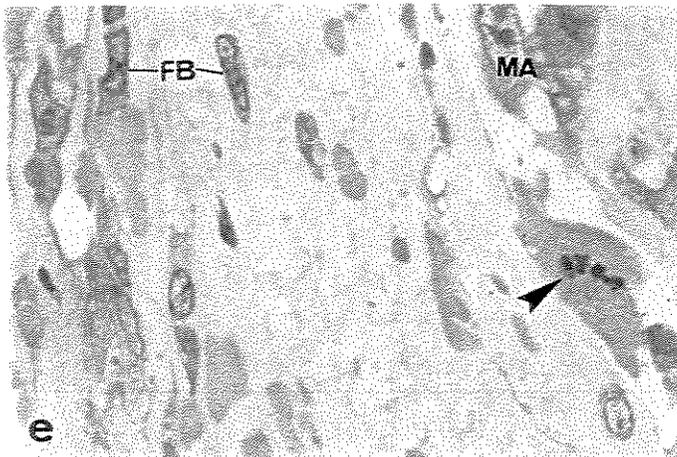
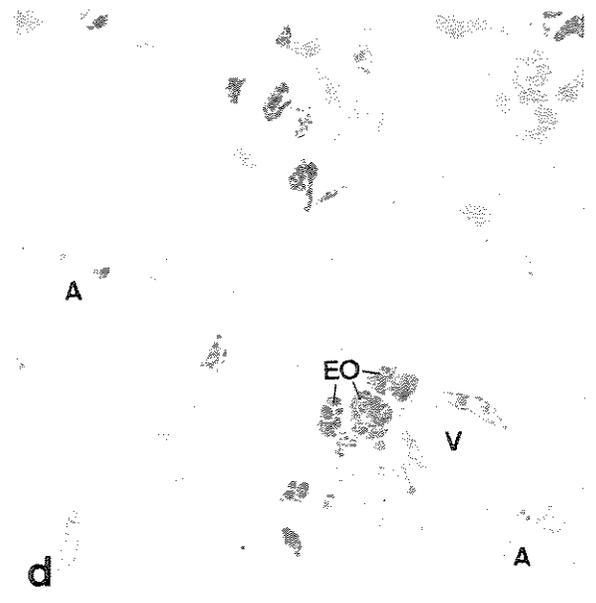
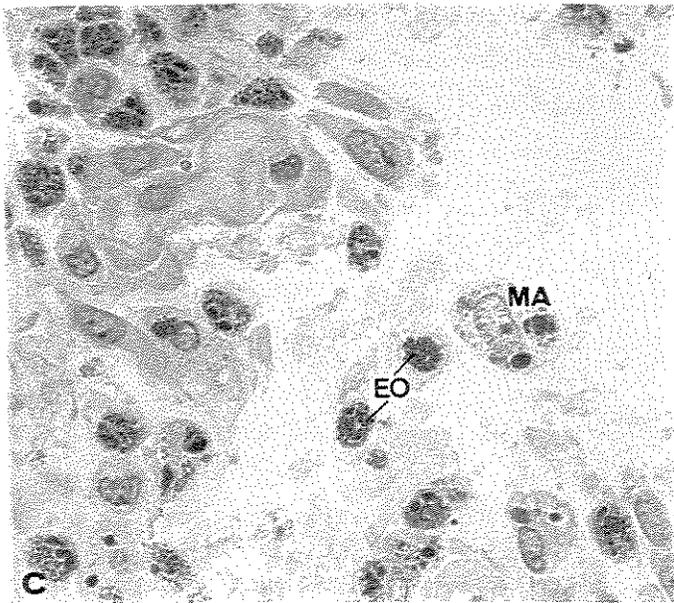
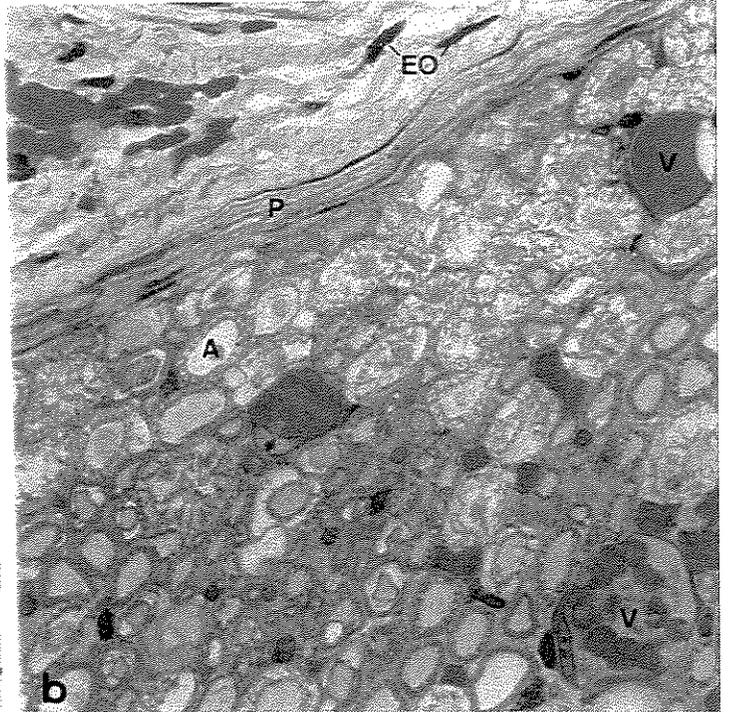
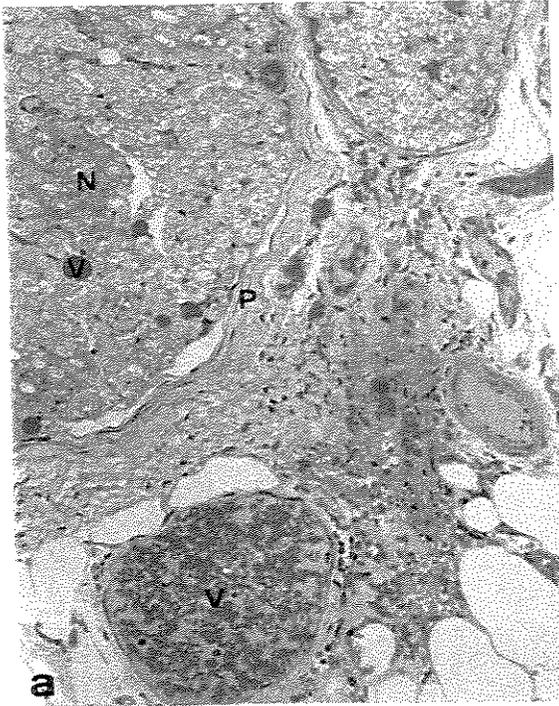
A análise do material controle revelou que a estrutura de um nervo íntegro é caracterizada por membranas conjuntivas ricas em colágeno fibroso, entremeadas a fibroblastos bastante alongados. O colágeno pode ser detectado histoquimicamente nas três membranas: epineuro, perineuro e endoneuro (Figuras 2 e 8).

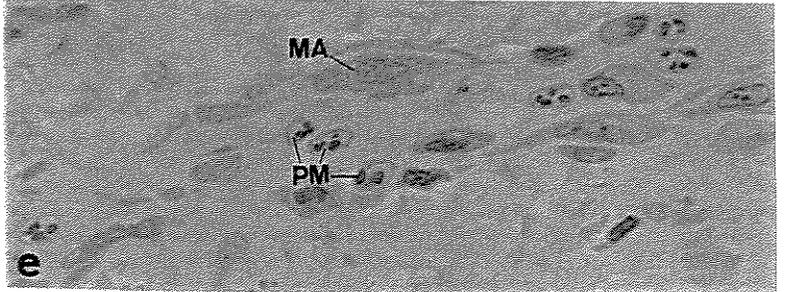
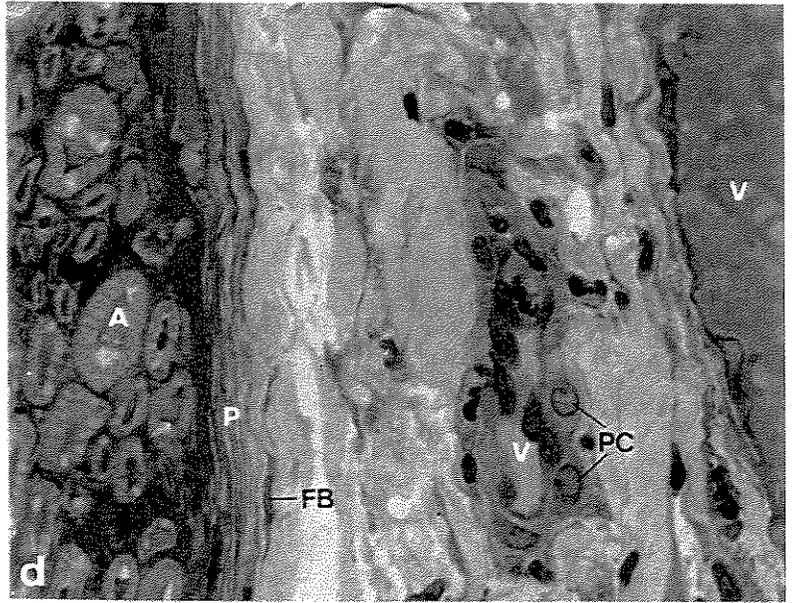
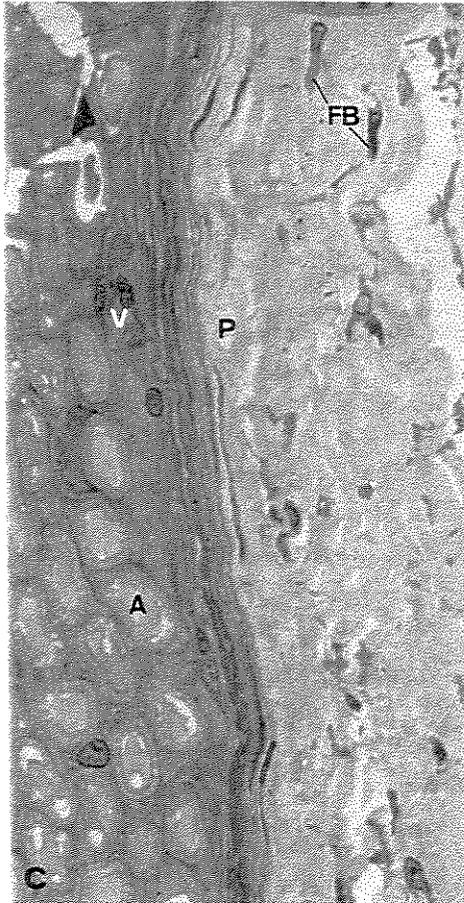
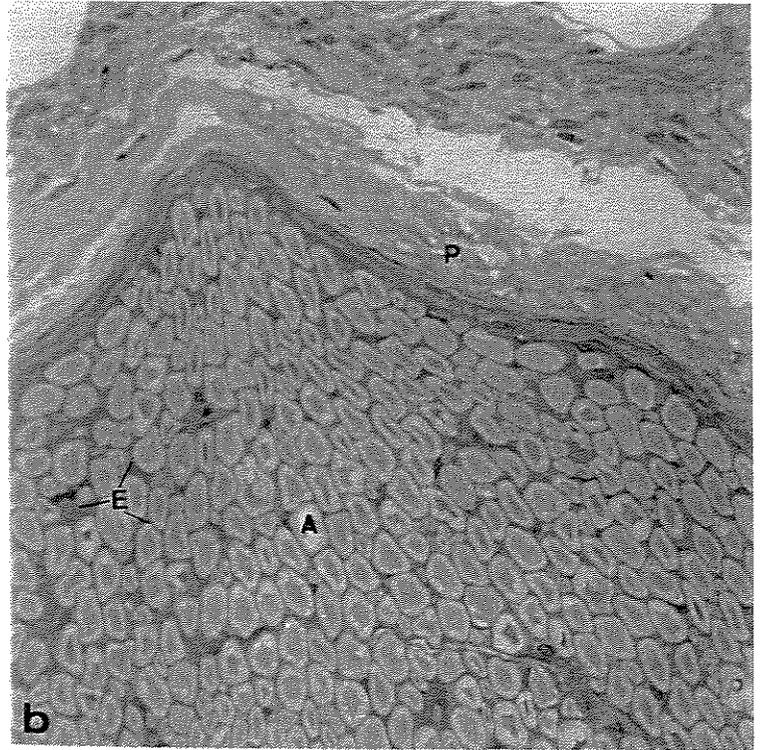
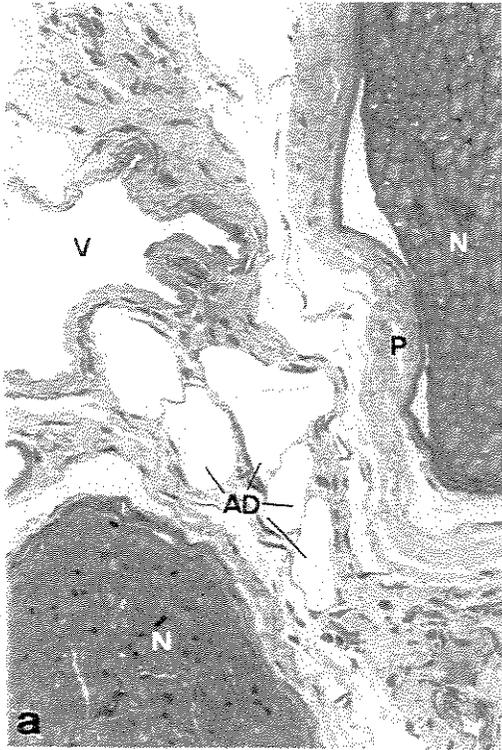
As análises dos nervos dos dois grupos experimentais, considerando as três regiões analisadas: proximal, mediana e distal à injeção intrafascicular, revelou que em 48 horas após a injeção, processos degenerativos nos axônios são instalados, acarretando uma reação inflamatória aguda, que se instala nas membranas conjuntivas envolventes dos fascículos neurais, incluindo uma dilatação capilar e edema endoneural.

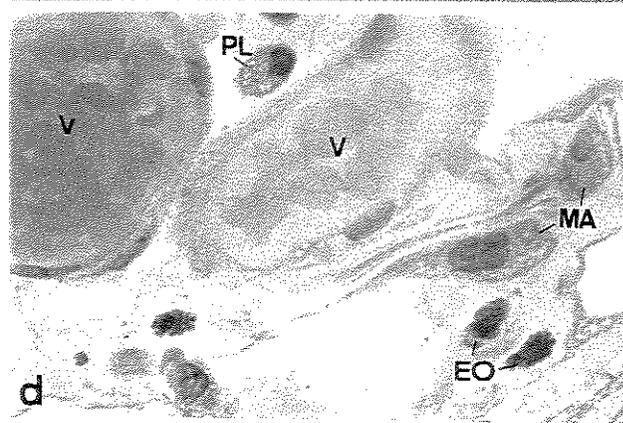
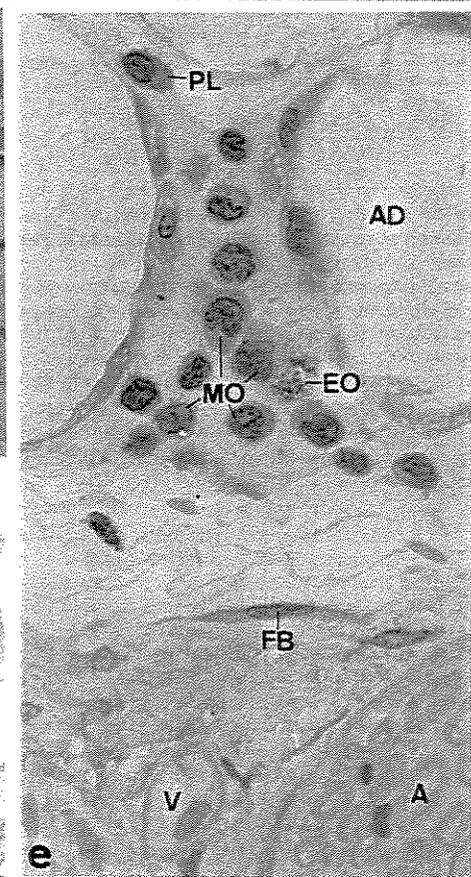
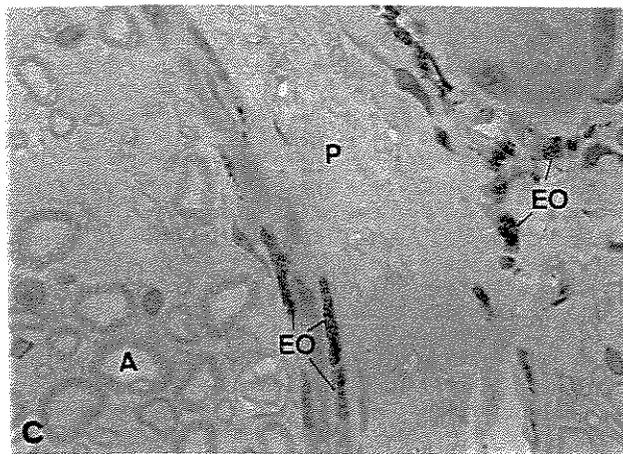
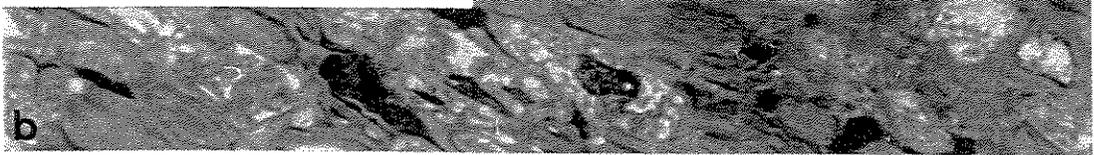
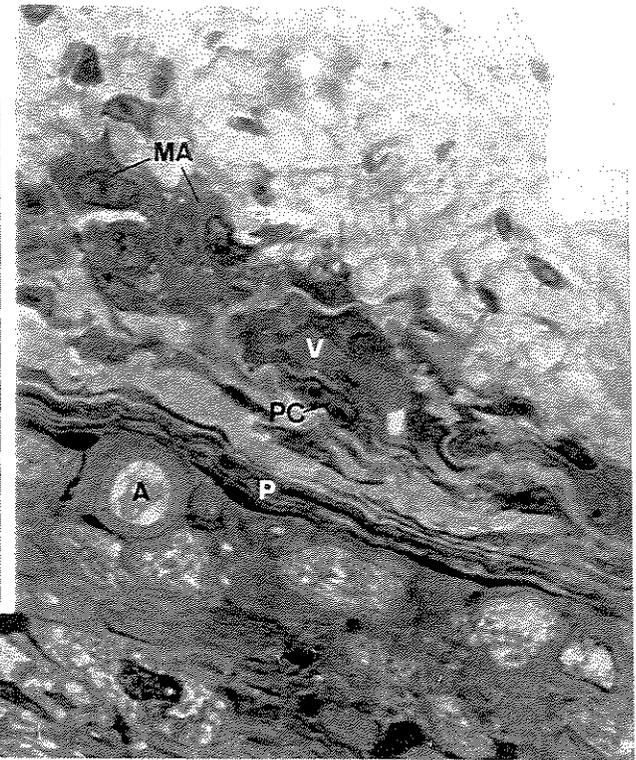
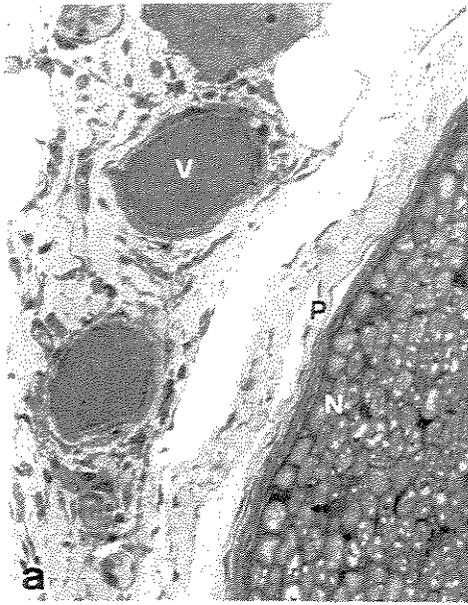
Dos fenômenos proliferativos encontrados nesta fase de reação inflamatória aguda pôde ser detectado grande aumento de leucócitos polimorfonucleares, principalmente eosinófilos, além de macrófagos e grande aumento de pericitos (Figuras

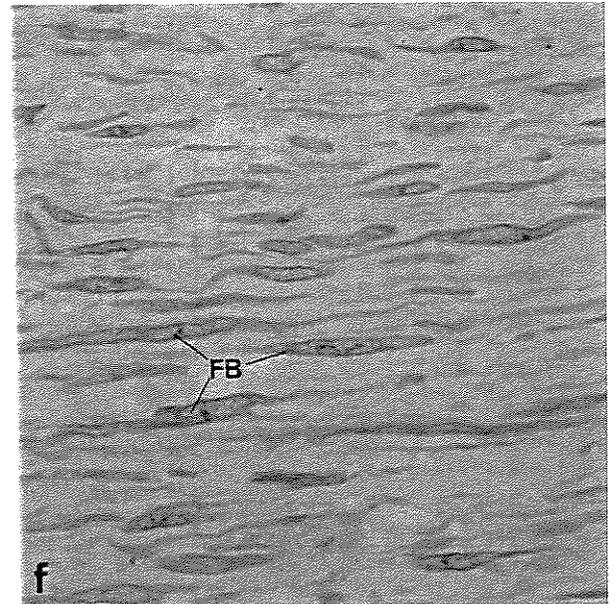
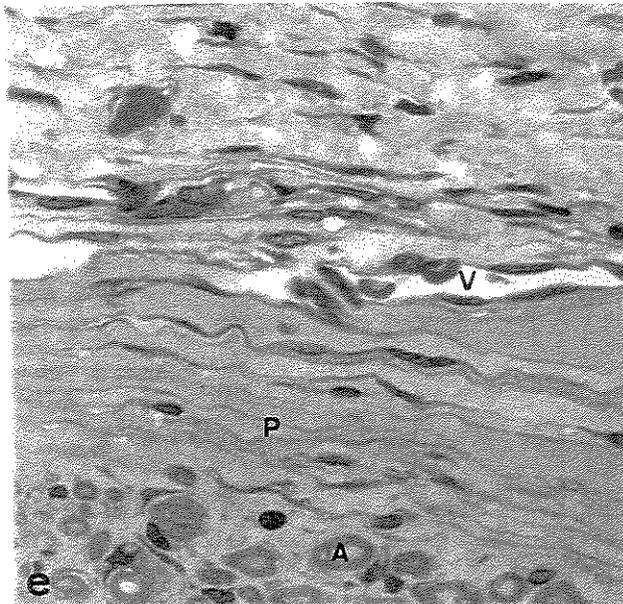
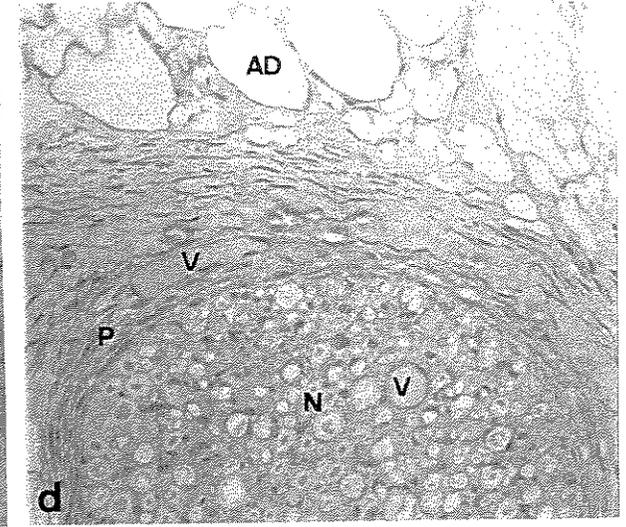
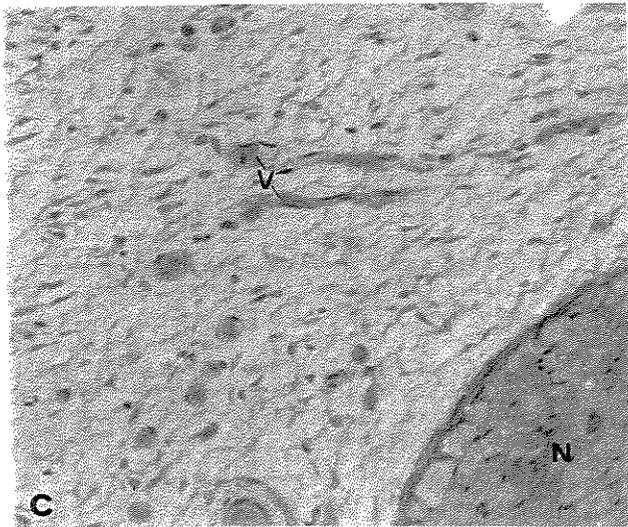
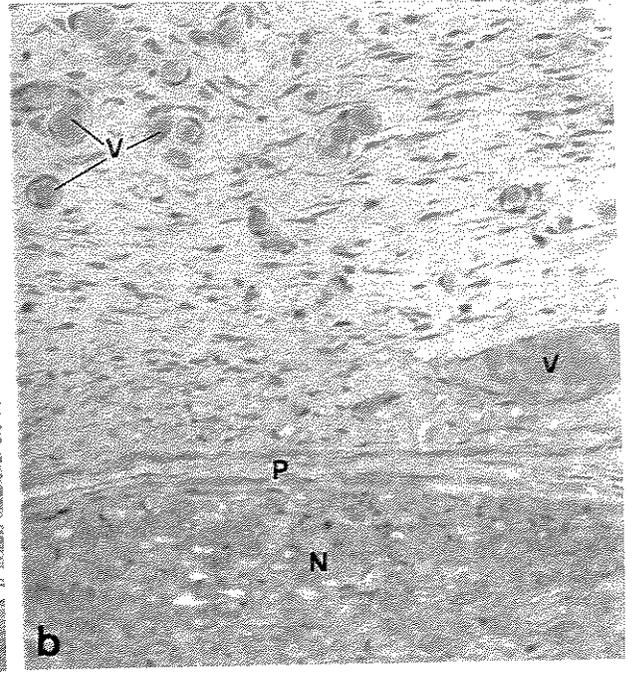
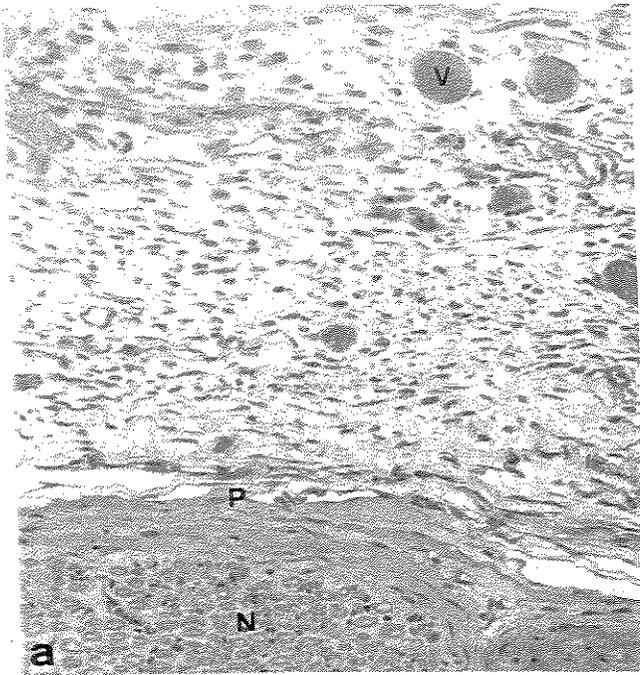
degenerativos de axônios em nervos após 48 horas da injeção (Figura 9).

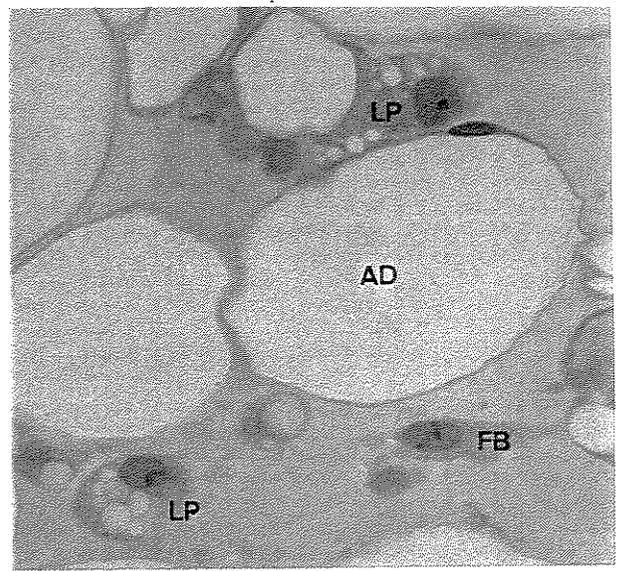
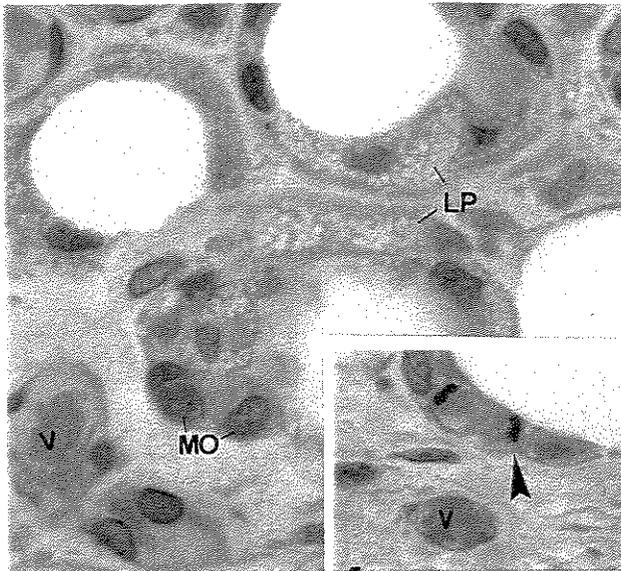
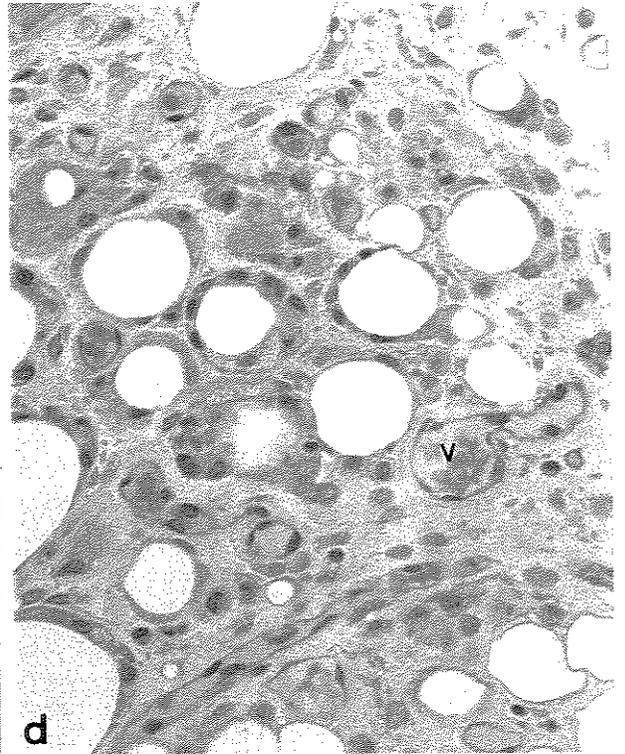
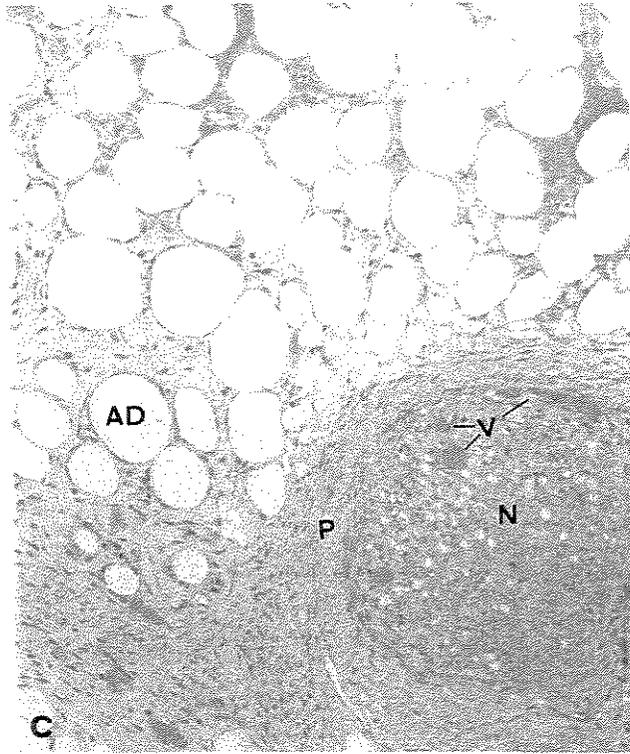
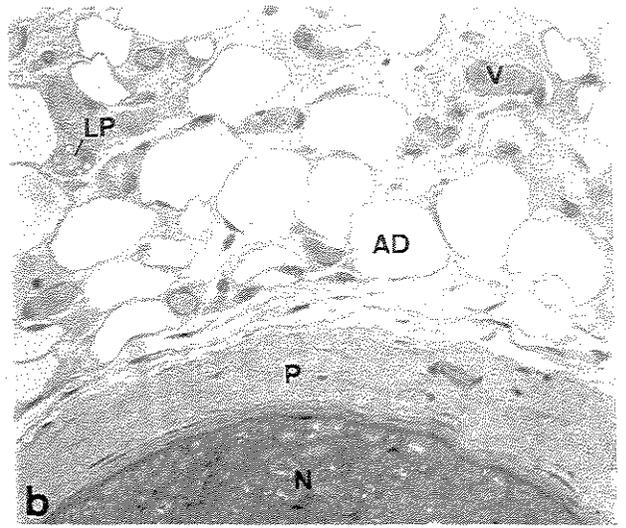
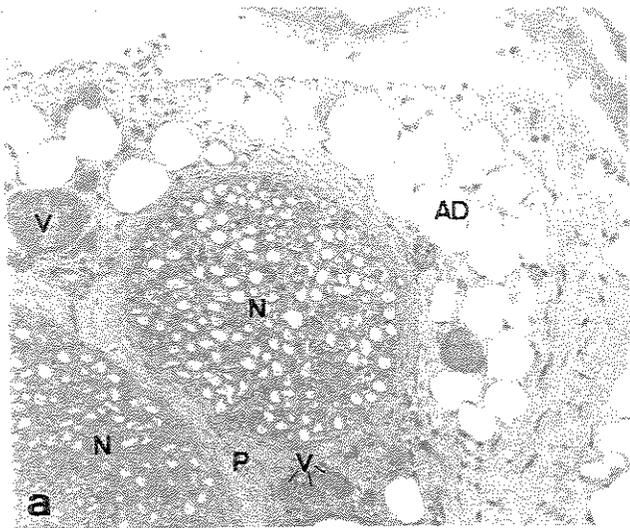


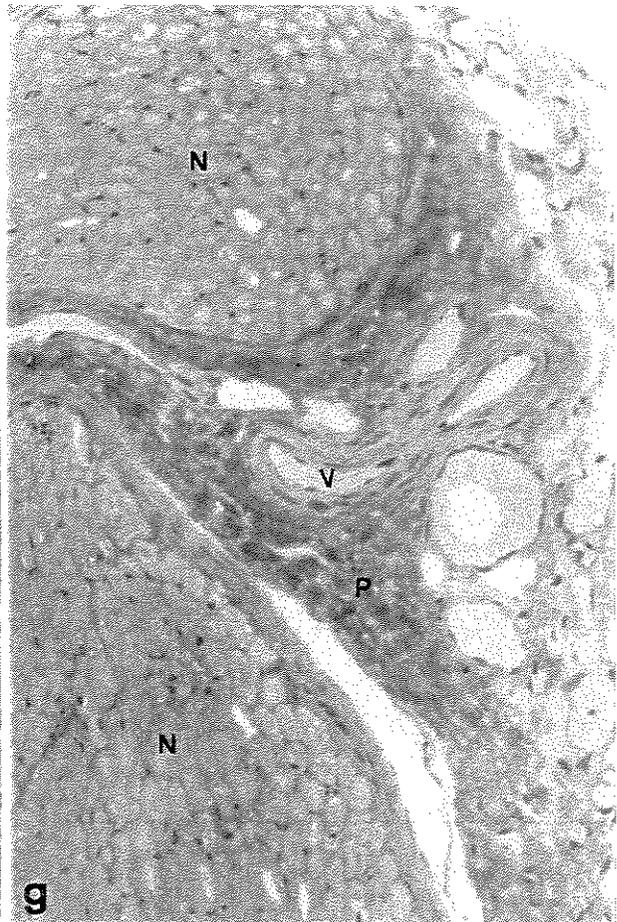
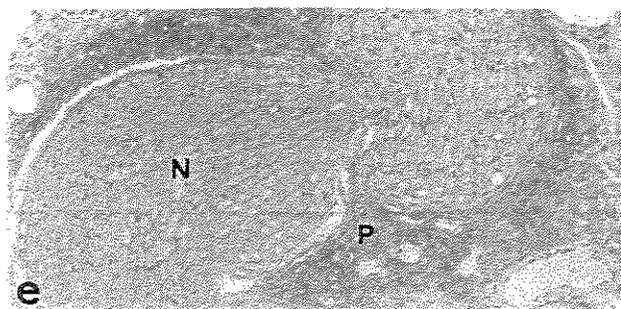
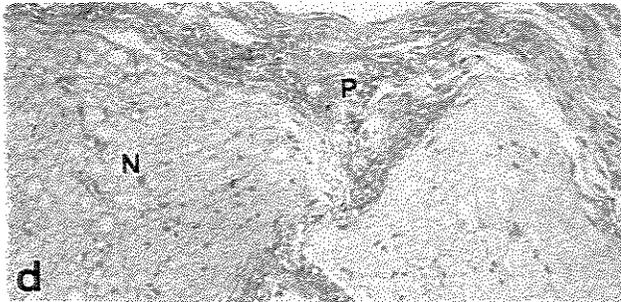
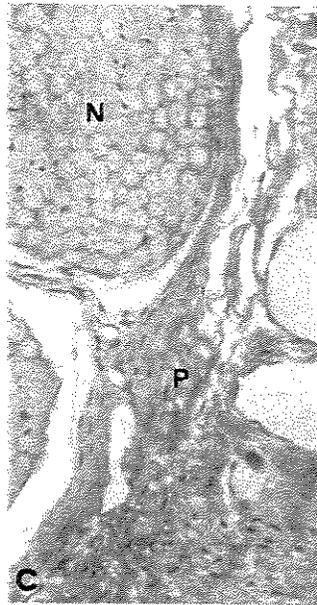
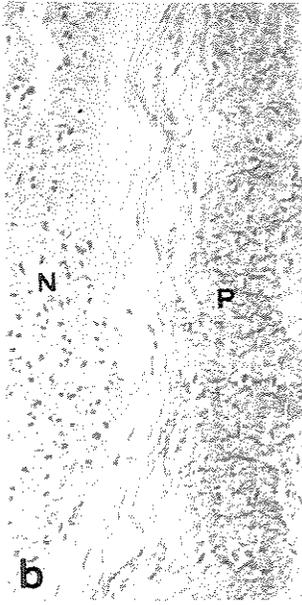
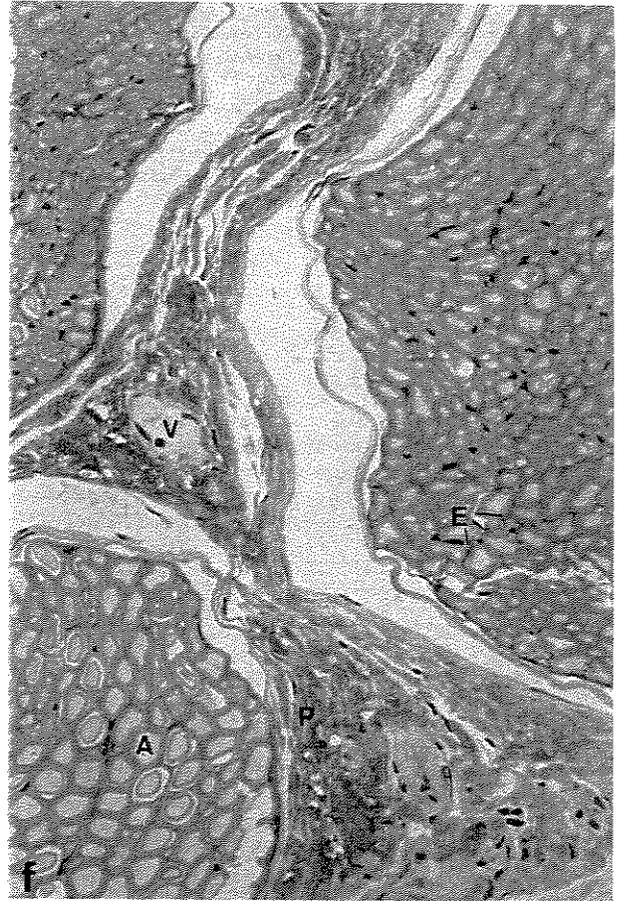
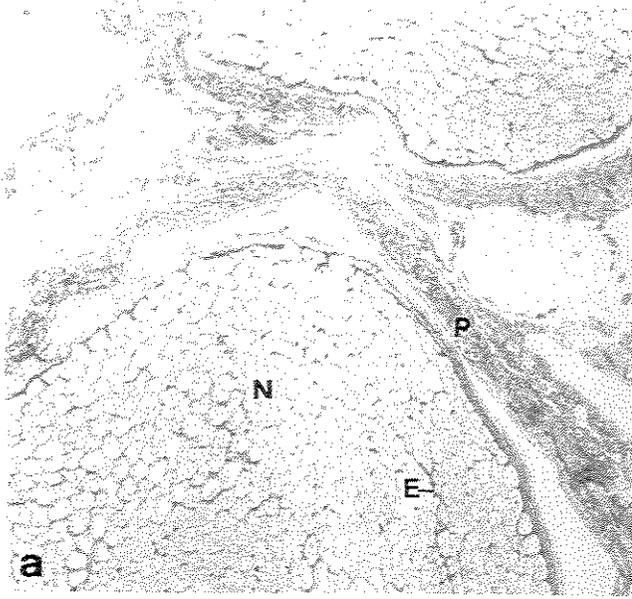


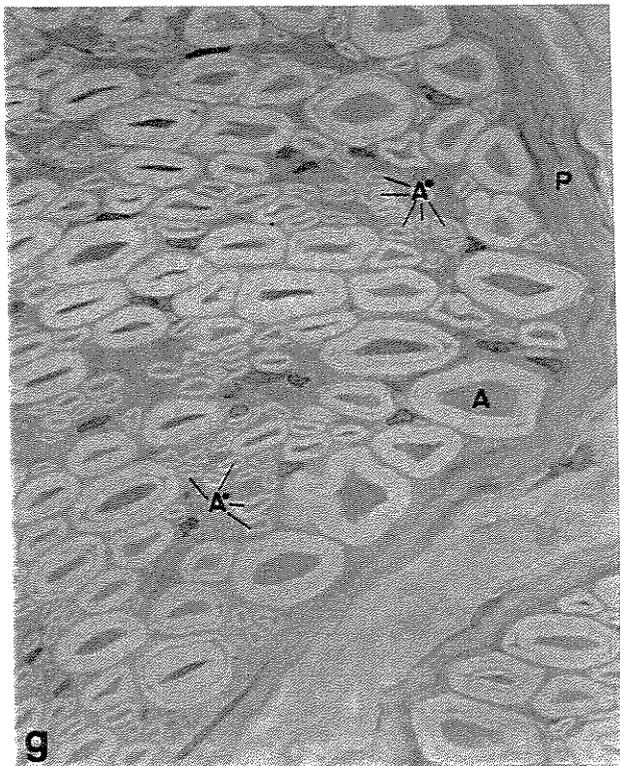
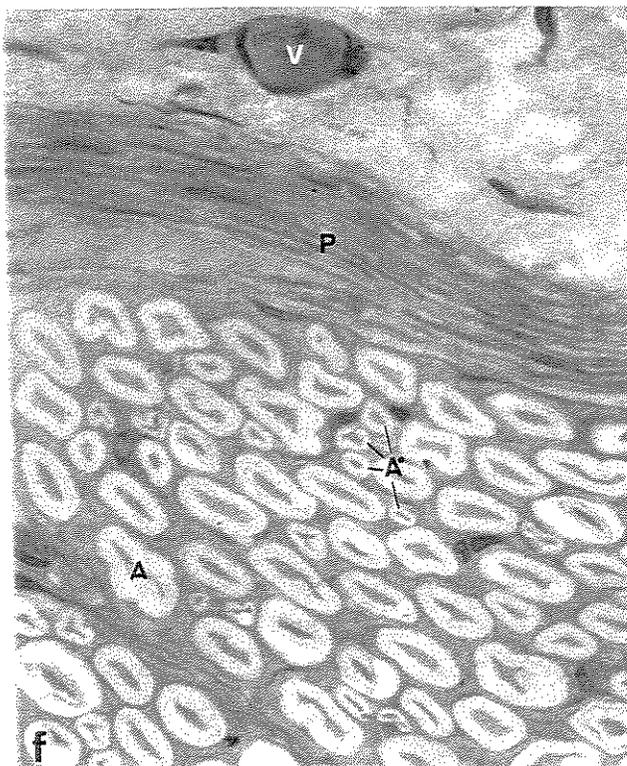
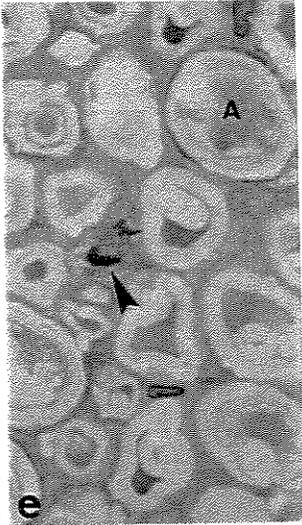
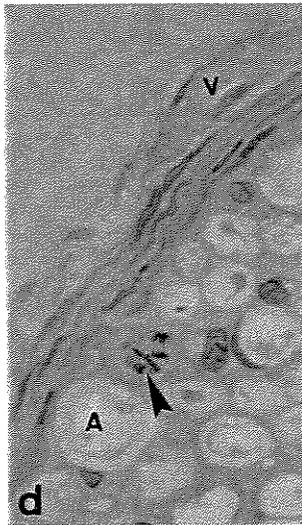
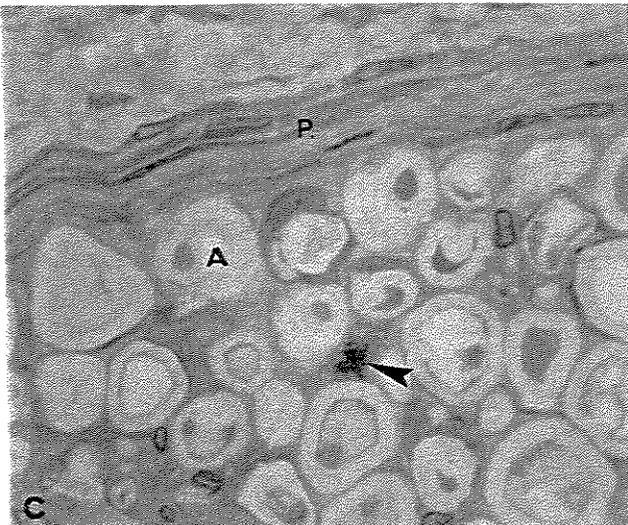
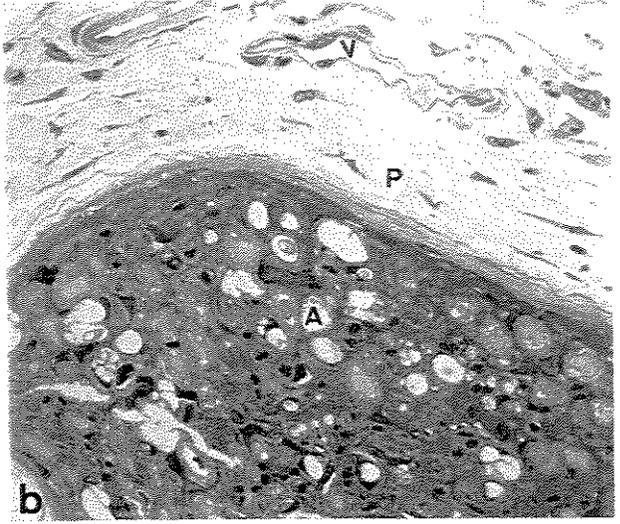
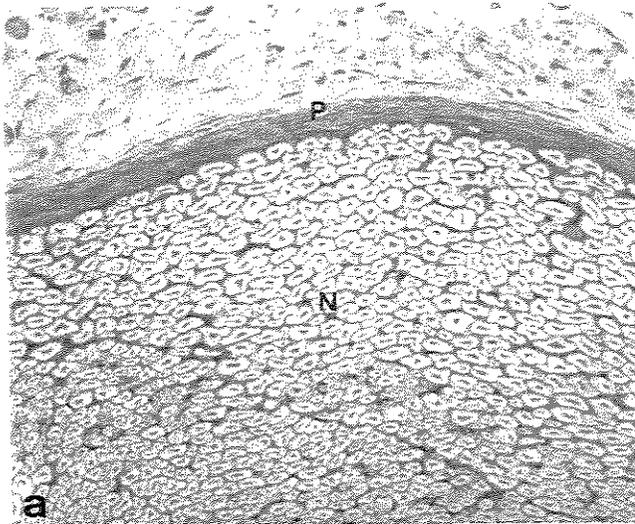












## DISCUSSÃO

No presente estudo procurou-se estabelecer as principais alterações histológicas decorrentes da injeção intrafascicular de anestésico local em nervos ciáticos de coelhos albinos. Este procedimento experimental simula eficientemente um acidente cirúrgico durante o procedimento de uma anestesia ou analgesia local e intrafascicular. Assim é interessante hipotetizar que tais respostas podem ocorrer quando da ocorrência destes acidentes em pacientes cirúrgicos.

### **As 48 horas iniciais após a injeção do anestésico: Processos inflamatórios agudos**

Evidenciou-se, histologicamente, que o grupo com injeção de anestésico local 48 horas após a injeção apresentou reação inflamatória com migração de macrófagos, eosinófilos, aumento da celularidade epineural e importante vacuolização do endoneuro com aumento da celularidade. Na região proximal à injeção a reação foi mais intensa, com pontos hemorrágicos e até mesmo destruição das camadas envoltórias dos nervos, mostrando que houve lesão mecânica local provavelmente devido à injeção; já no grupo com solução fisiológica, mesmo na região proximal, houve apenas uma leve reação inflamatória. Portanto local da injeção é fator de injúria tecidual a ser levado em conta como desencadeadora do processo inflamatório focal.

A análise dos dados, nas regiões mediana e distal, que não possuem influência direta da punção da agulha, nos permite estabelecer uma cinética dos eventos que podem estar acontecendo no nervo acometido pela injeção intrafascicular. Assim, primeiramente a reação inflamatória estabelecida na região perineural se difunde para a região endoneural, com aumento da permeabilidade vascular e conseqüente exsudação de elementos do plasma, causando um edema endoneural. Este processo leva a uma degeneração axonal (VOGEL & BOULDIN, 1994) e a uma conseqüente migração de monócitos, os quais são precursores de macrófagos (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1999). Nossos resultados mostram que os macrófagos estão abarrotados de vesículas de lipídios, que podem ser originadas de bainha de mielina. Isto sugere que estas células fazem a digestão da bainha de mielina excedente, oriunda da degeneração axonal.

Outro fator importante que pode ser levado em consideração é o aumento de leucócitos polimorfonucleares, principalmente os eosinófilos. Estas células que também tem papel de fagocitose, mas dos complexos antígeno-anticorpos (FANTONI & WARD, 1994), são atraídas para o local da reação inflamatória devido a um aumento da temperatura pelo conseqüente aumento do influxo sangüíneo e edema intraneural (BIGNOLD, 1995).

No final deste processo de inflamação aguda puderam ser detectados grandes vasos com pericitos, células mesenquimatosas indiferenciadas, que deverão ser ativadas na fase de regeneração neuronal, pois são tipos celulares responsáveis pelo suprimento fibroblástico e lipoblástico neste tecido (MARTINEZ-HERNANDEZ, 1994).

## **Os 7 dias após a injeção do anestésico: Proliferação celular, fibrose e regeneração axonal**

Os dados obtidos da análise do material após 7 dias da injeção intrafascicular de anestésico local, revela uma fibrose que é evidente tanto no perineuro quanto no epineuro. Os vasos encontram-se congestionados e em quantidade maior no epineuro e perineuro, sugerindo neovascularização. No endoneuro ainda existiam vacuolizações, mas os axônios e as fibras nervosas encontravam-se mais organizadas e em diferentes tamanhos mostrando células em mitose e grande quantidade de macrófagos, indicando, desta forma, que com 7 dias a fibrose está estabelecida mas que, em nível endoneural, as células estão regenerando.

O processo fibrótico sempre ocorre após uma reação inflamatória, entretanto, se não houver a regeneração das porções funcionais dos tecidos lesados forma-se a conhecida cicatriz (HAM & CORMACK, 1991). Nestes processos de fibrose e cicatrização a neovascularização é fator desencadeante da deposição de elementos do tecido conjuntivo, principalmente de matriz extracelular (MARTINEZ-HERNANDEZ, 1994).

Nossos resultados indicam que no nervo ciático de coelho não se estabelece um processo cicatricial, pois existe uma evidente regeneração dos axônios, que, aos 7 dias após a injeção intrafascicular podem ser observados em processo de mielinização.

Nesta fase do processo de regeneração neural muitas células de Schwann estão em franca proliferação celular. Sabe-se que este tipo celular do tecido nervoso periférico tem um papel fundamental na reabilitação funcional de neurônios degenerados por injúrias teciduais (VOGEL & BOULDIN, 1994). O primeiro passo neste processo é a proliferação mitótica e recobrimento da superfície lesada do axônio, para posterior mielinização. Este processo de recobrimento, deve ocorrer entre o terceiro e o sétimo dias, pois não pudemos detectar esta fase no nosso material em estudo.

### **Outros eventos associados à recuperação neuronal: Envolvimento de células do tecido conjuntivo**

Um aparente aumento na quantidade de células adiposas e suas precursoras, os lipoblastos, na região perineural foi detectado no material analisado com 7 dias após a injeção do anestésico, entretanto não se pode precisar o momento exato da proliferação lipoblástica e/ou diferenciação a partir dos pericitos. Entretanto pode-se aqui aventar uma hipótese para explicar o aumento destes tipos celulares no processo regenerativo do tecido neural.

A mielina metabolizada pelos macrófagos origina compostos lipogênicos, que podem estar sendo acumulados nos lipoblastos e conseqüentemente aumentando a demanda das células adiposas no tecido perineural. Estes compostos se acumulam na

periferia dos fascículos nervosos pois podem ser novamente recrutados no processo de regeneração neural. Este processo ocorreria com menos gasto energético, do que se houvesse necessidade de recrutamento de lipídios sistêmicos ou hepáticos.

Esta hipótese vai de encontro com os achados descritos por OUCHI *et al.* (1986), que detectou um aumento de componentes lipoblásticos e adiposos em nervo óptico atrófico, presente na Síndrome de Laurence-Moon-Biedl. Mesmo não aventando nenhuma hipótese, estes autores descrevem ser curioso o aumento de células adiposas nas proximidades de nervo degenerado.

### **Considerações finais**

O que reforça a proposta da neurotoxicidade dos anestésicos locais é que, utilizando-se de outros anestésicos locais que não a ropivacaína, PIZZOLATO & RENEGAR (1959), BARSA *et al.*, (1982) e MYERS *et al.*, (1986), também detectaram fenômenos de infiltração celular, com aumento de fibroblastos no epineuro, migração de eosinófilos e macrófagos, além de fibrose perineural e epineural estabelecida tardiamente, com aumento da vascularização nos dois compartimentos.

Os autores acima demonstram que as soluções de anestésicos locais aplicadas de maneira tópica, externamente aos feixes de fibras nervosas, alteram a permeabilidade do perineuro levando ao edema endoneural.

A maioria destes resultados foram obtidos 48 horas após a injeção-teste para serem observadas as alterações patológicas precoces, características da injúria neurotóxica, não observando-se as respostas de regeneração axonal e fibrótica que porventura pudessem ocorrer em fases mais adiantadas do processo.

Mudanças na permeabilidade da barreira hemato-neural foram relacionadas com o dano patológico da fibra nervosa periférica, incluindo injúria das células de Schwann e distrofia axonal. (MYERS *et al.*, 1986 ).

Os dados apresentados e as hipóteses levantadas no presente estudo demonstram a transitoriedade do efeito neurotóxico do anestésico ropivacína quando utilizado experimentalmente, à semelhança do que deve ocorrer nos acidentes cirúrgicos.

## CONCLUSÕES GERAIS

Os aspectos morfológicos aqui apresentados são de importância fundamental para comprovação da neurotoxicidade do anestésico local ropivacaína.

Os resultados da análise histológica, comparados a outros estudos de natureza clínica, vêm reforçar que a ropivacaína, como os outros anestésicos amino-amida já analisados em estudos anteriores, altera a estrutura do nervo quando injetada intrafascicularmente, ocorrendo inicialmente reação inflamatória e degeneração axonal e posterior fibrose neural. Entretanto, observou-se uma recuperação fascicular inicial e regeneração axonal 7 dias após a injeção intrafascicular do anestésico.

Quanto às alterações morfológicas que ocorrem com a exposição do nervo ao anestésico, investigações mais acuradas sobre a ultra-estrutura precisam ser feitas para evidenciar a possibilidade efetiva de toxicidade neural, que aqui neste trabalho parece ser transitória devido ao processo regenerativo estabelecido por volta do sétimo dia após a injeção intrafascicular da ropivacaína.

## RESUMO

Estudos experimentais indicam que os anestésicos locais são potencialmente neurotóxicos e a neurotoxicidade está diretamente relacionada com o poder anestésico da medicação. Entretanto poucas informações têm sido relatadas na literatura quanto aos aspectos histológicos dos nervos lesados. Assim, o objetivo do presente trabalho foi investigar o efeito da injeção intrafascicular do anestésico local ropivacaína sobre os nervos ciáticos de coelhos albinos, enfocando principalmente o envolvimento das membranas conjuntivas envoltórias no processo em estudo. Foram considerados 3 grupos experimentais de coelhos albinos adultos: *Grupo I*: nervos ciáticos controles (dois animais – 4 nervos); *Grupo II*: nervos ciáticos após a injeção intrafascicular de 0,2 mL de solução fisiológica no nervo esquerdo e após a injeção intrafascicular de 0,2 mL ropivacaína (Naropin – Astra) no nervo direito (nove animais – 18 nervos) com coleta dos espécimes após 48 horas da injeção; *Grupo III*: nervos ciáticos após a injeção intrafascicular de 0,2 mL de solução fisiológica no nervo esquerdo e após a injeção intrafascicular de 0,2 mL ropivacaína (Naropin – Astra) no nervo direito (nove animais – 18 nervos) com coleta dos espécimes após 7 dias da injeção. Os nervos depois de removidos foram processados para inclusão em historesina Leica e os cortes histológicos foram corados pela Hematoxilina-eosina, Azul de Toluidina ou Picrossírius-hematoxilina.

Os resultados indicam que a ropivacaína promove um efeito tóxico transitório no nervo, sendo que após 48 horas da injeção intrafascicular foram detectados focos de degeneração axonal e grandes infiltrados inflamatórios no endoneuro, perineuro e epineuro, com grandes quantidades de eosinófilos, polimorfonucleares e macrófagos. Após 7 dias da injeção intrafascicular do anestésico uma notável fibrose nas membranas epineurais e perineurais foi observada. Além disto um aumento significativo de lipoblastos e adipócitos na região perineural. A transitoriedade do processo neurotóxico pode ser demonstrada pelo fato de haver uma grande quantidade de nervos em regeneração aos 7 dias após a injeção intrafascicular.

## ABSTRACT

Persistent neurologic sequelae after central or peripheral nerve blockade with local anesthetics are rare, but in some cases a significant impact on the quality of life of the patients who suffer from such sequelae may occur. Experimental studies indicate that all local anesthetics are potentially neurotoxic and the neurotoxicity parallels their anesthetic potency. This study was undertaken to investigate the effects of ropivacaine (Naropin) after intrafascicular injection into the sciatic nerves of albino rabbits. Twenty adult albino rabbits were used, following sedation with intramuscular ketamine (50mg/Kg) for nerve exposure by lateral incision. We considered three experimental groups: *Group I*: sciatic nerve control (two animals – four sciatic nerves); *Group II*: intrafascicular injection with 0.2 mL of physiologic saline solution in the left nerves and intrafascicular injection with 0.2 mL of local anesthetic Naropin – Astra (Ropivacaine) into the right nerves. The specimens were collected at 48 h after drugs administration (nine animals – 18 sciatic nerves); *Group III*: intrafascicular injection with 0.2 mL of physiologic saline solution in the left nerves and intrafascicular injection with 0.2 mL of local anesthetic Naropin – Astra (Ropivacaine) in the right nerves. The specimens were collected at 7 days after drugs administration. (nine animals – 18 sciatic nerves) The sciatic nerves were removed from these animals and fixed in Karnowsky solution for 24 hours. After partial

dehydration up to 95% ethanol, they were embedded in historesin (Leica). The tissue was then sectioned at 1-2 $\mu$ m. Sections were stained with haematoxylin-eosin (HE); toluidine blue (TB) or picrosirius-haematoxylin (PSH). Comparing with control group the histological evidence of inflammatory reaction (migration of macrophagic cells and eosinophils – appeared soon after injection, with intense proliferation of perineurial cells. The results show that after 7 days of intrafascicular injection there was a severe fibrosis and an increase on perineurial vascularization. In group 2 the inflammatory reaction was noted near the local of the injection. Furthermore in this experiment we observed an increase on the number of epineurial lipoblasts and adipocytes. This study demonstrated that the toxic effects of ropivacaine are transient. In many cases there was an initial fascicular recover and axonal regeneration after 7 days of the injection.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASBURY, A. K. & JOHNSON, P.C. **Pathology of Peripheral Nerve**. Vol 9: Major problems of pathology, Phyladelphia , Saunders, 1978.
- BARSA, J.; BATRA, M.; FINK, B. R.; SUMI, S. M. A comparative in vivo study of local neurotoxicity of Lidocaine, Bupivacaine, 2-Chloroprocaine, and a mixture of 2Chloroprocaine and Bupivacaine. **Anesthesia and Analgesia** 61 : 961 – 967, 1982.
- BEHMER, O.A.; TOLOSA, E.M.C.; FREITAS-NETO, A.G. **Manual de técnicas para histologia normal e patológica**. EDART/EDUSP, SP., 329P.1976.
- BIGNOLD, L.P. The eosinophil leukocyte: controversies of recruitment and function. **Experientia**, **51**: 317-327. 1995.
- BILBAO, J.M.. Peripheral nerves. *In: Acherman's Surgical Pathology*. Ed. by Juan Rosai. Molsby, St Louis, USA. 8<sup>th</sup> ed. 2365-2397. 1995.
- CARVALHO, J.C.A. Farmacologia dos Anestésicos Locais. **Rev Bras Anesthesiol**, **44**: 75 – 82, 1994.
- COURTNEY, K.R. Mechanism of frequency-dependent inhibition of sodium currents in frog myelinated nerve by the lidocaine derivative GEA 968. **J Pharmacol Exp Ther.** : 195 – 225, 1987.

- COVINO, B.G.; VASSALO, H.G. Aspectos farmaco-cinéticos dos anestésicos locais. **Anestésicos Locais: Mecanismo de Ação e Uso Clínico**. Rio de Janeiro, Colina, : 131p., 1985.
- CRISTOPHERSON, R.; BEATTIE, C.; FRANK, S. M.; NORRIS, E. J.; MEINERT, C.L.; GOTTLIEB, S. O. Perioperative morbidity in patients randomized to epidural or general anesthesia for lower extremity vascular surgery. **Anesthesiology** 79(3) : 422 – 434, 1993.
- DAHLGREN, N. & TORNEBRANDT, K. Neurological complications after anaesthesia. A follow-up of 18 000 spinal and epidural anaesthetics performed over three years. **Acta Anesthesiol Scand** 39 : 872 – 880, 1995.
- EKËNSTRAM, B.A F.; EGNER, B.; PETTERSSON, G. N-alkil pyrrolidine and N-Alkil piperidine carboxylic acid amides. **Acta Anesthesiol Scand** 11 : 1183 - 90, 1957.
- FANTONI, J.C. & WARD, P.A. Inflammation. *In*: E. Rubin and J.L. Farber ed. **Pathology**, 2ed., J.B. Lippincott, Philadelphia, p. 33-66. 1994.
- GLAUERT, A.M. Fixation, dehydration and embedding of biological specimens. *In*: A. M. Glauert ed. **Practical methods in electron microscopy**. North Holland Publis., 3 ed. 207p. 1975.
- HAM, A. & CORMACK, D. H. – **Histologia**. 9<sup>a</sup> ed., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 570p., 1991.

- JUNQUEIRA, L.C.U.; BIGNOLAS, G.; BRENTANI, R. Picrossirius staining plus polarization microscopy, specific method of collagen detection in tissue section. **J. Histochem.**, 11:447-455. 1979.
- JUNQUEIRA, L.C.U. & CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 9<sup>a</sup> ed., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 427p., 1999.
- KATZ, J.; SIDNEY J. ; AIDINI, S. Current Concepts Review – Complications of Spinal and Epidural Anesthesia. **The Journal of Bone and Joint Surgery** 62<sup>A</sup>, 1980.
- KENNETH, D., M. D.; SHINICHI, S.; VINCENT, W.; S.CHAN; ANDREW, W. BOLLEN & CIRIALES, R. Persistent Sacral Sensory Deficit Induced by Intrathecal Local Anesthetic Infusion in the rat. **Anesthesiology** 80: 847 – 852, 1994.
- McCLURE, J. H. Ropivacaine Review Article. **Br. J. Anaesthesiol.**, 76: 300 – 307, 1996.
- MARTINEZ-HERNANDEZ, A. Repair, regeneration and fibrosis. *In*: E. Rubin and J.L. Farber ed. **Pathology**, 2ed., J.B. Lippincott, Philadelphia, p. 69-141. 1994.
- MARKHAM, A.& FAULDS, D. Ropivacaine : A Review of its Pharmacology and Therapeutic Use in Regional Anaesthesia. **Adis International Limited** : Auckland, New Zeland, 1996.
- MELLO, M.L.S. & VIDAL, B.C. **Práticas de Biologia Celular**. Edgard Blücher-

Funcamp. 71p. 1980.

MYERS, R. R.; KALICHMANN, M. W.; REISNER, L.S.; POWELL, H.C.

Neurotoxicity of local anesthetics : Altered perineurial permeability, edema, and nerve fiber injury. **Anesthesiology** 64 : 29 –35, 1986.

NÓBREGA, M. L.; CARVALHO, J. C. A. ; TEIXEIRA, M. J.; OLIVEIRA

JUNIOR, J. O. – Sequela Neurológica após injeção Peridural de Contraste Radiológico. **Rev Bras Anest.** 40 : 287 – 288, 1990.

ORTIZ-HIDALGO, C. & WELLER, R. O. Peripheral Nervous System. *In:*

**Histology for Pathologists** ed. by Stephen S. Sternberg. Raven Press, Ltd. : New York , 1992.

OOCHI, N.; RIKITAKE, O.; MAEDA, T.; YAMAGUSHI, M. A case of Laurence-

Moon-Biedl syndrome associated with bilateral adrenal lipomas and renal abnormalities. **Nippon Naika Gakkai Zsshi**, 73: 89-93. 1984.

PIZZOLATO, P.; RENEGAR, O. J. Histopathologic effects of long exposure to

local anesthetics on peripheral nerves. **Anesthesia and Analgesia**, 38(2): 138 – 141, 1959.

ROSS, M.H. REITH, E.J.; ROMRELL, L.J. **Histologia - Texto e Atlas**. 2<sup>o</sup> ed.,

Panamericana, Rio de Janeiro, 779p., 1993.

SELANDER , D.A.G. Neurotoxicity of local Anesthetics: Animal Data. **Regional**

**Anesthesia** 18 : 461 – 468, 1993.

SHANTAVEERAPPA, T.R. & BOURNE, G.H. Perineurial epithelium - a new concept of its role in the integrity of peripheral nervous system. **Science**, **154**: 1464-1467. 1966.

SIMONETTI, M.P.B. Ropivacaína: Estado atual e perspectivas futuras. **Revista Bras Anesthesiol** ., **45**: 131 – 140, 1995.

STERNBERG, S.S. **Histology for Pathologists**. Raven Press, Ltd., 3ed. NY, 1992.

VOGEL, F.S. & BOULDIN, T.W. The nervous system. *In*: E. Rubin and J.L. Farber ed. **Pathology**, 2ed., J.B. Lippincott, Philadelphia, p. 1373-1455 1994.