

UNIVERSIDADE SAGRADO CORAÇÃO

THAIS CAROLINE PEREIRA DOS SANTOS

**EFEITO DO EXERCÍCIO FÍSICO E ELETROESTIMULAÇÃO
EM NERVOS PERIFÉRICOS APÓS NEURORRAFIA
TÉRMINO-LATERAL DO NERVO FIBULAR EM RATOS**

BAURU

2014

THAIS CAROLINE PEREIRA DOS SANTOS

**EFEITO DO EXERCÍCIO FÍSICO E ELETROESTIMULAÇÃO
EM NERVOS PERIFÉRICOS APÓS NEURORRAFIA
TÉRMINO-LATERAL DO NERVO FIBULAR EM RATOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Centro de Ciências da Saúde como parte dos requisitos para obtenção do título de bacharel em Biomedicina, sob orientação do Professor Dr. Geraldo Marco Rosa Junior.

BAURU

2014

Santos, Thais Caroline Pereira dos.

S2377e

Efeito do exercício físico e eletroestimulação em nervos periféricos após neurraxia término-lateral do nervo fibular em ratos / Thais Caroline Pereira dos Santos -- 2014.

53f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Geraldo Marco Rosa Junior.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina)
– Universidade do Sagrado Coração – Bauru – SP.

1. Neurraxia. 2. Eletroestimulação. 3. Exercício de natação.
4. Cirurgia experimental. 5. Atrofia muscular. I. Rosa Junior,
Geraldo Marco. II. Título.

THAIS CAROLINE PEREIRA DOS SANTOS

**EFEITO DO EXERCÍCIO FÍSICO E ELETROESTIMULAÇÃO
EM NERVOS PERIFÉRICOS APÓS NEURORRAFIA
TÉRMINO-LATERAL DO NERVO FIBULAR EM RATOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Centro de Ciências da Saúde da Universidade do Sagrado Coração como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Biomedicina sob orientação do Prof. Dr. Geraldo Marco Rosa Junior.

Banca examinadora:

Prof. Dr. Geraldo Marco Rosa Junior
Universidade do Sagrado Coração

Prof. Me. Carlos Henrique Fachin Bortoluci
Universidade do Sagrado Coração

Prof. Me. Luis Henrique Simionato
Universidade do Sagrado Coração

Bauru, 03 de Dezembro de 2014.

Dedico este trabalho a minha família.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por mais esse sonho concretizado, por iluminar e abençoar minha trajetória.

Agradeço meus queridos pais, Rita de Cássia Chinalli dos Santos e Jurandir Pereira dos Santos, pois são eles os responsáveis por eu ter chegado até aqui. Agradeço pelo apoio, por acreditarem no meu sonho e potencial, e por terem me ensinado valores tão preciosos. Amo demais vocês!

Ao meu irmão, Thiago William Pereira dos Santos, que sempre acreditou em mim. Te amo!

Ao meu namorado, Renan Caride, pacientemente sempre me dando conselhos, força, coragem e incentivo. Te amo!

Ao meu querido orientador Prof. Dr. Geraldo Marco Rosa Junior, por toda paciência e dedicação. Suas atitudes, ensinamentos, exemplos e incentivo colaboraram para que eu fosse além dos meus limites e medos. Não poderia deixar de agradecer os professores Carlos Henrique Fachin Bortoluci e Luis Henrique Simionato, esses três juntos me mostraram que os melhores mestres não são os que nos ensinam as respostas, mas, sim, aqueles que ensinam a questionar, a duvidar, a pensar e a sonhar. Muito obrigada por tudo!

Ao grupo de estudos GEIM, especialmente meus queridos amigos Alessandro Heubel, Juliana Brunetto, Marcella Nicolini Furtado e Tamara Carvalho que junto os professores Geraldo, Carlão e Luisão, formamos a família GEIM TOP. Obrigada por todas as manhãs maravilhosas que passamos juntos, as férias e feriados de muito trabalho e diversão, por nossa amizade, nossos trabalhos e nossas loucuras. Muito obrigada por tudo! Amo vocês.

As minhas amigas queridas que conquistei durante esses anos, Beatriz Pereira Cestari, Livia de Luca Damada, Maria Luisa Soriani e Thaisa Rosa de Jesus, que com elas pude dividir angústias, tristezas, alegrias e vitórias. Obrigada por fazerem parte da minha vida! Amo vocês!

A Universidade Sagrado Coração, a todos os professores do curso, que foram importantes na minha vida acadêmica e na minha formação profissional.

E a todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, que de alguma forma ajudaram, obrigada.

“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos.” (Isaac Newton)

RESUMO

Lesões de nervos periféricos podem ser extremamente incapacitantes. Nesse contexto, a microcirurgia vem apresentando um papel fundamental no prognóstico dos pacientes. Entretanto, mesmo com todo refinamento técnico obtido com a microcirurgia, ainda não se obtém total recuperação motora. Tal fato se justifica pela degeneração muscular, atrofia e perdas funcionais geradas pela desnervação. Em âmbito clínico, alguns recursos fisioterapêuticos têm sido sugeridos na tentativa de minimizar as perdas decorrentes do quadro de desnervação. Dentre esses recursos, destacam-se a eletroestimulação e o exercício físico. A utilização da eletroestimulação é justificada por esta ser capaz de minimizar a atrofia durante a desnervação. De maneira diferente, a aplicação do exercício tem como principal justificativa o estímulo na produção de fatores neurotróficos, fato este que poderia potencializar a regeneração axonal e, por conseguinte, promover uma melhor reinervação. Todavia, tanto para aplicação da eletroestimulação quanto para execução do exercício físico, existem algumas controvérsias no que tange os parâmetros utilizados. Portanto, o objetivo desse trabalho é analisar a eficiência da eletroestimulação, do exercício de natação, e da associação entre os dois recursos, na possível regeneração nervosa após neurografia término-lateral do nervo fibular. Para a realização do experimento, os animais serão divididos em 3 grupos controles G1 e G3 (n=10), G2 (n=12) e 3 grupos experimentais (G4, G5, G6) com n=12. Os animais dos grupos experimentais passarão por um protocolo de eletroestimulação, pelo exercício de natação e pela associação entre eletroestimulação e natação. Os resultados obtidos passarão por análise estatística e serão avaliados conforme a repercussão que os mesmos provocarão na comunidade científica após disseminação em artigos e eventos científicos que possibilitem esta prática.

Palavras-Chave: Neurografia término-lateral. Eletroestimulação. Exercício de natação. Cirurgia experimental. Atrofia muscular.

ABSTRACT

Peripheral nerve injuries can be extremely disabling. In this context, microsurgery has shown a fundamental role in the prognosis of patients. However, even with all technical refinement obtained with microsurgery, still not get full motor recovery. This fact is justified by muscle degeneration, atrophy and functional losses caused by denervation. In the clinical setting, some physiotherapy resources have been suggested in an attempt to minimize losses from the frame denervation. Among these features stand out electrical stimulation and physical exercise. The use of electrical stimulation is justified by this being able to minimize atrophy during denervation. Differently, the application of exercise is the main justification stimulus in the production of neurotrophic factors, a fact that could enhance axonal regeneration, and next, promote better reinnervation. However, both for application of electrical stimulation and for execution of the exercise there are some controversies regarding the parameters used. Therefore, the aim of this paper is to analyze the efficiency of electrical stimulation, the swimming exercise, and the association between the two resources in possible regeneration after end-to-side neurorrhaphy. For the experiment, the animals will be divided into three groups G1 and G3 controls (n = 10), G2 (n = 12) and three experimental groups (G4 , G5 , G6) with n = 12 . The animals of the experimental groups will undergo a protocol of electrical stimulation, by swimming exercise and the association between electrostimulation and swimming. The results obtained by statistical analysis and will be assessed according to the impact that they provoke within the scientific community after dissemination in scientific articles and events that allow this practice.

Keywords: end-to-side neurorrhaphy. Electrostimulation. Swimming exercise. Experimental surgery. Muscle atrophy.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Esquema representativo das cirurgias nos grupos.....	17
Figura 2 – Ramos do nervo isquiático.....	19
Figura 3 – Exercício de natação realizado em tanque cilíndrico.....	19
Figura 4 – Aparelho utilizado para estimulação elétrica.....	20
Figura 5 – Cápsula metálica com o animal dentro e eletrodos posicionados sobre o ventre do músculo tibial cranial.....	21
Figura 6 – Eletromiógrafo da marca Sapphire II 4ME utilizado para as análises.....	23
Figura 7 - Sistema de análise de imagem - Micro computador com o software de captura e análise de imagem, acoplado ao microscópio Leica DMLS.....	24
Figura 8 – Análise morfométrica.....	25
Figura 9 – Gráfico com as médias obtidas pela análise de marcha.....	27
Figura 10 – Gráfico da média da amplitude (mV).....	28
Figura 11 - Gráfico da média da latência (ms).....	29
Figura 12 – Gráfico da média de força muscular (N).....	30
Figura 13 – Gráfico da média (μm^2) da área das fibras nervosas.....	32
Figura 14 – Gráfico da Média (μm) do diâmetro das fibras nervosas.....	32
Figura 15 – Gráfico da média (μm^2) das áreas dos axônios.....	34
Figura 16 – Gráfico da média (μm) do diâmetro dos axônios.....	34
Figura 17 – Gráfico da média (μm^2) das áreas das bainhas de mielina.....	36
Figura 18 – Gráfico da média (μm) das espessuras das bainhas de mielina.....	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Média e desvio padrão da análise funcional da marcha.....	26
Tabela 2 - Média e desvio padrão da amplitude (mV) e latência (ms) captada pela análise eletrofisiológica.....	28
Tabela 3 - Média e desvio padrão da força muscular (N) captada pelo transdutor.....	30
Tabela 4 – Média (μm^2) e desvio padrão da área das fibras nervosas e média (μm) e desvio padrão do diâmetro menor das fibras nervosas.....	31
Tabela 5 – Média (μm^2) e desvio padrão da área dos axônios e média (μm) e desvio padrão do diâmetro menor dos axônios.....	33
Tabela 6 – Média (μm^2) e desvio padrão das áreas das bainhas de mielina e média (μm) e desvio padrão das espessuras das bainhas de mielina.....	35

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 OBJETIVOS	15
2.1 OBJETIVO GERAL.....	15
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
3 MATERIAIS E MÉTODOS	16
3.4 EXERCÍCIO DE NATAÇÃO	19
3.5 ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA.....	20
3.6 ANÁLISE FUNCIONAL DA MARCHA.....	22
3.7 ANÁLISE ELETROFISIOLÓGICA.....	22
3.8 FORÇA MUSCULAR	23
3.9 COLETA DOS NERVOS E EUTANÁSIA.....	24
3.10 PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO DOS NERVOS.....	24
3.11 ANÁLISE MORFOMÉTRICA.....	24
3.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA	26
4 RESULTADOS	27
5 DISCUSSÃO	38
5.1 MÉTODOS.....	38
5.2 ANÁLISE FUNCIONAL DA MARCHA	39
5.3 ANÁLISE ELETROFISIOLÓGICA.....	41
5.4 ANÁLISE DA FORÇA MUSCULAR	41
5.5 ANÁLISE MORFOMÉTRICA.....	42
REFERÊNCIAS	45

1 INTRODUÇÃO

Os nervos periféricos, assim como os demais tecidos do organismo, estão susceptíveis a doenças inflamatórias, traumáticas, metabólicas, tóxicas, genéticas e neoplásicas (GIROLAMI et al., 2000). Estas doenças levam a diferentes tipos e graus de lesões (POLITIS et al., 1982; LUNDBORG et al., 1986; VITERBO; FALEIROS, 2002). De acordo com Deumens et al. (2010), o tipo de lesão nervosa periférica de pior prognóstico é a neurotmeose (grau V), na qual ocorre transecção completa do tronco nervoso, havendo necessidade de religamento dos cotos proximal e distal por meio de cirurgia.

Atualmente, a técnica cirúrgica mais difundida na reparação de nervos periféricos é a neurorrafia término-terminal. Nesse tipo de cirurgia, os cotos proximal e distal devem apresentar-se visíveis e íntegros, sem perda de tecido, para que estes sejam religados novamente. No entanto, em algumas situações específicas, o coto proximal do nervo lesado é perdido, permanecendo apenas o coto distal, sendo inviável a execução cirúrgica término-terminal. Nesse caso, a opção pela neurorrafia término-lateral (VITERBO, 1994) parece ser a melhor forma de tratamento, visto que não há necessidade de enxerto nervoso e, conseqüentemente, o sacrifício de um nervo doador.

A neurorrafia término-lateral consiste na coaptação do coto distal lesionado em um nervo doador intacto adjacente. A partir de então, os axônios presentes no nervo doador emitem ramos, em um processo denominado brotamento colateral (MARTIN et al., 2000; KOVACIC et al., 2007; RAY; MACKINNON, 2009; YU et al., 2011),havendo entrada dos novos axônios no nervo coaptado, por onde estes irão crescer até que atinjam a estrutura-alvo.

Os eventos que permitem o brotamento colateral ainda são estudados, entretanto, sabe-se que os fatores neurotróficos, secretados pelo músculo desnervado, o segmento distal do nervo degenerado e os corpúsculos sensoriais, podem induzir o brotamento axonal (ZHANG et al., 1999). Nesse sentido, McCallister et al. (2001) verificaram que a combinação de fatores, como o NGF (do inglês, *nerve growth factor*) e o CNTF (do inglês, *ciliary neurotrophic factor*),é capaz de estimular a regeneração axonal em ratos submetidos a neurorrafia término-lateral.

Apesar de alguns estudos demonstrarem resultados satisfatórios com relação à neurorrafia término-lateral, outros resultados ainda apresentam controvérsias (BERTELLI et al., 1996; BERTELLI; GHIZONI, 2003; PONDAAG; GILBERT, 2008).

Por isso, diante dessa divergência de evidências, a neurografia término-lateral é sugerida como opção em situações clínicas específicas, ou seja, nos casos em que o segmento proximal do tronco nervoso lesionado não esteja disponível (LUNDBORG, 2000; LUNDBORG, 1994).

Entretanto, mesmo com todo o refinamento técnico obtido com a microcirurgia e por melhor que tenha sido realizada a reparação do nervo lesionado, ainda não se obtém total recuperação motora (SUNDERLAND, 1985). Tal fato se justifica pelo período de desnervação parcial, em que ocorrerá atrofia da musculatura, promovendo prejuízo funcional para o músculo dependente dessa inervação (ROMÃO et al., 2007; STARKEY, 2001; LOW; REED 2001; ROBINSON; SNYDER-MACKLER, 2001).

Sob uma óptica ultraestrutural, além da atrofia das fibras musculares, o processo de desnervação resulta na redução na área de secção transversa da fibra muscular e a transição de todas as fibras, independente de sua morfologia anterior, para fibras do tipo rápida (FITTS et al., 2000). Ademais, após longo período de desnervação, evidencia-se uma invasão de células adiposas no tecido muscular (RODRIGUES et al., 2007), com conseqüente apoptose das fibras musculares (DAVATZ et al., 2007).

Nesse contexto, levando em consideração todos os prejuízos causados pela desnervação, diversos recursos fisioterapêuticos têm sido propostos com objetivo de acelerar o processo regenerativo, ou mesmo minimizar as perdas funcionais e estruturais.

A eletroestimulação, considerada um importante recurso fisioterapêutico, tem sido sugerida no tratamento de lesões nervosas periféricas com objetivo de retardar a atrofia muscular, mantendo assim a sua funcionalidade. Pesquisadores têm demonstrado que a eletroestimulação é capaz de controlar a expressão de fatores apoptóticos, como o gene BAX e Bcl-2, e que este fato estaria relacionado a redução da atrofia muscular durante o período de desnervação e reinervação (LIM; HAN, 2010).

Outra justificativa para utilização da eletroestimulação é que, além de diminuir a taxa de apoptose, esta poderia estimular a proliferação de células satélites das fibras musculares em desuso (ZHANG et al., 2010; GUO et al., 2012), evento considerado determinante para regeneração muscular (CHARGE; RUDNICKI, 2004; KARALAKI et al., 2009).

As investigações sobre o uso da eletroestimulação com finalidade regenerativa são extensas, porém os procedimentos utilizados ainda são controversos. Portanto, não há consenso quanto à intensidade, frequência, duração e métodos de avaliação utilizados. Vários autores, como Tagami et al. (2009), observaram que a regeneração neuromuscular durante a aplicação de eletroestimulação acontece de forma benéfica e sem prejuízos funcionais, tanto em ratos (NEMETH, 1982; KANAYA; TAJIMA, 1992; WILLIAMS, 1996; IÑIGO, 1998; GORDON et al., 2009; MACIEL et al., 2013) como em humanos (NICOLAIDS; WILLIAMS, 2001; MODLIN et al., 2005). Em contrapartida, outros pesquisadores afirmam que a aplicação da eletroestimulação pode ser nociva (SOUZA et al., 2001; KOTWAL; SCHMIDT, 2001; CARVALHO et al., 2002), podendo acelerar a atrofia muscular (GIGO-BENATO et al., 2010).

Além da eletroestimulação, outro recurso bastante utilizado na reabilitação de lesões nervosas periféricas é o exercício físico. Vários autores justificam a utilização de exercícios físicos pela liberação de fatores de crescimento que poderiam auxiliar a regeneração nervosa periférica, entre eles o BDNF (do inglês *brain-derived neurotrophic factor*), considerado um dos mais importantes fatores, pois atua na mediação da plasticidade neuronal (GOMEZ-PINILLA et al., 2002; MOLTENI et al., 2004; YARROW et al., 2010; ZOLADZ et al., 2008).

Os benefícios da prática do exercício, como o maior brotamento e prolongamento dos axônios (SABATIER et al., 2008), o aumento no número de fibras mielinizadas (ILHA et al., 2008; UDINA et al., 2011a) e a melhora na recuperação funcional do membro lesionado (COBIANCHI et al., 2010; MARQUESTE et al., 2004; VAN MEETEREN et al., 1997) têm sido descritos em diversos experimentos com animais desnervados, todavia, as indicações quanto ao tipo de atividade bem como a duração (volume) e a intensidade do exercício tem causado grandes discussões na comunidade científica (UDINA et al., 2011b).

A natação é considerada um dos ergômetros mais utilizados em pesquisas, com a finalidade de se estudar os efeitos do exercício em âmbito experimental. Segundo Gobatto et al. (2001), esse tipo de exercício possui diversas vantagens, principalmente devido a desnecessidade da seleção de animais, já que todos possuem habilidade inata de nadar. Embora sejam poucos os estudos que investigaram a influência da natação sobre a regeneração nervosa periférica, os

resultados destes mostraram-se positivos (TEODORI et al., 2011), ou mesmo não interferiram no processo regenerativo (OLIVEIRA et al., 2008).

Considerando esse vasto universo de possibilidades terapêuticas, questiona-se se a eletroestimulação e o exercício físico teriam capacidade de melhorar a recuperação do músculo após neurorrafia término-lateral. Nesse sentido, esta pesquisa busca fornecer subsídios para a discussão da prática clínica, podendo assim, apontar um novo rumo no tratamento de lesões nervosas periféricas reinervadas por meio da neurorrafia término-lateral.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar o efeito da eletroestimulação, do exercício físico e da associação entre os protocolos, sobre os aspectos morfológicos, morfométricos e funcionais de nervos periféricos após neurraxia término-lateral do nervo fibular.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Comparar os resultados obtidos da eletroestimulação com os resultados do exercício e da associação entre os dois protocolos em nível morfológico, morfométrico e funcional do nervo fibular.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados 68 ratos machos da linhagem Wistar, pesando entre 200 e 250 gramas, com aproximadamente três meses de idade, provenientes do Biotério da Universidade do Sagrado Coração (USC). Os animais foram mantidos em caixas apropriadas (quatro animais por caixa) recebendo água e ração “*ad libitum*”, respeitando ciclos de 12 horas de luz, em temperatura média de 24°C. O rato foi escolhido para este estudo devido ao fato que essa espécie, em especial o macho, é o mais usado na investigação de reparo de nervos periféricos.

O presente estudo obteve aprovação da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA), da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB-UNESP), sob protocolo 967/2012.

3.2 Delineamento dos grupos

Os 68 animais foram aleatoriamente distribuídos em seis grupos, constituídos da seguinte forma:

1. Grupo Controle Final (GCF): Constituído por 10 animais. Os animais não passaram por nenhum tipo de intervenção (FIGURA 1 – A).

2. Grupo Desnervado (GD): Constituído por 10 animais. Os animais passaram por procedimento cirúrgico de desnervação (FIGURA 1 – B) e não foram submetidos a nenhum tipo de tratamento. Para a desnervação, o nervo fibular foi seccionado, o coto proximal foi transpassado por uma incisão na musculatura glútea e suturado em sua porção externa a fim de impedir reinervação motora. O coto distal foi suturado na tela subcutânea.

3. Grupo Neurorrafia Término-Lateral (GNL): Constituído por 12 animais. Os animais passaram por procedimento cirúrgico para realização da neurorrafia

término-lateral (FIGURA 1 – C). Para isso, o nervo fibular foi seccionado e seu coto proximal encurvado medialmente, transfixando o músculo adutor, sendo suturado na face superficial desse músculo, impedindo a regeneração espontânea. O coto distal do nervo fibular foi encurvado e suturado lateralmente ao nervo tibial, com fio monofilamentar de náilon 10-0, a partir de dois pontos simples.

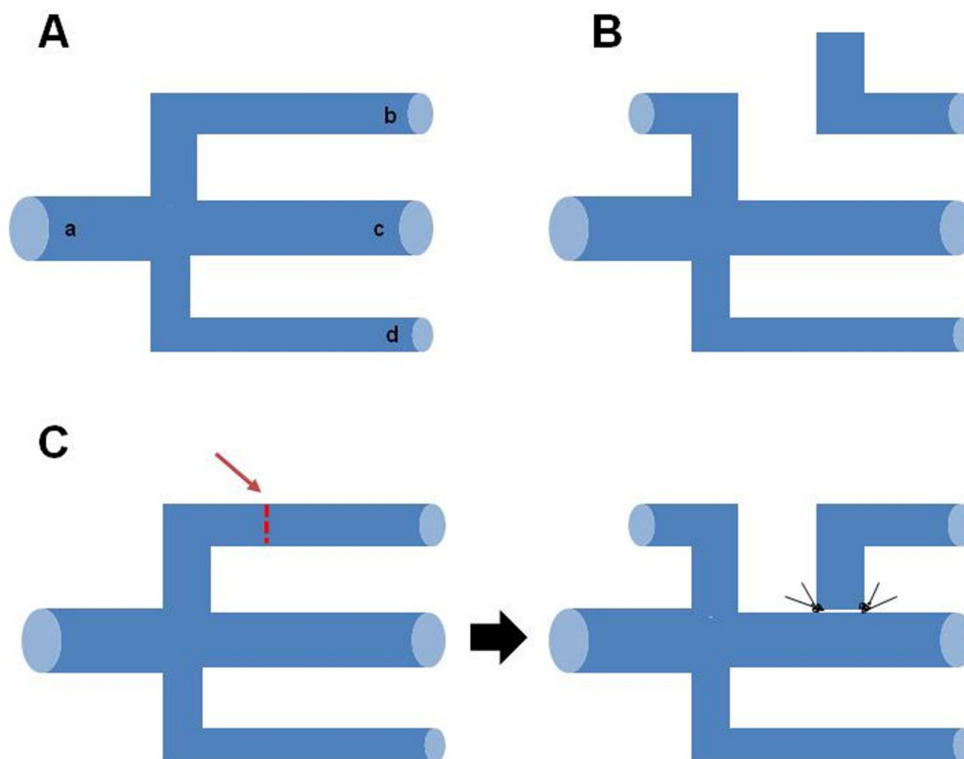


Figura 1 – Esquema representativo das cirurgias nos grupos. A- GCF; B- GD; C- GNTL, GNTL+EE, GNTL+N e GNTL+EE+E. Seta vermelha representa o local da transecção no nervo fibular comum; a = nervo isquiático, b = nervo fibular comum, c = nervo tibial, e d = nervo sural.

4. Grupo Neurorrafia Término-Lateral + Estimulação Elétrica

(GNTL+EE): Constituído por 12 animais. Os animais passaram por procedimento cirúrgico para realização da neurorrafia (FIGURA 1 – C), com aplicação de estimulação elétrica nos três meses subsequentes.

5. Grupo Neurorrafia Término-Lateral + Natação (GNTL+N): Constituído por 12 animais. Os animais passaram por procedimento cirúrgico para realização da neurorrafia (FIGURA 1 – C) e foram submetidos a um protocolo de exercício de natação nos três meses subseqüentes.

6. Grupo Neurorrafia Término-Lateral + Estimulação Elétrica + Natação (GNTL+EE+N): Constituído por 12 animais. Os animais passaram por procedimento cirúrgico para realização da neurorrafia (FIGURA 1 – C) e foram submetidos a um protocolo de estimulação elétrica e exercício de natação.

3.3 Procedimento cirúrgico

Os animais foram pesados e submetidos à anestesia geral através de injeção intramuscular de Cloridrato de Tiletamina, associado com Cloridrato de Zolazepam (50 mg / Kg) na região dorso lateral do membro pélvico esquerdo. Por conseguinte, foi realizada a tricotomia da face dorso-lateral do membro pélvico direito.

Anestesiados, os animais foram posicionados em decúbito ventral sobre placa de cortiça. O membro pélvico direito foi fixado com fita adesiva, para que então fosse efetuada uma incisão longitudinal na face dorso-lateral. A pele e a tela subcutânea foram rebatidas e os músculos suprajacentes divulsionados para exposição do nervo isquiático e seus respectivos ramos, nesse caso, os nervos fibular comum, tibial e sural (FIGURA 2).

A incisão foi suturada por meio de ponto simples, com fio monofilamentar de náilon 5-0. Concluída a cirurgia, os animais receberam dose de 25mg/Kg de dipirona sódica, por via subcutânea, duas vezes ao dia, por três dias.

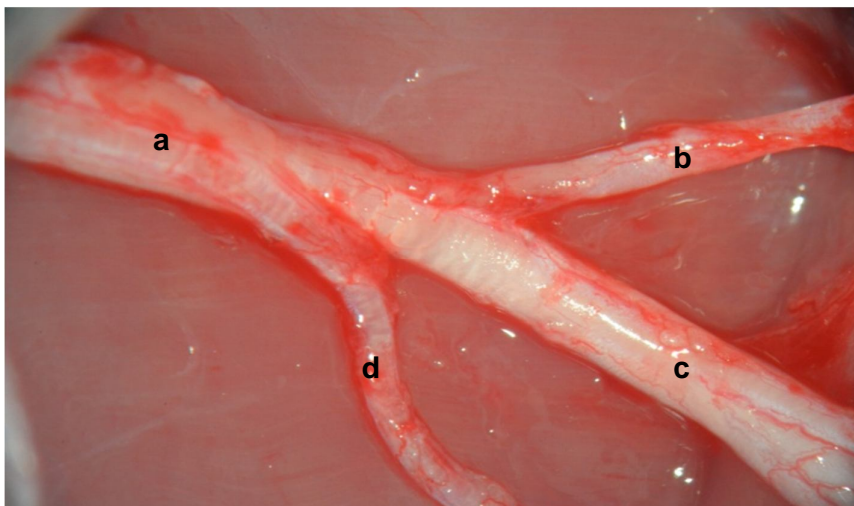


Figura 2 – Ramos do nervo isquiático; a = nervo isquiático, b = nervo fibular comum, c = nervo tibial, e d = nervo sural.
Fonte: Arquivo Pessoal

3.4 Exercício de natação

Uma semana após o procedimento cirúrgico, os animais do GNTL+N e GNTL+EE+N iniciaram protocolo de exercício de natação, realizado três vezes por semana, em dias alternados, perfazendo um total de três meses.

Em cada sessão de exercício, os animais realizavam 30 minutos de natação, de forma coletiva, em tanque cilíndrico de plástico, com água aquecida ($32 \pm 2^\circ$) e preenchida até aproximadamente 40 cm de altura (FIGURA 2).



Figura 3 – Exercício de natação realizado em tanque cilíndrico.
Fonte: Arquivo Pessoal

Após a retirada da água, cada animal foi secado com auxílio de uma toalha e realocado em sua respectiva gaiola.

3.5 Estimulação elétrica

Uma semana após o procedimento cirúrgico, os animais do GNTL+EE e GNTL+EE+N foram submetidos à aplicação de estimulação elétrica de média frequência por três meses. Para o grupo GNTL+EE a estimulação elétrica foi aplicada três vezes por semana, enquanto que para o GNTL+EE+N foi aplicada duas vezes por semana, nos dias em que os animais não realizavam natação.

Nos dias de aplicação, cada animal foi recebeu 20 minutos de estimulação elétrica, utilizando aparelho Endophasys-KLD® de Corrente Russa (FIGURA 4), ajustado com os seguintes parâmetros: Frequência Portadora: 2500 Hz; Burst: 0,4 ms; Ciclo de Trabalho: 50%; Frequência: 30 Hz para fibra vermelha e 100 Hz para fibra branca (10 minutos em cada); tempos de contração (TON) e relaxamento (TOFF) de 10 segundos e 20 segundos, respectivamente. A intensidade (mA) da corrente foi ajustada de modo a promover a contração do músculo tibial cranial, caracterizada pelo movimento de dorsiflexão.



Figura 4 – Aparelho utilizado para estimulação elétrica.
Fonte: Arquivo Pessoal

Para aplicação da corrente, os animais foram colocados em cápsulas metálicas (FIGURA 5), de forma a imobilizar sua cintura pélvica e garantir a exposição de ambos os membros pélvicos. Esse método é considerado vantajoso, visto que se torna desnecessária a anestesia do animal durante a aplicação da estimulação elétrica.



Figura 5 – Cápsula metálica com o animal dentro e eletrodos posicionados sobre o ventre do músculo tibial cranial.

Fonte: Arquivo Pessoal

Os eletrodos utilizados foram do tipo auto-adesivo. Estes eram posicionados na superfície da pele do animal, acompanhando a anatomia do músculo tibial cranial (MTC).

3.6 Análise funcional da marcha

Na décima primeira semana, antes da análise eletrofisiológica e sacrifício, os animais foram submetidos à avaliação funcional da marcha, utilizando o Índice Funcional do Ciático (BAIN et al., 1989). Para esta avaliação os animais caminharam por um aparelho denominado de *Cat Walk* onde as pegadas no assoalho foram identificadas automaticamente e utilizadas para a análise funcional. Este procedimento foi repetido duas vezes com cada animal. Os dados obtidos foram submetidos ao tratamento estatístico obedecendo ao índice de $P < 0,05$ para todas as amostras.

3.7 Análise eletrofisiológica

Para análise eletrofisiológica, os animais foram anestesiados com ketamina (0,5 ml/kg, i.m.) associada à xilasina (0,5 ml/kg, i.m.) e imobilizados em placas de cortiça em decúbito ventral.

Foi realizada assepsia e ampla incisão no membro posterior direito permitindo acesso aos nervos isquiático, fibular comum, tibial e músculo tibial cranial. O potencial de ação composto foi registrado por eletrodos de agulha ativo e de referência. O eletrodo ativo foi implantado no centro do MTC, e o de referência próximo ao tendão de inserção do músculo.

A avaliação das propriedades funcionais do músculo foi feita por meio de estímulos elétricos deflagrados por um eletrodo bipolar, especialmente desenvolvido para este propósito, cujo cátodo e ânodo estavam distantes 2 mm. O eletrodo de

estimulação bipolar foi posicionado diretamente sobre o nervo isquiático, anterior à região da neurorrafia término-lateral, e a estimulação foi realizada proximal à neurorrafia, possibilitando a propagação dos impulsos elétricos através dela.

A frequência do estímulo foi fixada em 1 pps e a duração em 100 μ s. A intensidade de estímulo utilizada, constante em todos os animais, foi de 5,1 volts. Os dados de amplitude e latência foram comparados entre os seis grupos. Para todo procedimento, foi utilizado eletromiógrafo da marca Sapphire II 4ME (FIGURA 6).



Figura 6 – Eletromiógrafo da marca Sapphire II 4ME utilizado para as análises.
Fonte: Arquivo Pessoal

3.8 Força muscular

O tendão distal do MTC foi seccionado e conectado a um transdutor de força FT03 Grass Technologies Company, Astro-Med, Inc. (West Warwick, RI) usando um

fio monofilamentar de náilon 4-0. O comprimento ideal do músculo foi mantido em uma carga de pré tensão de 0,18 N e que foi zerada entre os testes.

A estimulação elétrica foi gerada diretamente do músculo tibial cranial exposto. O teste consistiu em três aplicações seqüenciais de um segundo de duração, com tensão muscular reajustada entre as mensurações e a contração tetânica realizada com 100 mA e frequência de 100Hz.

3.9 Coleta dos nervos e eutanásia

Após a realização do teste de força de contração muscular, o nervo Fibular Comum foi coletado para o processamento histológico. Por conseguinte, foi realizada a eutanásia dos animais com dose suplementar de anestésico.

3.10 Processamento histológico dos nervos

Para o tratamento histológico, as amostras dos nervos passaram por um protocolo de inclusão em historesina, para obtenção de cortes histológicos de cinco micrômetros de espessura e confecção das lâminas histológicas em coloração de tetróxido de ósmio e contra coloração com azul de toluidina.

3.11 Análise morfométrica

A captura das imagens foi realizada com auxílio de um micro computador com software de captura e análise de imagem, acoplado a um microscópio óptico (Leica DMLS) (FIGURA 7). Foram mensuradas 220 fibras nervosas por animal, com auxílio do programa analisador de imagens Sigma Scan Pro 5.0. As variáveis morfométricas estudadas foram: áreas, diâmetros mínimos das fibras e espessuras das bainhas (FIGURA 8).



Figura 7 - Sistema de análise de imagem - Micro computador com o software de captura e análise de imagem, acoplado ao microscópio Leica DMLS.

Fonte: Arquivo Pessoal

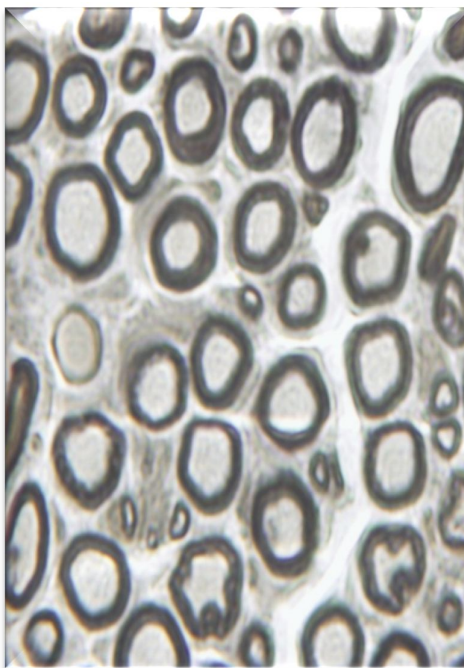


Figura 8 – Análise morfométrica da fibra nervosa.

Fonte: Arquivo Pessoal

3.12 Análise Estatística

Para análise estatística entre os grupos foi utilizada análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey. O nível de significância considerado foi de $p \leq 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Análise funcional da marcha

A média dos resultados da análise funcional (Tabela 2 e Figura 9) da marcha demonstrou que o GNTL+EE (-23,25) e o GNTL+N (-22,67) obtiveram resultados semelhantes, porém inferiores quando comparados ao GNTL+EE+N (-13,67). Esses valores foram significativamente superiores aos encontrados no GNTL (-36,73). Nenhum grupo apresentou resultados semelhantes ao GCF (-6,47), entretanto, todos apresentaram resultados significativamente superiores ao GD (-54,05).

Tabela 1 - Média e desvio padrão da análise funcional da marcha.

	Análise Funcional	
	Média	DP
GCF	-6,47 ^a	1,59
GD	-54,05 ^b	4,18
GNTL	-36,73 ^c	4,07
GNTL+EE	-23,25 ^d	1,86
GNTL+N	-22,67 ^d	2,09
GNTL+EE+N	-13,67 ^e	3,14

Letras diferentes indicam diferença estatística.

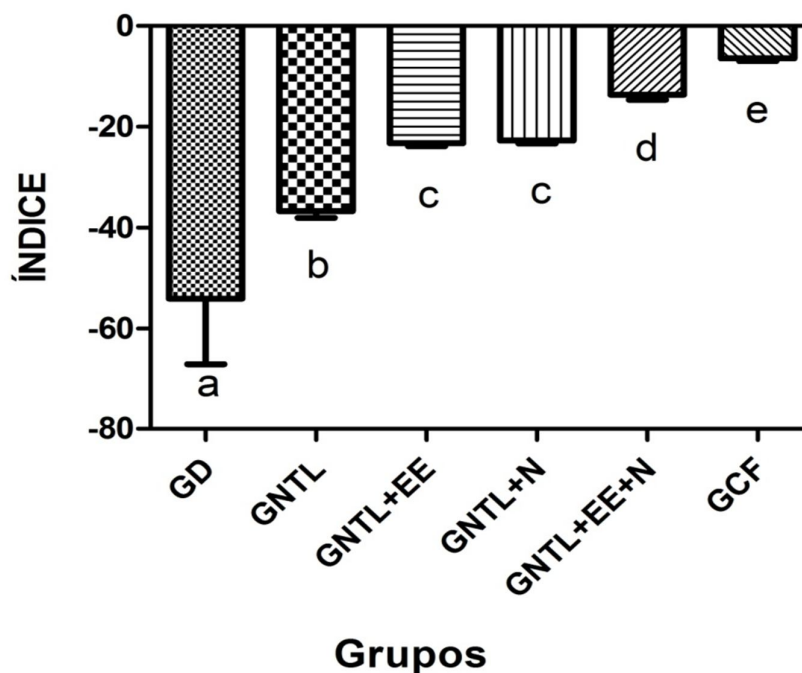


Figura 9 – Gráfico com as médias obtidas pela análise de marcha. Letras diferentes indicam diferença estatística.

4.2 Análise eletrofisiológica

A média dos resultados de amplitude (mV) demonstrou que o GNTL+EE+N (18,56 mV) e o GCF (20,53 mV) obtiveram resultados semelhantes. Esses valores foram superiores aos encontrados no GNTL+EE (16,12 mV) e GNTL+N (16,16 mV), embora estes últimos tenham apresentados resultados semelhantes entre ambos. Todos os grupos apresentaram resultados superiores ao GNTL (6,68 mV), que também demonstrou superioridade quando comparado ao GD (0 mV).

Em relação à média dos resultados de latência (ms), não foram observadas diferenças significativas entre os grupos GNTL (1,91 ms), GNTL+EE (1,85 ms), GNTL+N (1,85 ms) e GNTL+EE+N (1,80 ms). Entretanto, esses valores foram superiores ao GCF (1,61 ms) e inferiores ao GD (10,00). Para o GD, o valor atribuído de 10,00 ms foi apenas para análise estatística, visto que o músculo não apresentou resposta devido ao procedimento cirúrgico de desnervação.

Os resultados da análise eletrofisiológica podem ser observados na Tabela 2 e Figuras 10 e 11.

Tabela 2 - Média e desvio padrão da amplitude (mV) e latência (ms) captada pela análise eletrofisiológica.

	Amplitude		Latência	
	Média	DP	Média	DP
GCF	20,53 ^a	1,84	1,61 ^a	0,07
GD	0 ^b	0	10,00 ^b	0,0
GNTL	6,68 ^c	0,63	1,91 ^c	0,05
GNTL+EE	16,12 ^d	0,99	1,85 ^c	0,02
GNTL+N	16,16 ^d	1,04	1,85 ^c	0,02
GNTL+EE+N	18,56 ^a	0,74	1,80 ^c	0,02

Letras diferentes indicam diferença estatística.

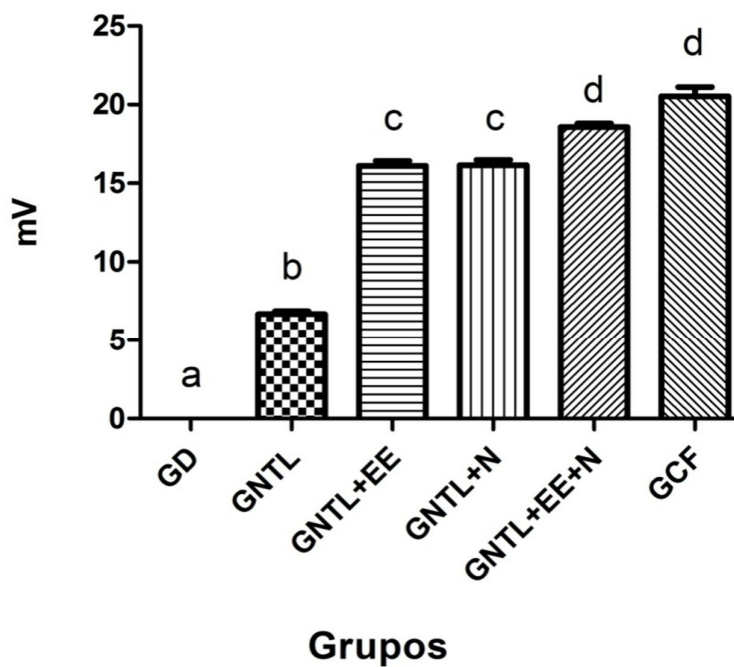


Figura 10 – Gráfico da média da amplitude (mV).
Letras diferentes indicam diferença estatística.

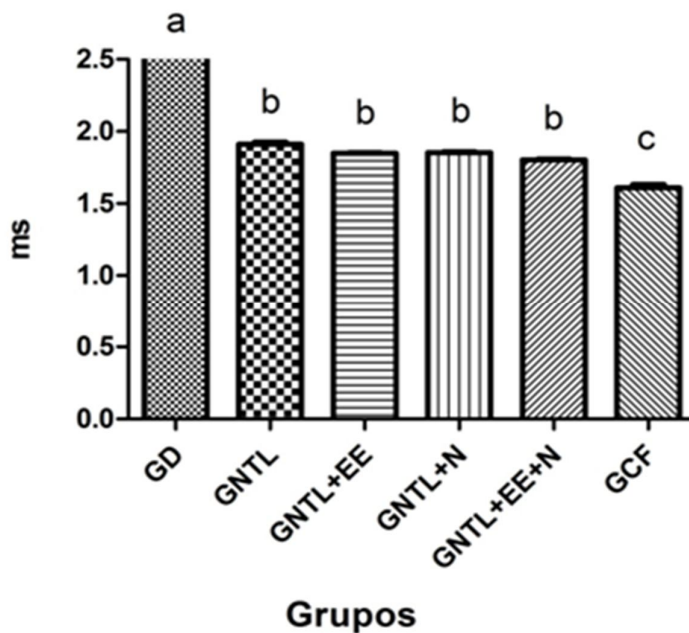


Figura 11 - Gráfico da média da latência (ms).
Letras diferentes indicam diferença estatística.

4.3 Força muscular

A média dos resultados de força muscular (N) demonstrou diferença significativa entre todos os grupos. O GNTL+EE+N (0,92 N) obteve resultados superiores quando comparado ao GNTL+N (0,80 N) e GNTL+EE (0,72 N), que também apresentaram diferença entre ambos. Esses valores foram significativamente superiores aos encontrados no grupo GNTL (0,65) e inferiores aos observados no GCF (1,00). Todos os resultados foram superiores ao obtido pelo GD (0,23 N). Os resultados de força muscular podem ser observados na Tabela 3 e Figura 12.

Tabela 3 - Média e desvio padrão da força muscular (N) captada pelo transdutor.

Força muscular		
	Média	DP
GCF	1,00 ^a	0,03
GD	0,23 ^b	0,01
GNTL	0,65 ^c	0,02
GNTL+EE	0,72 ^d	0,03
GNTL+N	0,80 ^e	0,02
GNTL+EE+N	0,92 ^f	0,03

Letras diferentes indicam diferença estatística.

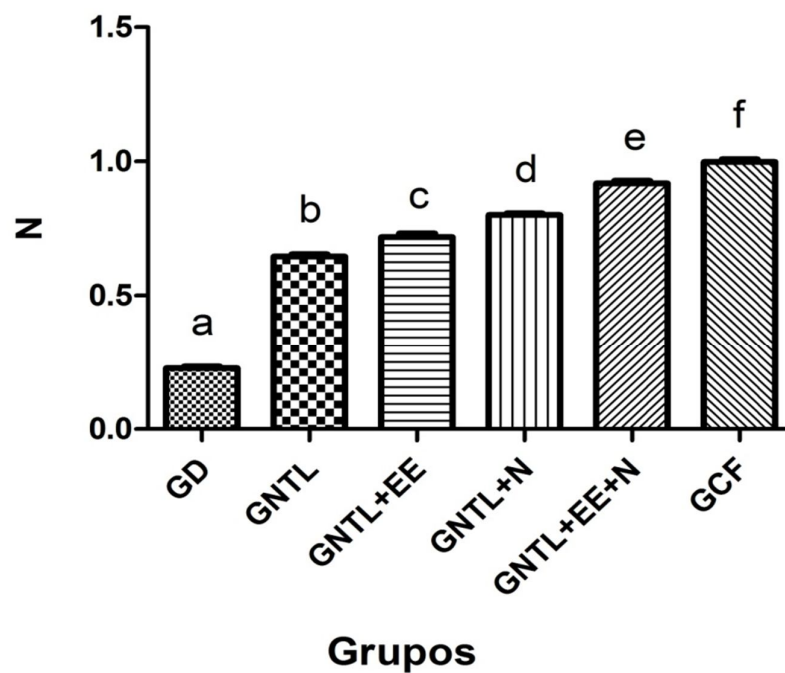


Figura 12 – Gráfico da média de força muscular (N). Letras diferentes indicam diferença estatística.

4.4 Áreas e Diâmetros das Fibras Nervosas

Os dados obtidos da média das áreas das fibras nervosas mostram que o grupo GNTL+EE+N apresentou o melhor resultado ($29,13\mu\text{m}^2$ e $5,96\mu\text{m}$) de área e diâmetro respectivamente. Na sequência o grupo com melhor resultado foi o GNTL+N ($25,41\mu\text{m}^2$ e $5,11\mu\text{m}$), seguido pelo GNTL+EE que na variável área das fibras nervosas apresentou melhor resultado ($21,38\mu\text{m}^2$) quando comparado com o grupo GNTL ($16,00\mu\text{m}^2$), já na variável do diâmetro das fibras nervosas a diferença entre o GNTL+EE ($4,88\mu\text{m}$) e GNTL ($4,05\mu\text{m}$) não foi significativa. Os resultados podem ser observados na Tabela 4 e nas figuras 13 e 14.

Tabela 4 – Média (μm^2) e desvio padrão da área das fibras nervosas e média (μm) e desvio padrão do diâmetro menor das fibras nervosas. Letras diferentes indicam diferença estatística.

	Áreas das Fibras Nervosas		Diâmetros das Fibras Nervosas	
	Média	DP	Média	DP
GD	0 ^a	0	0 ^a	0
GNTL	16,00 ^b	3,55	4,05 ^b	0,56
GNTL+EE	21,38 ^c	1,81	4,88 ^{bc}	0,93
GNTL+N	25,41 ^d	2,02	5,11 ^c	0,68
GNTL+EE+N	29,13 ^e	2,73	5,96 ^d	0,67
GCF	50,76 ^f	3,27	8,59 ^e	0,55

Avaliando a área da fibra nervosa e o diâmetro da fibra nervosa,

GCF>GNTL+EE+N>GNTL+N> GNTL+EE >GNTL>GD. Teste One-way ANOVA e Tukey.

$p<0,05$.

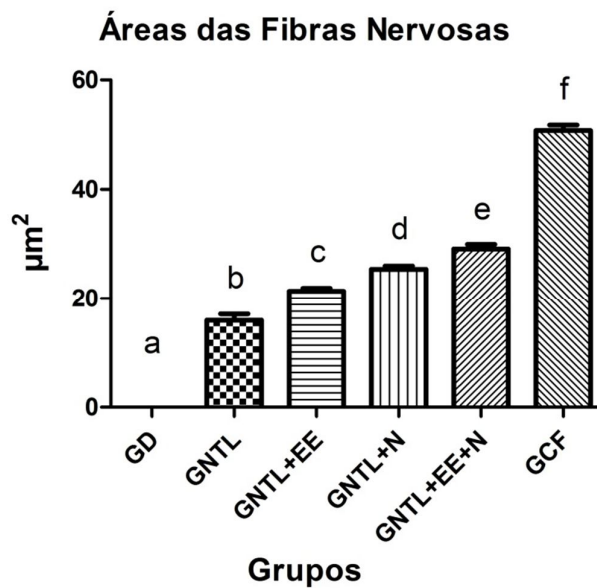


Figura 13 – Gráfico da média (µm²) da área das fibras nervosas. Letras diferentes indicam diferença estatística.

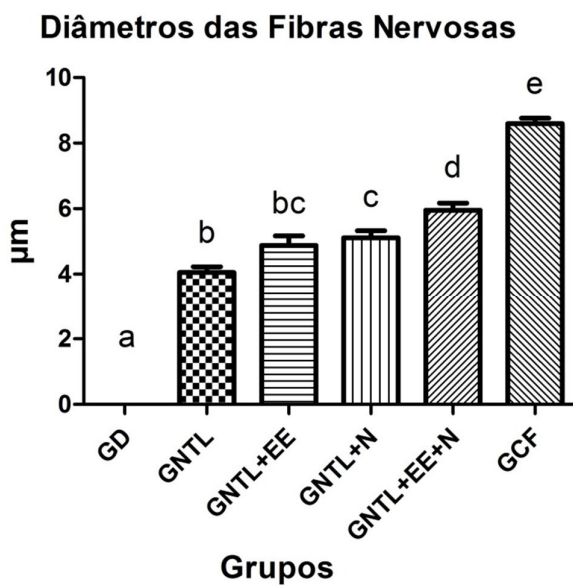


Figura 14 – Gráfico da Média (µm) do diâmetro das fibras nervosas. Letras diferentes indicam diferença estatística.

4.4 Áreas e Diâmetros dos Axônios

Os dados obtidos da média das áreas e diâmetros dos axônios, mostram que o grupo GNTL+EE+N apresentou o melhor resultado ($15,06\mu\text{m}^2$) na variável área. Na sequência da análise da área dos axônios, os grupos GNTL+N e GNTL+EE apresentaram resultados semelhantes, com $1,41\mu\text{m}$ e $1,28\mu\text{m}$. Na variável diâmetro, o GNTL+EE+N obteve o melhor resultado juntamente com grupo GNTL+N e o grupo GNTL+EE, com $2,98\mu\text{m}$, $2,83\mu\text{m}$ e $2,57\mu\text{m}$ respectivamente. Os resultados podem ser observados na Tabela 5 e nas figuras 15 e 16.

Tabela 5 – Média (μm^2) e desvio padrão da área dos axônios e média (μm) e desvio padrão do diâmetro menor dos axônios. Letras diferentes indicam diferença estatística.

	Áreas dos Axônios		Diâmetros dos Axônios	
	Média	DP	Média	DP
GD	0 ^a	0	0 ^a	0
GNTL	5,68 ^b	0,74	2,57 ^b	0,39
GNTL+EE	7,15 ^{bc}	1,28	2,83 ^{bc}	0,37
GNTL+N	7,37 ^c	1,41	2,98 ^{bc}	0,42
GNTL+EE+N	10,61 ^d	1,36	3,20 ^c	0,41
GCF	15,06 ^e	1,24	4,77 ^d	0,59

Avaliando a área do axônio, GCF>GNTL+EE+N>GNTL+N> GNTL+EE >GNTL>GD.

Avaliando o diâmetro do axônio, GCF>GNTL+EE+N>GNTL+N> GNTL+EE <GNTL>GD.

Teste One-way ANOVA e Tukey. $p < 0,05$.

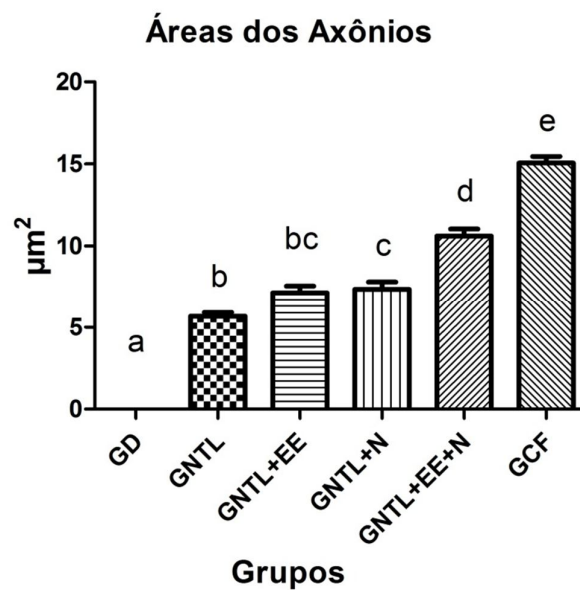


Figura 15 – Gráfico da média (μm^2) das áreas dos axônios. Letras diferentes indicam diferença estatística.

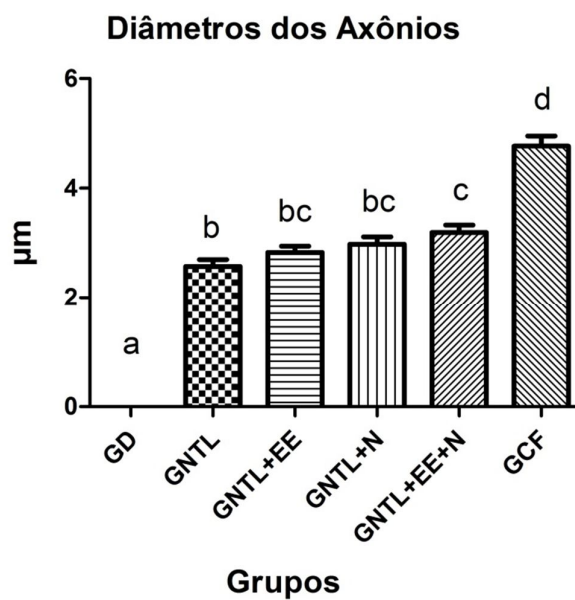


Figura 16 – Gráfico da média (μm) do diâmetro dos axônios. Letras diferentes indicam diferença estatística.

4.5 Áreas das Bainhas de Mielina e Espessuras das Bainhas de Mielina

Na avaliação das médias das áreas das bainhas de mielina, os grupos GNTL+EE+N e GNTL+N obtiveram os melhores resultados ($18,51\mu\text{m}^2$ e $18,04\mu\text{m}^2$ respectivamente), na sequência, observamos o grupo GNTL+EE com $14,23\mu\text{m}^2$. Na avaliação da espessura da bainha de mielina, os grupos GNTL+EE+N, GNTL+N e GNTL+EE não apresentaram diferença significativa, atingindo $2,76\mu\text{m}^2$, $2,14\mu\text{m}^2$ e $2,05\mu\text{m}^2$ respectivamente. Nenhum grupo experimental obteve semelhança ao grupo controle e todos foram superiores ao grupo GD. Os valores podem ser visualizados na Tabela 6 e nas figuras 17 e 18.

Tabela 6 – Média (μm^2) e desvio padrão das áreas das bainhas de mielina e média (μm) e desvio padrão das espessuras das bainhas de mielina. Letras diferentes indicam diferença estatística.

	Área da Bainha de Mielina		Espessura da Bainha de Mielina	
	Média	DP	Média	DP
GD	0 ^a	0	0 ^a	0
GNTL	10,32 ^b	3,28	1,48 ^b	0,63
GNTL+EE	14,23 ^c	2,67	2,05 ^{bc}	0,77
GNTL+N	18,04 ^d	3,00	2,14 ^{bc}	0,78
GNTL+EE+N	18,51 ^d	2,55	2,76 ^c	0,80
GCF	35,70 ^e	3,93	3,82 ^d	0,80

Avaliando a área da bainha de mielina, GCF>GNTL+EE+N>GNTL+N> GNTL+EE

>GNTL>GD. Avaliando a espessura da bainha de mielina,

GCF>GNTL+EE+N>GNTL+N> GNTL+EE>GNTL>GD. Teste One-way ANOVA e Tukey.

$p<0,05$.

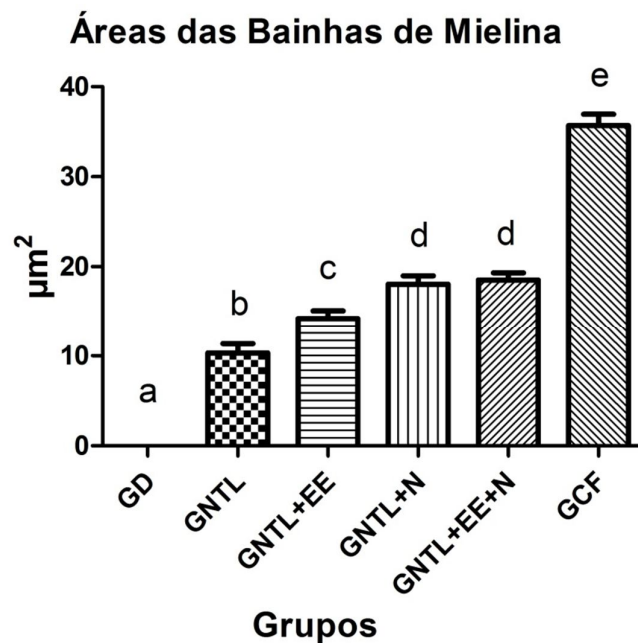


Figura 17 – Gráfico da média (μm^2) das áreas das bainhas de mielina. Letras diferentes indicam diferença estatística.

Espessuras das Bainhas de Mielina

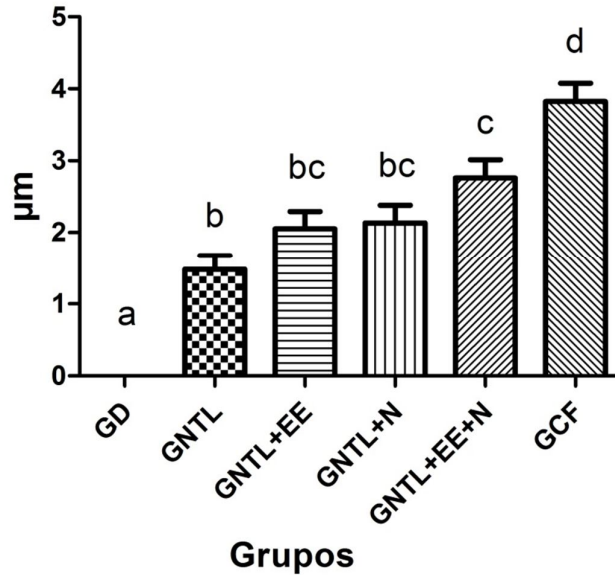


Figura 18 – Gráfico da média (μm) das espessuras das bainhas de mielina. Letras diferentes indicam diferença estatística.

5 DISCUSSÃO

5.1 Métodos

Neste estudo, foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Wistar por serem de fácil obtenção, manipulação e manutenção, além de ser o modelo mais frequentemente utilizado em estudos de reparo nervoso periférico e regeneração nervosa. (AKGUL; GULSOY; GULCUR *et al.*, 2014; MOHAMMADI; SAADATI, 2014; KAVLAK *et al.*, 2014; GHAYEMI *et al.*, 2014).

A opção pela utilização de ratos machos ocorreu devido a estes estarem menos susceptíveis à ação de hormônios adenohipofisários e gonadais, como o estrógeno e a progesterona, os quais poderiam influenciar no processo de regeneração nervosa. (CARANDENTE *et al.*, 1989). Além disso, Thompson, Sengelaub e English (2014) demonstraram recentemente que a melhora da regeneração nervosa periférica, devido ao exercício e à estimulação elétrica, é dependente da sinalização de receptores androgênicos.

Foram utilizados ratos jovens, pois estudos demonstram que o avançar da idade pode influenciar nos mecanismos de reparo nervoso periférico, tornando-os mais demorados, em consequência da redução na velocidade de regeneração nervosa e diminuição da expressão de fatores neurotróficos. (KANG; LICHTMAN, 2013).

O modelo de neurorrafia término-lateral realizada neste estudo foi a mesma descrita por Viterbo *et al.* (1992), sem abertura da janela epineural e utilizando o nervos fibular (receptor) e tibial (doador). Segundo os autores, este modelo apresenta duas vantagens: a) o músculo tibial cranial é inervado exclusivamente pelo nervo fibular e, b) a localização superficial do nervo fibular possibilita o acompanhamento clínico da reinervação.

Quanto à estimulação elétrica (EE), o protocolo utilizado neste estudo não provocou estímulo doloroso nos animais, pois os níveis de estimulação foram ajustados para que permanecessem dentro do limiar motor e não atingissem o limiar doloroso.

A corrente de estimulação foi determinada baseada em parâmetros criteriosamente pré-estabelecidos, a partir de estudos anteriores realizados em nosso laboratório. As frequências de 30 Hz e 100 Hz utilizadas neste experimento estavam de acordo com as características do músculo tibial cranial (MTC), em que há distribuição homogênea das fibras musculares do tipo I e do tipo II.

Em relação ao exercício físico, optamos pelo ergômetro da natação, pois este apresenta diversas vantagens como o baixo custo do equipamento e a desnecessidade de seleção dos animais, já que todos apresentam habilidade inata de nadar. (GOBATTO *et al.* 2001). Além disso, são poucas as pesquisas que observaram os efeitos do exercício de natação na regeneração nervosa periférica.

5.2 Análise funcional da marcha

A avaliação da marcha foi desenvolvida por De Medinacelli, Freed e Wyatt (1982) por meio do Índice Funcional do Isquiático, que avalia a função relacionada ao nervo isquiático. Posteriormente, o método foi aperfeiçoado por Bain *et al.* (1989), que desenvolveu avaliações específicas para o nervo tibial e para o nervo fibular (Índice Funcional do Fibular – IFF). Como nosso modelo experimental envolve especificamente o nervo fibular, foi utilizado o IFF.

Os resultados verificados na presente avaliação demonstram que o GNTL+EE e o GNTL+N apresentaram valores superiores ao GNTL e GD, indicando eficiência da EE e do exercício de natação em promover melhora funcional. Corroborando com

os nossos achados, Teodori *et al.* (2011) constataram que, o exercício de natação, quando realizado após a axonotmese e durante 30 dias, pode acelerar a regeneração nervosa e melhorar a recuperação funcional.

Diferentemente ao encontrado no presente estudo, Gigo-Benato *et al.* (2010) observaram durante 14 dias a recuperação funcional de ratos após lesão por esmagamento do nervo isquiático e concluíram que a EE prejudicou a recuperação do músculo e nervo. No entanto, devemos indagar se os 14 dias de recuperação foram suficientes para que ocorresse a reinervação muscular. Talvez, com um tempo de tratamento maior, os autores poderiam obter conclusões mais concretas quanto à melhora funcional.

Em estudo semelhante ao nosso, Maciel *et al.* (2013) verificaram o efeito da aplicação da EE por 180 dias no MTC de ratos após a neurorrafia término-lateral do nervo fibular comum. Em seus resultados, os autores constataram efeitos benéficos da aplicação da EE, sendo importante na regeneração nervosa e na manutenção da funcionalidade do músculo.

Oliveira *et al.* (2008) verificaram o efeito da combinação da EE e do exercício de natação durante 22 dias em ratos após axonotmese. Os autores verificaram prejuízo na recuperação funcional e, atribuíram a este atraso, a hipótese de sobrecarga dos músculos na fase de reinervação. Estes resultados divergiram dos encontrados em nosso estudo, em que o GNTL+EE+N apresentou melhor resultado funcional dentre os grupos experimentais. Contudo, devemos considerar a diferença de métodos utilizados em ambos os estudos, em relação ao tipo de lesão nervosa induzida e o período de tratamento.

5.3 Análise eletrofisiológica

No teste eletrofisiológico, o parâmetro latência corresponde à capacidade de condução nervosa, reflexo da quantidade de fibras mielinizadas. Por outro lado, a amplitude evidencia o número de fibras musculares responsivas ao estímulo elétrico, representando também o número de axônios excitáveis. (ROBINSON; SNYDER-MACKLER, 2010).

Os animais do GD não apresentaram resposta muscular ao estímulo elétrico devido à desconexão entre o nervo fibular e o MTC. Por essa razão, os valores de latência foram determinados com tendência infinita positiva e, os valores de amplitude, com tendência infinita negativa. Ambos foram removidos da análise estatística.

Em relação à latência, a análise eletrofisiológica não demonstrou diferença entre os grupos GNTL, GNTL+EE, GNTL+N e GNTL+EE+N. Embora todos tenham apresentado inferioridade em comparação ao GCF, infere-se que o restabelecimento da inervação ocorreu em todos os grupos submetidos à neurorrafia.

Quanto à amplitude, foi observada semelhança entre o GNTL+EE e GNTL+N, os quais apresentaram resultados superiores ao GNTL, porém inferiores ao GNTL+EE+N e GCF. Estes achados podem evidenciar a influência da EE e natação, de forma isolada ou combinada, na melhora da resposta muscular após período de desnervação.

5.4 Análise da força muscular

O teste de força muscular consistiu na aplicação de estímulo elétrico diretamente no MTC para obtenção da força de contração máxima.

Utilizando um estímulo de 100 Hz, frequência que provoca contração tetânica, todos os animais submetidos à NTL e tratados com EE ou natação, bem como a combinação de ambos, apresentaram superioridade quando comparados ao GNTL. No que se refere à utilização da EE, Rutherford e Jones (1986) sugerem que parte do efeito pode estar relacionada à facilitação neural, em função de um número maior de unidades motoras ativas e aumento na taxa de impulsos, ou um padrão mais eficiente de recrutamento, devido a uma modificação do mecanismo de gradação de força, proporcionando melhora da somação de estímulos nervosos.

Quanto ao papel do exercício físico, acredita-se que este tenha exercido influência na regeneração nervosa (não avaliada neste estudo), acelerando o crescimento axonal por intermédio do aumento na expressão de fatores neurotróficos. Dessa maneira, com a reinervação precoce do MTC, as características estruturais e funcionais do tecido muscular podem ter sido mais bem preservadas.

5.5 Análise morfométrica

A coloração do MTC foi realizada em Hematoxilina e Eosina (HE), pois é um método que, além de ser de baixo custo, evidencia com clareza a fibra muscular, permitindo a análise morfométrica.

Dentre os parâmetros morfométricos, foram analisados área e diâmetro mínimo das fibras musculares. De acordo com Romão *et al.* (2007) e De Sá *et al.* (2004), a medida de diâmetro mínimo é mais confiável que a medida da área ou de diâmetro máximo, pois esta não sofre alteração devido a inclinação da navalha durante o corte histológico.

Em relação aos parâmetros área e diâmetro mínimo do MTC, observou-se equivalência entre os grupos GNTL+N e GNTL+EE+N, e uma superioridade de todos os grupos em relação ao GD. Este fato demonstra que o exercício de natação, a EE, bem como a associação de ambos, foi positivo para o MTC após NTL.

De acordo com Neto (2007), existe uma relação direta entre a secção transversal da fibra muscular com a força que esse músculo pode produzir. Dessa forma, podemos associar tais achados histológicos ao melhor desempenho funcional dos grupos tratados.

6 CONCLUSÃO

Com base na metodologia e protocolos utilizados, pelos resultados obtidos, podemos concluir que:

- A eletroestimulação e a natação são protocolos pós cirúrgicos que apresentam potencial para auxiliar a recuperação funcional de lesões nervosas periféricas.

- A associação dos protocolos de natação e eletroestimulação apresentaram resultados superiores e são uma alternativa para utilização na reabilitação de pacientes com lesão nervosa periférica.

REFERÊNCIAS

- AKGUL, T.; GULSOY, M.; GULCUR, H. O. Effects of early and delayed laser application on nerve regeneration. **Lasers Med. Sci.**, v. 29, p.351-357, 2014.
- ARAKAWA, T. *et al.* Electrical stimulation prevents apoptosis in denervated skeletal muscle. **Neuro Rehabilitation**, v. 27, n. 2, p. 147-154, 2010.
- BAIN, J. R.; MACKINNON, S. E.; HUNTER, D. A. Functional evaluation of complete sciatic, peroneal, and posterior tibial nerve lesions in the rat. **Plast Reconstr Surg.**, v. 82, p. 129-136, 1989.
- BERTELLI, J. A.; DOS-SANTOS, A. R.; CALIXTO, J. B. Is axonal sprouting able to traverse the conjunctival layers of the peripheral nerve? A behavioral, motor, and sensory study of end-to-side nerve anastomosis. **Journal of Reconstructive Microsurgery**, v. 12, n. 8, p. 559-563, 1996.
- BERTELLI, J. A.; GHIZONI, M. F. Nerve repair by end-to-side coaptation or fascicular transfer: a clinical study. **Journal of Reconstructive Microsurgery**, v. 19, n. 5, p. 313-318, 2003.
- CARANDENTE, F. *et al.* Rhythms in the ovulatory cycle. 2nd: LH, FSH, estradiol and progesterone. **Chronobiologia**, v. 16, n. 4, p. 353-363, 1989.
- CARVALHO, D.C.I. *et al.* Tratamentos não farmacológicos na estimulação da osteogênese. **Rev Saúde Pública**, v. 36, n. 5, p. 647-654, 2002.
- CHARGE, S. B. P.; RUDNICKI, M. A. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. **Physiol Rev** , v. 84, p. 209-238, 2003.
- COBIANCHI, S. *et al.* Short- but not long-lasting treadmill running reduces allodynia and improves functional recovery after peripheral nerve injury. **Neuroscience**, v.168, p. 273-287, 2010.
- DAVATZ, G. C. *et al.* Apoptosis in denervated skeletal muscle. **Int. J. Morphol.**, v. 25, n. 3, p. 529-536, 2007.
- DE MEDINACELLI, L.; FREED, W. J.; WYATT, R. J. An index of the functional condition of rat sciatic nerve based on measurements made from walking tracks. **Exp. Neurol.**, v. 77, n. 3, p. 634-43, 1982.
- DE SÁ, J. M. R. *et al.* The end-to-side peripheral nerve repair functional and morphometric study using the peroneal nerve of rats. **J. Neurosci. Methods**, v. 136, p. 45-53, 2004.

DEUMENS, R. et al. Repairing injured peripheral nerves: Bridging the gap. **Prog Neurobiol.**, v. 92, p. 245-276, 2010.

FITTS, R. H.; RILEY, D. R.; WIDRICK, J. J. Physiology of a microgravity environment invited review: microgravity and skeletal muscle. **J Appl Physiol.**, v. 89, p. 823-839, 2000.

GHAYEMI, N. *et al.* Functional effect of local administration of glial derived neurotrophic factor combined with inside-out artery graft on sciatic nerve regeneration in rat. **Int. J. Surg.**, v. 12, n. 5, p. 457-463, 2014.

GIGO-BENATO, D. *et al.* Electrical stimulations impairs early functional recovery and accentuates skeletal muscle atrophy after sciatic nerve crush injury in rats. **Muscle Nerve**, v. 41, n. 5, p. 685-693, 2010.

GOBATTO, C. A. *et al.* Maximal lactate steady state in rats submitted to swimming exercise. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A**, v. 130, p. 21-27, 2001.

GOMEZ-PINILLA, F. et al. Voluntary exercise induces a BDNF-mediated mechanism that promotes neuroplasticity. **J Neurophysiol.**,v. 88, p.2187-2195, 2002.

GORDON, T.; SULAIMAN, G. A. R.; LADAK, A. Electrical stimulation for improving nerve regeneration: where do we stand?.**International Review of Neurobiology**, v. 87, p. 433-444, 2009.

GRINSELL, D.; KEATING, C. P. Peripheral nerve reconstruction after injury: a review of clinical and experimental therapies. **Biomed. Res. Int.**, p. 1-13, 2014.

GUO, B.S. et al. Electrical stimulation influences satellite cell proliferation and apoptosis in unloading-induced muscle atrophy in mice. **PLoS One**, v.7, n.1, 2012.

ILHA, J. et al. Endurance and resistance exercise training programs elicit specific effects on sciatic nerve regeneration after experimental traumatic lesion in rats. **Neurorehabil Neural Repair**, v. 22, n. 4, p. 355-366, 2008.

IÑIGO PAVLOVICH, R. Estimulación con corrientes de alta frecuencia para la cicatrización de la ruptura de meniscos en las lesiones en zona vacular y avascular, reporte preliminar de un nuevo abordaje terapéutico. **Rev Mex Ortop Traumatol.**, v. 12, n. 5, p. 421-424, 1998.

KANAYA, F.; TAJIMA, T. Effect of electrostimulation on denervated muscle.**Clin Orthop Relat Res**, v. 28, p. 296-301, 1992.

KANG, H.; LICHTMAN, J. W. Motor axon regeneration and muscle reinnervation in young and aged animals. **J. Neurosci.**, v. 33, n. 50, p. 19480- 19491, 2013.

KARALAKI, M. et al. Muscle regeneration: cellular and molecular events. **In vivo**, v. 23, p. 779-796, 2009.

KAVLAK, E. *et al.* Effects of pulsed electromagnetic field and swimming exercise on rats with experimental sciatic nerve injury. **J. Phys. Ther. Sci.**, v. 26, n. 9, p. 1355-1361, 2014.

KOTWAL, A.; SCMIDT, C.E. Electrical stimulation alters absorption and nerve cell interactions with electrically conducting biomaterials. **Biomaterials**, v. 22, n.10, p. 1055-1064, 2001.

KOVACIC, U. et al. Collateral sprouting of sensory axons after end-to-side nerve coaptation – A longitudinal study in the rat. **Experimental Neurology**, v. 203, p. 358-369, 2007.

LIM, J.; HAN, T. R. Effect of electromyostimulation on apoptosis-related factors in denervation and reinnervation of rat skeletal muscles. **Muscle Nerve**, v. 42, p. 422-430, 2010.

LOW, J.; REED, A. **Eletroterapia explicada: princípios e prática**. 3. ed. Barueri, SP: Manole, 2001.

LUNDBORG, G. A 25-year perspective of peripheral nerve surgery: involving neuroscientific concepts and clinical significance. **J Hand Surg.**, v. 25A, p. 391-414, 2000.

LUNDBORG, G. et al. Can sensory and motor collateral sprouting be induced from intact peripheral nerve by end-to-side anastomosis? **J Hand Surgery**, v. 19B, p.277-282, 1994.

LUNDBORG, G. et al. Tissue specificity in nerve regeneration. **Scandinavian journal of Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 20, p. 279-283, 1986.

LYKISSAS, M. G. Current concepts in end-to-side neurorrhaphy. **World J. Orthop.**, v. 11, n. 2, p. 102-106, 2011.

MACIEL, F. O. et al. Effect of electrical stimulation of the cranial tibial muscle after end-to-side neurorrhaphy of the peroneal nerve in rats. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 28, p.39-47, 2013.

MARQUESTE, T. et al. Neuromuscular rehabilitation by treadmill running or electrical stimulation after peripheral nerve injury and repair. **J Appl Physiol.**, v. 96, p. 1988-1995, 2004.

MARTIN, K.; TEKERU, A.; LUNDBORG, G. Collateral sprouting from sensory and motor axons into an end to side attached nerve segment. **Neuroreport**, v. 11, n. 11, p. 2455-2458, 2000.

McCALLISTER, W. V. et al. Axonal regeneration stimulated by the combination of nerve growth factor and ciliary neurotrophic factor in an end-to-side model. **J Hand Surg.**, v. 26A, p. 478-488, 2001.

MODLIN, M. et al. Electrical stimulation of denervated muscles: first results of a clinical study. **Artificial Organs**, v. 29, n. 3, p.203-206, 2005.

MOHAMMADI, R.; SAADATI, A. Influence of insulin-like growth factor I on nerve regeneration using allografts: a sciatic nerve model. **Journal of Craniofacial Surgery**, v. 25, n. 4, p. 1510-1514, 2014.

MOLTENI, R. et al. Voluntary exercise increases axonal regeneration from sensory neurons. **Proc Natl Acad Sci.**, v. 101, p. 8473-8478, 2004.

NEMETH, P.M. Electrical stimulation of denervated muscle prevents decreases in oxidative enzymes. **Muscle Nerve**,v.5, n. 2, p. 134-139, 1982.

NETO, A. G. **Comparação entre estimulação elétrica funcional e contração voluntária máxima no treinamento de força muscular da preensão palmar.** 2002. Dissertação de Mestrado – Universidade Católica de Brasília, Programa de Pós Graduação em Educação Física, 2007.

NICOLAIDS, S. C.; WILLIAMS, H. B. Muscle preservation using an implantable electrical system after nerve injury and repair. **Microsurgery**, v. 21, n. 6, p. 241-247, 2001.

OLIVEIRA, L. S. et al. Electrical stimulation and swimming in the acute phase of axonotmesis: their influence on nerve regeneration and functional recovery. **Rev Neurol.**,v.47, p. 11-15, 2008.

PARK, J.; HÖKE, A. Treadmill exercise induced functional recovery after peripheral nerve repair is associated with increased levels of neurotrophic factors. **Plos One**, v. 9, n. 3, p. 1-7, 2014.

POLITIS, M.J.; EDERLE, K.; SPENCER, P.S. Tropism in nerve regeneration in vivo. Attraction of regenerating axons by diffusible factors derived form cells in distal nerve stumps of transected peripheral nerves. **Brain Research**, v. 253, p.1-12, 1982.

PONDAAG, W.; ALAIN, G. Results of end-to-side nerve coaptation in severe obstetric brachial plexus lesions. **Neurosurgery**, v. 62, n. 3, p. 656-663, 2008.

RAY, W. Z.; MACKINNON, S. E. Management of nerve gaps: autografts, allografts, nerve transfers, and end-to-se neurorrhaphy. **Experimental Neurology**, v. 223, p. 77-85, 2010.

ROBINSON, A. J., SNYDER-MACKLER, L. **Eletrofisiologia clínica**. 3 ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

RODRIGUES, A. C. et al. Fat cell invasion in long-term denervated skeletal muscle. **Microsurgery**, v. 27, p. 664-667, 2007.

ROMÃO, A. M. *et al.* Eletroestimulação do músculo tibial cranial após esmagamento do nervo fibular comum: estudo neurofisiológico e morfométrico no rato. **Rev Bras Ortop**, v. 42, n. 3, p. 41-46, 2007.

RUTHERFORD, O. M., JONES, D. A. The role of learning and coordination in strength training. **Eur. J. Appl. Physiol. Occup. Physiol.**, v. 55, 100-105, 1986.

SABATIER, M. J. et al. Treadmill training promotes axon regeneration in injured peripheral nerves. **Exp Neurol.**, v. 211, p. 489-493, 2008.

SCHEIB, J.; HÖKE, A. Advances in peripheral nerve regeneration. **Nature Reviews Neurology**, v. 9, p. 668-676, 2013.

SNYDER-MACKLER, L. et al. Use of electrical stimulation to enhance recovery of quadriceps femoris muscle force production in patients following anterior cruciate ligament reconstruction. **PhysTher**, v. 74, p. 901-907, 1994.

SOUZA, T.D.; DEL CARLO, R.J.; VILORIA, M.I.V. Eletroterapia no processo de reparação da superfície articular de coelhos. **Ciênc Rural**, v. 31, p. 5, p. 819-824, 2001.

STARKEY, C. **Recursos terapêuticos em fisioterapia**. Barueri, SP: Manole, 2001.

SULAIMAN, W.; GORDON, T. Neurobiology of peripheral nerve injury, regeneration, and functional recovery: from bench top research to bedside application. **Ochsner J.**, v. 13, n. 1, p. 100-108, 2013.

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

SUNDERLAND, S. **Nervios periféricos y sus lesiones**. 2.ed. Barcelona: Salvat; 1985.

TAGAMI, Y. et al. Axonal Regeneration Induced by Repetitive Electrical Stimulation of Crushed Optic Nerve in Adult Rats. **Jpn J Ophthalmol.**, v. 53, p. 257-266, 2009.

TEODORI, R. M. et al. Swimming exercise in the acute or late phase after sciatic nerve crush accelerates nerve regeneration. **Neural Plasticity**, p. 1-8, 2011.

THOMPSON, N. J.; SENGELAUB, D. R.; ENGLISH, A. W. Enhancement of peripheral nerve regeneration due to treadmill training and electrical stimulation is dependent on androgen receptor signaling. **Devel. Neurobio.**, v. 74, p. 531-540, 2014.

TOS, P. et al. Clinical applications of end-to-side neurorrhaphy: an update. **Biomed. Res. Int.**, p. 1-5, 2014.

UDINA, E.; PUIGDEMASA, A.; NAVARRO, X. Passive and active exercise improve regeneration and muscle reinnervation after peripheral nerve injury in the rat. **Muscle Nerve**, v. 43, p. 500-509, 2011a.

UDINA, E. et al. Effects of activity-dependent strategies on regeneration and plasticity after peripheral nerve injuries. **Annals of Anatomy**, p. 1-7, 2011b.

VAN MEETEREN, N. et al. Exercise training improves functional recovery and motor nerve conduction velocity after sciatic nerve crush lesion. **Arch Phys Med Rehabil.**, v. 78, p. 70-77, 1997.

VITERBO, F. et al. End-to-side neurorrhaphy with removal of the epineurial sheath: an experimental study in rats. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 94, p. 1038-1047, 1994.

VITERBO, F. **Neurorrafia término-lateral, estudo experimental no rato**. 1992, Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Medicina de Botucatu, Botucatu, 1992.

VITERBO, F.; FALEIROS, H.R.P. Técnicas de neurorrafia. In: MÉLEGA, J.M. **Cirurgia plástica: fundamentos e arte**. Rio de Janeiro: Medsi, 2002.p. 477-483.

WARD, A. R.; SHKURATOVA, N. Russian electrical stimulation: the early experiments. **Physical Therapy**, v. 82, p. 1019-1030, 2002.

WILHELM, J. C. et al. Cooperative roles of BDNF expression in neurons and Schwann cells are modulated by exercise to facilitate nerve regeneration. **J. Neurosci.**, v. 32, n. 14, p. 5002-5009, 2012.

WILLAND, M. P. et al. Electrical muscle stimulation after immediate nerve repair reduces muscle atrophy without affecting reinnervation. **Muscle Nerve**, v. 48, n. 2, p. 219-225, 2013.

WILLIAMS, H.B. The value of continuous electrical muscle stimulation using a completely implantable system in the preservation of muscle function following motor nerve injury and repair: an experimental study. **Microsurgery**, v.17, n. 11, p. 589-596, 1996.

XING, H.; ZHOU, M.; ASSINCK, P.; LIU, N. Electrical stimulation influences satellite cell differentiation following sciatic nerve crush injury in rats. **Muscle Nerve** (in press), 2014.

YARROW, J. F. et al. Training augments resistance exercise induced elevation of circulating brain derived neurotrophic factor (BDNF). **Neuroscience Letters**, v.479, p. 161-165, 2010.

YU, Q. et al. Functional motor nerve regeneration without motor-sensory specificity following end-to-side neurorrhaphy: an experimental study. **J Hand Surg**, v. 36A, p. 2010-2016, 2011.

ZHANG, B. et al. The effects of low frequency electrical stimulation on satellite cell activity in rat skeletal muscle during hindlimb suspension. **Cell Biology**, v. 87, n. 11, p. 1-9, 2010.

ZHANG, Z.; SOUCACOS, P. N.; BERIS, A. E. et al. Long –term evaluation of rat peripheral nerve repair with end-to-side neurorrhaphy. **Journal of Reconstructive Microsurgery**, v.16, n. 4, p. 303-311, 1999.

ZOLADZ, J. A. et al. Endurance training increases plasma brain-derived neurotrophic factor concentration in young healthy men. **JPhysiolPharmacol.**, v. 59, n. 7, p. 119-132, 2008.

ANEXO

unesp

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE BOTUCATU
FACULDADE DE MEDICINA

FACULDADE DE MEDICINA
FMB
BOTUCATU

CEEA
Comitê de Ética em Experimentação Animal

Criado através da Portaria DF nº 30 de 26/04/09

Certificado

Certificamos que o (Protocolo CEEA 967/2012) "Análise do exercício físico e eletroestimulação do músculo tibial cranial após neurectomia termino-lateral do nervo fibular em ratos", a ser conduzido por Vivian Cristina Rosa, orientada pelo Prof. Dr. Fausto Viterbo de Oliveira Neto, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), com a ressalva de que os "ratos" são provenientes de Biotério convencional, sem condições de atestar a Sanidade dos mesmos.

Projeto de Pesquisa aprovado em reunião da CEEA em 25/10/2012.

Maria Rosa Bet Moraes Silva
Profª Drª Maria Rosa Bet Moraes Silva
Presidente da CEEA

Alberto Santos Capelluppi
Alberto Santos Capelluppi
Secretário da CEEA

Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu - S.P. CEP: 18.616-970 Fone/Fax: (0xx14) 3811-6143 e-mail: secretaria_ceeda@fmb.unesp.br

**ANEXO A – CERTIFICADO DO COMITÊ DE ÉTICA DA UNESP DE BOTUCATU,
PROTOCOLO CEEA 967/2012.**