

UNIVERSIDADE DO SAGRADO CORAÇÃO

MARCELLA NICOLINI FURTADO

**EFEITO DA ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA COM
CORRENTE RUSSA NO REPARO MORFOLÓGICO
DO NERVO FIBULAR COMUM E NA RECUPERAÇÃO
FUNCIONAL DE RATOS APÓS NEURORRAFIA
TÉRMINO-LATERAL**

BAURU
2015

MARCELLA NICOLINI FURTADO

**EFEITO DA ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA COM
CORRENTE RUSSA NO REPARO MORFOLÓGICO
DO NERVO FIBULAR COMUM E NA RECUPERAÇÃO
FUNCIONAL DE RATOS APÓS NEURORRAFIA
TÉRMINO-LATERAL**

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.

BAURU
2015

F9921e

Furtado, Marcella Nicolini

Efeito da estimulação elétrica com corrente russa no reparo morfológico do nervo fibular comum e na recuperação funcional de ratos após neurraxia término-lateral / Marcella Nicolini Furtado. -- 2015.

37f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Geraldo Marco Rosa Junior.

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

1. Corrente Russa. 2. Eletroestimulação. 3. Músculo Tibial Cranial. 4. Nervo Fibular Comum. 5. Neurraxia Término-Lateral. I. Rosa Junior, Geraldo Marco. II. Título.

MARCELLA NICOLINI FURTADO

**EFEITO DA ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA COM CORRENTE RUSSA
NO REPARO MORFOLÓGICO DO NERVO FIBULAR COMUM E NA
RECUPERAÇÃO FUNCIONAL DE RATOS APÓS NEURORRAFIA
TÉRMINO-LATERAL**

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. Livre-docente Rogério Leone Buchaim
Universidade de São Paulo

Bauru, 25 de novembro de 2015.

Dedico este trabalho aos meus pais,
Valderez e Antonio.

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente aos meus pais, Valderéz Nicolini Furtado e Antonio Adelino Pina Furtado, por me proporcionarem um dos bens mais preciosos da vida que é o estudo, por investirem em mim, por acreditarem nos meus sonhos e estarem sempre ao meu lado em todos os momentos. Serei eternamente grata a vocês, pois são os responsáveis por todas as minhas realizações. Amo muito vocês! Obrigada!

Ao meu namorado, Guilherme Anchieta Costa, por todo apoio, paciência e incentivo. Te amo!

Ao meu orientador, Prof. Dr. Geraldo Marco Rosa Junior, pela confiança e ensinamentos e que, juntamente aos professores Carlos Henrique Fachin Bortoluci, Luis Henrique Simionato e Rodrigo Leal de Paiva Carvalho, me despertaram a paixão pela área acadêmica e pesquisa. Muito obrigada pela parceria e por me inspirarem. Todos são grandes mestres.

Ao Grupo de Estudos da Interação Mioneural, GEIM, em especial aos meus amigos Thais Caroline Pereira dos Santos, Tamara Carvalho, Alessandro Heubel, Juliana Brunetto, Carla Buêno, Letícia Casado e Julia Menezes por todo companheirismo, conversas, risadas, férias e feriados juntos compartilhando o mesmo amor pela pesquisa. Muito obrigada! Vocês serão eternamente especiais para mim!

Aos funcionários do Biotério por toda atenção e colaboração. Obrigada!

À Universidade do Sagrado Coração e aos professores do curso de Biomedicina pela minha formação pessoal e profissional. Muito obrigada!

RESUMO

Lesões de nervos periféricos podem levar a uma perda funcional elevada ao paciente. Por isso, estudos procuram sugerir e aprimorar técnicas cirúrgicas e tratamentos pós-cirúrgicos com a finalidade de minimizar o prejuízo e melhorar o desempenho de um músculo reinervado. A neurorrafia término-lateral (NTL) é uma técnica de grande importância que permite a utilização de qualquer nervo como nervo doador, sem que o mesmo sofra qualquer tipo de lesão ou perda funcional. A atrofia das fibras musculares é mais intensa nos períodos iniciais de desnervação e será determinada em função do tempo de regeneração axonal. A eletroestimulação minimizaria este quadro, induzindo reparo tecidual e aumentando a força muscular. Esta pesquisa teve como objetivo investigar a eficiência da estimulação elétrica com Corrente Russa, durante 45 dias, no reparo morfológico do nervo fibular comum e na recuperação funcional de ratos após neurorrafia término-lateral. Foram utilizados 50 ratos da linhagem Wistar, machos, com 80 dias de vida, fornecidos pelo Biotério Central da Universidade do Sagrado Coração (USC). Os animais foram divididos aleatoriamente em cinco grupos experimentais: Grupo Controle Inicial (GCI), Grupo Controle Final (GCF), Grupo Desnervado (GD), Grupo Experimental Não Tratado (GENT), Grupo Neurorrafia Término-Lateral com Estimulação Russa (GER). Foram realizadas avaliações funcionais e análises morfométricas do tecido nervoso dos ratos de todos os cinco grupos comparando a regeneração nervosa entre os grupos. Os resultados obtidos mostraram que o grupo GER apresentou diferença estatisticamente significativa quando comparado ao grupo GENT em relação à média das áreas das fibras nervosas ($21,38 \mu\text{m}^2 / 16,00 \mu\text{m}^2$) e das bainhas de mielina ($14,23 \mu\text{m}^2 / 10,32 \mu\text{m}^2$). Os grupos GER e GENT não apresentaram diferença na análise funcional da marcha. Baseado na metodologia utilizada pode ser concluído que houve regeneração axonal e melhora da mielinização das fibras nervosas. A Corrente Russa atuou positivamente na recuperação morfológica.

Palavras-Chave: Corrente Russa. Eletroestimulação. Músculo Tibial Cranial. Nervo Fibular Comum. Neurorrafia Término-Lateral.

ABSTRACT

Peripheral nerve injuries can lead to a high loss functional for the patient. Therefore, studies seek to suggest and improve surgical techniques and postsurgical treatments with the purpose to minimize the injury and improve the reinnervating muscle performance. The end-to-side neurorrhaphy (ESN) is a technique of great importance that allows the use of any nerve as a donor nerve, without the same suffer any kind of injury or loss functional. The muscle fibers atrophy is more intensive in the initial periods of denervation and will be determinate in function of the time of the axonal regeneration. The electric stimulation would prevent this case inducing tissue repair and increasing the muscle strength. This research aimed to investigate the efficiency of the Russian electrical stimulation, for 45 days, in the morphologic repair of the common peroneal nerve and the functional recovery of the rats after end-to-side neurorrhaphy. It was used 50 Wistar rats, males, with 80 days of age, provided by the Central Animal Facility of the Universidade do Sagrado Coração (USC). The animals were randomly divided into five experimental groups: Initial Control Group (ICG), Final Control Group (FCG), Denervated Group (DG), Experimental Untreated Group (EUG) and End-to-Side Neurorrhaphy with Russian Stimulation Group (RSG). It was realized functional assessments and morphometric analysis of the nervous tissue of the rats of the all five groups comparing the nervous regeneration between them. The results revealed that the RSG group showed a statistically significant difference when compared to EUG group associated to the average of the areas of nerve fibers ($21.38 \mu\text{m}^2 / 16.00 \mu\text{m}^2$) and myelin sheaths ($14.23 \mu\text{m}^2 / 10.32 \mu\text{m}^2$). The RSG and EUG groups showed no difference in the functional gait analysis. Based on the methodology employed can be concluded that there enhances axonal regeneration and myelination of nerve fibers. The Russian Current acted positively in the morphological recovery.

Keywords: Common Peroneal Nerve. Cranial Tibial Muscle. Electrical Stimulation. End-to-side Neurorrhaphy. Russian Current.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Animal sendo anestesiado.	15
Figura 2 – Procedimento cirúrgico.	16
Figura 3 – Exposição do nervo fibular comum.	16
Figura 4 – Neurorrafia Término-Lateral.	16
Figura 5 – Estimulador elétrico Endophasys R – KLD®	18
Figura 6 – Ratos encapsulados recebendo Estimulação Russa.	18
Figura 7 – Teste de marcha.	19
Figura 8 – Tricotomia do membro pélvico direito do animal.	20
Figura 9 - Realização da Eletroneuromiografia.....	20
Figura 10 – Eletromiógrafo Sapphire II 4ME.	21

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Média e desvio padrão da análise do Índice Funcional do Ciático (IFC).....	24
Tabela 2 – Média e desvio padrão dos registros da amplitude (mV) e latência (ms) da eletroneuromiografia.....	25
Tabela 3 – Média (μm^2) e desvio padrão da área das fibras nervosas e média (μm) e desvio padrão do diâmetro menor das fibras nervosas.	26
Tabela 4 – Média (μm^2) e desvio padrão da área dos axônios e média (μm) e desvio padrão do diâmetro menor dos axônios.....	27
Tabela 5 – Média (μm^2) e desvio padrão das áreas das bainhas de mielina e média (μm) e desvio padrão das espessuras das bainhas de mielina.....	28

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	OBJETIVOS	13
3	METODOLOGIA	14
3.1	Animais	14
3.2	Grupos experimentais	14
3.3	Cirurgia	15
3.4	Estimulação Elétrica	17
3.5	Teste de Marcha.....	19
3.6	Teste Eletrofisiológico	20
3.7	Coleta das peças histológicas e eutanásia	22
3.8	Processamento histológico dos segmentos de nervo	22
3.9	Digitalização das imagens das lâminas histológicas de nervos.....	22
3.10	Medidas de área, diâmetro mínimo e contagem total das fibras nervosas	23
3.11	Análise Estatística.....	23
4	RESULTADOS	24
4.1	Análise Funcional da Marcha.....	24
4.2	Análise Eletrofisiológica	25
4.3	Áreas e Diâmetros das Fibras Nervosas.....	26
4.4	Áreas e Diâmetros dos Axônios	27
4.5	Áreas e Espessuras das Bainhas de Mielina.....	28
5	DISCUSSÃO	29
6	CONCLUSÃO	32
	REFERÊNCIAS	33
	ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA	37

1 INTRODUÇÃO

Lesões nervosas periféricas são comuns e podem levar a uma perda funcional muito alta para o paciente. Por isso, muitas pesquisas buscam aprimorar técnicas cirúrgicas e tratamentos pós-cirúrgicos com a finalidade de minimizar a perda funcional do mesmo. (SATO, 2005).

Os nervos periféricos são suscetíveis a diversos tipos de doenças, como as de etiologia traumática, neoplásica, inflamatória, metabólica e genética. (GIROLAMI; ANTHONY; FROSCHE, 2000). Dentre as principais causas que envolvem as doenças traumáticas destacam-se os acidentes entre veículos automobilísticos, principalmente os que envolvem motociclistas. Quedas, lesões por projéteis de armas de fogo, lesões por esmagamento, facadas e fraturas também são comuns. (CASTILLO-GALVÁN et al., 2014; KOUYOUMDJIAN, 2006). Essas doenças são responsáveis pelo desenvolvimento de diferentes tipos e graus de lesões. (LUNDBORG, 2000; POLITIS; EDERLE; SPENCER, 1982).

Relacionada com o envolvimento anatômico do nervo e os achados clínicos após as injúrias, as lesões no nervo periférico, segundo Seddon (1943), são classificadas em três níveis: neuropraxia (lesão tipo I), caracterizada por bloqueio localizado da condução elétrica, sem interrupção da continuidade axonal ou degeneração; axonotmese (lesão tipo II), no qual ocorre ruptura na continuidade do axônio e da bainha de mielina, porém os tubos endoneurais permanecem intactos; e neurotmese (lesão tipo III), no qual ocorre ruptura de uma ou mais camadas de tecido conectivo do nervo periférico, caracterizando-se por uma lesão de pior prognóstico.

Essas lesões também podem ser classificadas em cinco graus diferentes segundo Sunderland (1951): o primeiro grau equivale à neuropraxia; o segundo, à axonotmese com lesão axonal; o terceiro trata-se de uma lesão endoneural; o quarto refere-se a uma lesão perineural; e, por fim, o quinto grau, equivalente à neurotmese (lesão epineural).

Pelo fato da classificação de Seddon (1943) ser simples, é apenas relevante aos eletrofisiologistas, enquanto a de Sunderland é a mais utilizada por médicos cirurgiões a fim de avaliar a melhor opção de cirurgia de reparo. (CHHABRA et al., 2014).

No reparo de lesões nervosas periféricas, quando se dispõem dos cotos proximais e distais, a neurorafia término-terminal (NTT) é frequentemente utilizada para fazer a união dos cotos do nervo lesado através de uma sutura. (CHEN et al., 2015; ROVAK; CEDERNA; KUZON, 2001).

Viterbo (1992) sugeriu a técnica da neurografia término-lateral sem a remoção do epineuro (VITERBO et al., 1994) e sem qualquer tipo de lesão ou prejuízo funcional ao nervo doador. Através de uma pesquisa experimental realizada em ratos, Viterbo (1992) seccionou o nervo fibular comum, innervado ao músculo tibial cranial (MTC), e suturou seu coto distal à face lateral do nervo tibial. Foi observada reinervação muscular sem lesão ao nervo doador. A partir desta técnica foi comprovado que um nervo doador pode ser qualquer nervo, sem que ele apresente diminuição na sua função e sem lesão nas estruturas por ele innervadas.

As fibras musculares atrofiam com mais intensidade nos períodos iniciais de desnervação. Nos primeiros 60 dias, a área de secção transversal média de uma fibra pode sofrer redução de até 70%. Durante o processo de desnervação, a porcentagem de diminuição do diâmetro da fibra muscular é maior em relação à de perda de peso muscular. Esta diferença é explicada pelo aumento de tecido conjuntivo, compensando a maior atrofia das fibras. (SUNDERLAND; RAY, 1950).

O uso da eletroestimulação com finalidade regenerativa ainda é controverso para muitos autores. (CARVALHO et al., 2002; IÑIGO, 1998; KANAYA; TAJIMA, 1992; KOTWAL; SCHMIDT, 2001; NEMETH, 1982; SOUZA; DEL CARLO; VILORIA, 2001; WILLIAMS, 1996). Contudo, sua aplicação passou a ser avaliada na recuperação funcional muscular, pois pode ser utilizada como método de prevenção da atrofia muscular, causada por um prejuízo ao movimento voluntário, devido à desnervação ou lesões nervosas. (RODRIGUES; QUINTILIANO; CHINGUI, 2011; ROSA JUNIOR et al., 2013).

Atualmente já é aceita e demonstrada em estudos experimentais e clínicos o uso da estimulação elétrica para induzir o reparo tecidual (HOUGHTON et al., 2010), reduzir a rigidez articular, aumentar a força e tolerância muscular, diminuir o edema e aliviar a dor (KITCHEN, 2003; NUNES; PEDRO, 2012; SANTOS; SOUZA; SANTOS, 2013), por possuir efeitos analgésicos, vasculares e cicatriciais. (ARTIOLI et al., 2011).

A eletroestimulação, em períodos anteriores à década de 1970, era utilizada como uma terapia auxiliar na reeducação muscular de pacientes com distúrbios neurológicos. Contudo, após esse período, a então “Corrente Russa” foi introduzida e utilizada, principalmente, para ganhos de desempenho muscular e também como um complemento para o seu fortalecimento. (DELITTO, 2002).

A Corrente Russa é uma corrente alternada de média frequência de 2.500 Hz, que pode ser modulada em frequências de 30 e 100 Hz, com um ciclo de trabalho de 50% (BORGES, 2006; ROBERTSON et al., 2009), que, devido a essas características, consegue ultrapassar as

camadas da epiderme com certa facilidade sendo eficaz na estimulação de nervos motores. (COHEN; ABDALLA, 2005; ROBERTSON et al., 2009).

Como no caso do nervo isquiático em ratos, em que o animal é submetido à análise da marcha, o estudo da regeneração nervosa e da recuperação de um músculo após neurorrafia pode ser realizado pela observação das alterações histológicas, pela medida da velocidade de condução elétrica, pela análise eletromiográfica ou pela resposta isométrica do músculo submetido à contração tetânica. (BAIN; MACKINNON; HUNTER, 1989; De MEDINACELI et al., 1982; SATO, 2005).

2 OBJETIVOS

Objetivo Geral

Investigar a eficiência da estimulação elétrica com Corrente Russa, durante 45 dias, no reparo morfológico do nervo fibular comum e na recuperação funcional de ratos após neurografia término-lateral.

Objetivos Específicos

Verificar se os dados morfológicos e funcionais apresentam resultados semelhantes.

Verificar se o uso da eletroestimulação potencializa a recuperação funcional de ratos após cirurgia de neurografia término-lateral.

3 METODOLOGIA

Este trabalho foi realizado no Laboratório da Universidade do Sagrado Coração (USC) (cirurgia, aplicação da estimulação elétrica e análise da marcha) e no Laboratório da Faculdade de Medicina da Universidade Estadual de São Paulo (UNESP - Campus Botucatu) (eletro-neuromiografia, eutanásia dos animais, coleta das peças histológicas e morfometria). O projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa, conforme o protocolo número 24/13.

3.1 Animais

Todos os procedimentos realizados estiveram de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), que receberam o protocolo após análise do Comitê de Ética.

Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central da USC – Universidade do Sagrado Coração – campus Bauru. Foram utilizados 50 ratos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Wistar, machos, com 80 dias de vida, divididos em 5 grupos experimentais.

3.2 Grupos experimentais

Os ratos foram divididos aleatoriamente e agrupados em 10 animais para cada grupo: Grupo Controle Final (GCF), Grupo Experimental Não Tratado (GENT), Grupo Neurorrafia Término-Lateral com Estimulação Russa (GER), Grupo Desnervado (GD) e Grupo Controle Inicial (GCI).

No Grupo Desnervado (GD), o nervo fibular comum foi seccionado e seus cotos invertidos 180 graus. O coto distal foi fixado à musculatura subjacente, e o coto proximal foi transpassado por uma incisão na musculatura glútea e suturado no plano subcutâneo a fim de impedir contaminação motora. Este grupo não recebeu tratamento pós-cirúrgico.

No Grupo Neurorrafia Término-Lateral com Estimulação Russa (GER), o nervo fibular comum foi seccionado e seu coto proximal encurvado medialmente 100 graus, a musculatura adjacente foi transfixada e foi suturado na face superficial dessa musculatura, impedindo dessa forma, a regeneração espontânea. O coto distal do nervo fibular comum foi encurvado, aproximadamente 80 graus, e suturado lateralmente ao nervo tibial. Após a cirurgia, os animais receberam estimulação elétrica com Corrente Russa no músculo tibial cranial como parte do tratamento.

No Grupo Experimental Não Tratado (GENT), os animais passaram pelo processo cirúrgico da Neurorrafia Término-Lateral, porém não receberam nenhum tipo de tratamento.

Os animais dos grupos controles Inicial e Final (GCI e GCF) não passaram por nenhuma intervenção cirúrgica e não receberam tratamento pós-cirúrgico.

Apenas os animais do GCI foram eutanasiados com 80 dias de vida. Os demais (GCF, GD, GENT e GER) foram eutanasiados após 45 dias, ou seja, com 125 dias de vida.

3.3 Cirurgia

Todos os procedimentos cirúrgicos e de coleta foram realizados pelo pesquisador, padronizando-se, dessa forma, o método. Para cada procedimento cirúrgico, os animais foram anestesiados com uma combinação das drogas Ketamina (80 mg/kg) e Xilasina (10 mg/kg), intraperitoneal, e realizada tosquia (Figura 1).

Figura 1 – Animal sendo anestesiado.



Fonte: Elaborado pela autora.

A cirurgia foi realizada na face dorso-lateral do membro posterior direito (Figura 2) com incisão de 2 a 3 cm longitudinalmente ao maior eixo do membro, comprometendo pele e tecido subcutâneo com posterior divulsão da musculatura, até exposição do nervo fibular comum (Figura 3).

Figura 2 – Procedimento cirúrgico.



Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 3 – Exposição do nervo fibular comum.



Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 4 – Neurorrafia Término-Lateral.



Fonte: Elaborado pela autora.

As cirurgias foram realizadas com o auxílio de microscópio cirúrgico DF Vasconcelos com aumentos de 10 e 16 vezes.

As neurorrafias (Figura 4) foram realizadas com fio monofilamentar de nylon 10-0 com agulha cilíndrica e circular, sem retirada de janela de epineuro e com dois pontos

simples. Após o procedimento, a incisão foi suturada por planos com pontos simples utilizando-se fio monofilamentar de nylon 4-0 na musculatura e pele.

Os animais foram mantidos em caixas apropriadas, contendo cinco animais cada, em temperatura controlada ($25 \pm 2^\circ\text{C}$), ciclo claro-escuro de 12 horas, com ração e água *ad libitum*, até o momento da eutanásia.

No pós-operatório, os animais foram observados quanto à dor, considerando os seguintes sinais: vocalização, piloereção, postura encurvada, hipotermia, descarga ocular (cromodacriorréia), ato de lambar-se, maior agressividade, relutância em interagir, alteração no consumo de água e alimentos e por último, a perda de peso. A analgesia pós-operatória foi feita com acetaminofenol (paracetamol) 2 mg/mL de água na água do bebedouro até não haver mais sinais de dor.

3.4 Estimulação Elétrica

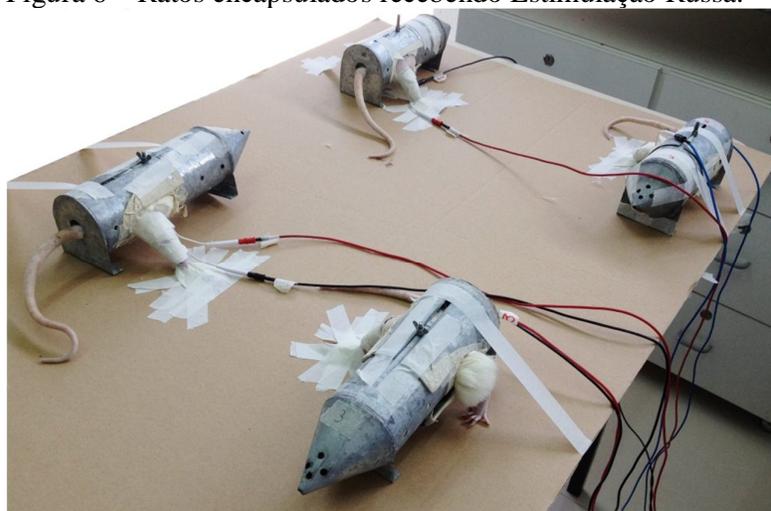
A estimulação elétrica teve início após cinco dias de pós-operatório. Os animais do grupo GER foram submetidos a três sessões semanais durante os 45 dias, totalizando 18 sessões. O músculo tibial cranial recebeu estimulação elétrica com Corrente Russa, com frequência portadora (Carrier) de 2.500 Hz, com burst de 4 milissegundos, com tempo de contração de 9 segundos por 18 segundos de relaxamento. Primeiramente foi utilizada a frequência de 30 Hz durante 10 minutos para estimular as fibras vermelhas, que são as fibras de contração lenta, e, posteriormente, a frequência de 100 Hz, por 10 minutos, para estimular as fibras brancas de contração rápida, totalizando os 20 minutos de estimulação elétrica. A corrente inicial foi àquela suficiente para promover a contração muscular. Foi utilizado estimulador elétrico Endophasys R – KLD[®] (Figura 5).

Figura 5 – Estimulador elétrico Endophasys R – KLD®



Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 6 – Ratos encapsulados recebendo Estimulação Russa.



Fonte: Elaborado pela autora.

Os animais foram estimulados acordados e sem anestesia. Para isto foi utilizada uma cápsula metálica com abertura posterior para a cauda e duas aberturas laterais para fixação dos membros posteriores (Figura 6). Após esta imobilização, os eletrodos de um centímetro quadrado de área foram fixados sobre o ventre dos músculos. Para aplicação da estimulação elétrica foram usados eletrodos autoadesivos. Foram utilizadas 4 cápsulas ao mesmo tempo, para otimizar o trabalho da estimulação.

3.5 Teste de Marcha

Antes dos animais serem eutanasiados para coleta do material, foram submetidos à avaliação funcional. Para esta avaliação, os animais, um a um, atravessaram uma caixa de acrílico (Figura 7) no qual foi fixada uma régua milimetrada na sua parte inferior. A caminhada foi registrada por uma câmera filmadora posicionada abaixo da caixa, e as impressões da marcha foram digitalizadas para posterior análise. Este procedimento foi repetido duas vezes com cada animal. A distância entre as impressões dos membros posteriores foi avaliada segundo a equação descrita por Bain, Mackinnon e Hunter (1989), com base nos estudos de De Medinaceli, Freed e Wyatt (1982). As impressões com dificuldades de serem avaliadas foram descartadas, e as demais escaneadas e digitalizadas, obedecendo a um padrão de calibração para cada imagem. As medições foram feitas com auxílio do programa Image Pro-plus 4.6.2, e os dados obtidos foram submetidos ao tratamento estatístico obedecendo ao índice de $p \leq 0,05$ para todas as amostras.

Figura 7 – Teste de marcha.



Fonte: Elaborado pela autora.

3.6 Teste Eletrofisiológico

Para a realização do teste eletrofisiológico, antes da eutanásia dos animais, a temperatura ambiente foi mantida em torno de 25°C.

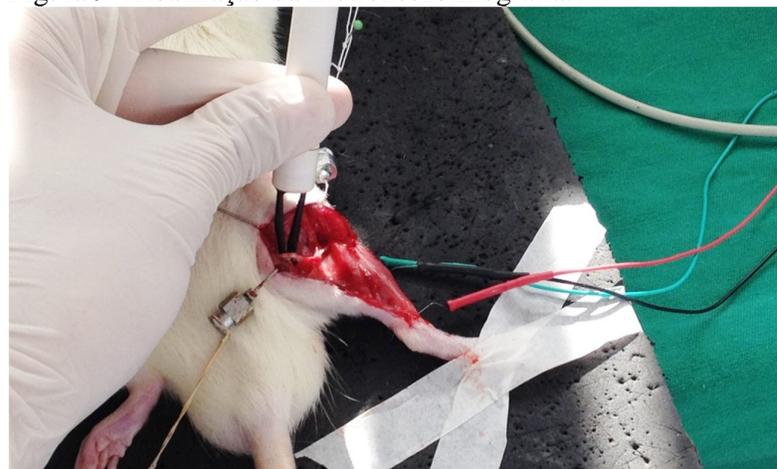
Figura 8 – Tricotomia do membro pélvico direito do animal.



Fonte: Elaborado pela autora.

Após anestesia com ketamina (80 mg/kg) e xilasina (10 mg/kg) intramuscular, os animais foram imobilizados em decúbito ventral. Foram realizadas tricotomia (Figura 8) e ampla incisão no membro posterior previamente operado, permitindo acesso aos nervos isquiático, fibular comum e tibial, e músculo tibial cranial. O potencial de ação composto foi registrado por eletrodos de agulha ativo e de referência.

Figura 9 - Realização da Eletroneuromiografia.



Fonte: Elaborado pela autora.

O eletrodo vermelho (referência) foi colocado no tendão do músculo tibial cranial do rato; o eletrodo preto (ativo), no ventre do músculo tibial cranial do rato, e o eletrodo verde (dispersivo), introduzido em local distante da região estudada (Figura 9).

Os eletrodos registraram a área, a duração, a amplitude e a latência do potencial de ação muscular. Foram realizados três conjuntos de medidas para cada animal com o nervo tibial intacto e mais três com a porção do nervo tibial seccionado distalmente à NTL, sendo escolhido um conjunto com o nervo tibial intacto e um conjunto com o nervo tibial seccionado, aquele que apresentava a maior amplitude registrada.

Figura 10 – Eletromiógrafo Sapphire II 4ME.



Fonte: Elaborado pela autora.

A avaliação das propriedades funcionais do músculo foi através 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 ou tibial, proximalmente à neurorafia, 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 grupos. Foi utilizado eletromiógrafo da marca Sapphire II 4ME (Figura 10).

3.7 Coleta das peças histológicas e eutanásia

Após a realização dos procedimentos cirúrgicos, os animais receberam dose letal de 150 mg/kg de pentobarbital sódico e lidocaína a 2% (10 mg/mL), administrados intraperitonealmente.

Os segmentos de nervo coletados foram fixados e mantidos em solução de Karnovsky e refrigerados a 4°C até o momento do processamento histológico.

3.8 Processamento histológico dos segmentos de nervo

Após fixação por período superior a 24 horas em solução de Karnovsky, e lavagem em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,3), por três vezes, com duração de cinco minutos cada vez, os segmentos de nervo sofreram pré-coloração com tetróxido de ósmio (1:1) por duas horas. Após nova lavagem com tampão fosfato, foi realizada desidratação por uma bateria de concentrações crescentes de acetona (50%, 70%, 90% e 100%). A inclusão em resina Araldite[®] foi realizada em duas etapas: em solução de resina e acetona (1:1), permanecendo por 24 horas em dessecador; e em resina, após 10 minutos em dessecador, permanecendo em estufa a 37°C por uma hora. O emblocamento foi realizado posicionando-se o segmento de nervo em resina Araldite[®] e mantido em estufa a 60°C por 48 horas para polimerização. Antes do corte histológico os blocos foram preparados para o corte através da eliminação do excesso de resina ao redor do segmento de nervo com auxílio de uma lupa Carl Zeiss Jema adaptada, em aumento de 1,6 x, e lâmina Gillette[®]. Após o corte, a lâmina foi aquecida sobre uma chapa a 45°C para secagem e pré-aderência. A seguir, a lâmina permaneceu em estufa a 60°C por 12 horas para aderência do corte à lâmina de vidro.

A coloração foi realizada manualmente, lâmina por lâmina, com azul de toluidina 1% durante 5 minutos. Após a secagem, a lamínula foi colada e a lâmina identificada com o número de registro no laboratório.

3.9 Digitalização das imagens das lâminas histológicas de nervos

As imagens foram capturadas por um *scanner* de Imagens *Scan Scope (Aperio)* e salvas em notebook DELL, 8 GB DDR, HD 1 TB.

Foi utilizado aumento de 200 vezes para a análise das fibras nervosas e foram salvas duas imagens de cada corte histológico para que se possa obter com isso, a totalidade do nervo.

3.10 Medidas de área, diâmetro mínimo e contagem total das fibras nervosas

As imagens digitalizadas e salvas foram analisadas através de medidas de área, diâmetro mínimo, número de fibras e espessura e área da bainha de mielina.

As medidas foram feitas de modo semiautomático utilizando-se *software* Sigma Pro Image Analysis, versão 5, da Jandel Scientific Corporation.

Foram realizadas as medidas da área e diâmetro mínimo da fibra nervosa e do axônio. A medida da área da bainha de mielina foi obtida subtraindo-se a área axonal da área da fibra nervosa, e a espessura da bainha de mielina foi obtida subtraindo-se o diâmetro mínimo do axônio do diâmetro mínimo da fibra e dividindo-se por dois. Foi realizada contagem do número total de fibras nos segmentos N1.

Os resultados obtidos de área e diâmetro mínimo axonal foram organizados em uma tabela e, então, calculada a média das medidas obtidas para cada animal. A partir destas médias, foi realizada a análise estatística para comparação entre os grupos.

3.11 Análise Estatística

Quando comparados os grupos, foi utilizado o teste de análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste de TUKEY, quando detectada diferença significativa. Para comparação entre o nervo fibular comum experimental e normal foi utilizado Teste T pareado. Em todas as análises, foi utilizado o nível de significância $p \leq 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Análise Funcional da Marcha

As médias dos resultados da análise do Índice Funcional do Ciático (IFC) dos animais dos grupos CGI, GENT, GCF, GD e GER podem ser observados na Tabela 1:

Tabela 1 – Média e desvio padrão da análise do Índice Funcional do Ciático (IFC).

Análise Funcional		
	Média	DP
GCI	-11,12 ^a	2,77
GENT	-20,08 ^a	2,62
GCF	-9,51 ^a	2,30
GD	-54,05 ^b	4,49
GER	-23,25 ^a	1,86

Fonte: Elaborado pela autora.

Nota: Letras diferentes indicam diferença estatística.

A média dos resultados da análise do Índice Funcional do Ciático (IFC) mostrou que o GER (-23,25) apresentou uma diferença estatisticamente significativa quando comparado ao GD (-54,05), entretanto, apresentou semelhança com o GENT (-20,08).

4.2 Análise Eletrofisiológica

Os resultados das eletroneuromiografias realizadas pré-eutanásia nos animais dos grupos GCI, GENT, GCF, GD e GER estão representados na Tabela 2:

Tabela 2 – Média e desvio padrão dos registros da amplitude (mV) e latência (ms) da eletroneuromiografia.

	Amplitude		Latência	
	Média	DP	Média	DP
GCI	19,30 ^a	0,99	1,69 ^a	0,03
GENT	6,68 ^b	0,63	1,87 ^a	0,05
GCF	20,23 ^a	2,01	1,66 ^a	0,04
GD	0 ^c	0	1000 ^b	0
GER	16,12 ^d	0,99	1,85 ^a	0,02

Fonte: Elaborado pela autora.

Nota: Letras diferentes indicam diferença estatística.

A média dos resultados de amplitude (mV) demonstrou que o GCI (19,30 mV) e o GCF (20,23 mV) obtiveram resultados semelhantes e maiores que os demais grupos.

O GER (16,12 mV) apresentou dados melhores quando comparado ao GENT (6,68 mV).

Em relação à média dos resultados de latência (ms), não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos GCI (1,69 ms), GENT (1,87 ms) e GCF (1,66 ms). Para o GD, o valor atribuído de 1000 ms foi apenas para análise estatística, visto que o músculo não apresentou resposta devido ao procedimento cirúrgico de desnervação.

4.3 Áreas e Diâmetros das Fibras Nervosas

Tabela 3 – Média (μm^2) e desvio padrão da área das fibras nervosas e média (μm) e desvio padrão do diâmetro menor das fibras nervosas.

	Áreas das Fibras Nervosas		Diâmetros das Fibras Nervosas	
	Média	DP	Média	DP
GCI	20,12 ^{ab}	2,18	3,22 ^a	0,39
GENT	16,00 ^a	3,55	4,05 ^{ab}	0,56
GCF	50,76 ^c	3,27	8,59 ^c	0,55
GD	0 ^d	0	0 ^d	0
GER	21,38 ^b	1,81	4,88 ^b	0,93

Fonte: Elaborado pela autora.

Nota: Letras diferentes indicam diferença estatística.

Como observados na Tabela 3, os valores obtidos das médias das áreas das fibras nervosas mostram que o GER (21,38 μm^2) apresentou melhores resultados quando comparado ao GENT (16,00 μm^2), entretanto, nenhum grupo alcançou os dados apresentados pelo GCF (50,76 μm^2).

Na análise do diâmetro das fibras nervosas, os grupos GER (4,88 μm) e GENT (4,05 μm) não apresentaram diferença significativa, e os valores apresentados são menores que do que o GCF (8,59 μm).

4.4 Áreas e Diâmetros dos Axônios

Tabela 4 – Média (μm^2) e desvio padrão da área dos axônios e média (μm) e desvio padrão do diâmetro menor dos axônios.

	Áreas dos Axônios		Diâmetros dos Axônios	
	Média	DP	Média	DP
GCI	7,05 ^a	1,19	1,97 ^a	0,47
GENT	5,68 ^a	0,74	2,57 ^{ab}	0,39
GCF	15,06 ^b	1,24	4,77 ^c	0,59
GD	0 ^c	0	0 ^d	0
GER	7,15 ^a	1,28	2,83 ^b	0,37

Fonte: Elaborado pela autora.

Nota: Letras diferentes indicam diferença estatística.

Na Tabela 4 podem ser observados que os valores obtidos das médias das áreas e diâmetro dos axônios mostram que o GER e o GENT apresentaram semelhança nos resultados. Na análise da área, os valores foram de 7,15 μm^2 e 5,68 μm^2 , no diâmetro, os valores foram de 2,83 μm e 2,57 μm , respectivamente. Nenhum dos grupos apresentou resultado semelhante ao GCF.

4.5 Áreas e Espessuras das Bainhas de Mielina

Tabela 5 – Média (μm^2) e desvio padrão das áreas das bainhas de mielina e média (μm) e desvio padrão das espessuras das bainhas de mielina.

	Área da Bainha de Mielina		Espessura da Bainha de Mielina	
	Média	DP	Média	DP
GCI	7,43 ^a	1,12	1,52 ^a	0,42
GENT	10,32 ^a	3,28	1,48 ^a	0,63
GCF	35,70 ^b	3,93	3,82 ^b	0,80
GD	0 ^c	0	0 ^c	0
GER	14,23 ^d	2,67	2,05 ^a	0,77

Fonte: Elaborado pela autora.

Nota: Letras diferentes indicam diferença estatística.

Ao se avaliar as médias das áreas das bainhas de mielina, o GER (14,23 μm^2) apresentou resultado superior ao GENT (10,32 μm^2). Na avaliação da espessura, os mesmos grupos apresentam resultados semelhantes (2,05 μm e 1,48 μm), respectivamente. Nas duas variáveis analisadas, os grupos citados apresentaram valores inferiores ao GCF.

5 DISCUSSÃO

A metodologia utilizada foi padronizada e os procedimentos cirúrgicos realizados por um único operador, garantindo uma maior confiabilidade e precisão nos resultados obtidos das variáveis analisadas.

O modelo animal utilizado para esta pesquisa foram ratos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Wistar. São animais com baixo custo de criação, possuem um ciclo biológico curto e, por serem de pequeno porte, são de fácil manipulação. (MATTARAIA; MOURA, 2012). O *Rattus norvegicus* possui um genoma conhecido e similaridade gênica com seres humanos, por isso é muito utilizado em pesquisas científicas. (RAT GENOME SEQUENCING PROJECT CONSORTIUM, 2004).

Para evitar interferências hormonais causadas pela ação dos hormônios adenohipofisários e gonadais decorrentes do ciclo estral presente em fêmeas, o que influenciaria nos resultados da pesquisa, foram utilizados preferencialmente apenas ratos machos. (CARANDENTE, 1989).

Os estudos das lesões nervosas periféricas tiveram um grande avanço na época das Guerras Civis e Segunda Guerra Mundial (SIQUEIRA, 2007), e foi a partir desse contexto que surgiram suas três classificações, em 1943, segundo Seddon: neuropraxia, axonotmese e neurotmese. Neste trabalho foi induzida uma lesão do tipo neurotmese.

Sabe-se que essas lesões acarretam em perda funcional e sensitiva para o paciente, por isso, para minimizar essas perdas, diversas pesquisas são feitas em busca do aprimoramento de técnicas cirúrgicas e tratamentos pós-operatórios. (SATO, 2005).

É notável que a neurorrafia término-lateral alcança resultados clinicamente eficientes (FREY; GIOVANOLI, 2003), por isso sua eficácia tem levado aos ensaios clínicos a utilização dessa técnica de cirurgia (GEUNA; PAPALIA; TOS 2006), por tratar-se de uma proposta de tratamento no reparo de lesões nervosas periféricas, principalmente pela obtenção de um reestabelecimento nervoso e crescimento axonal. (DONG et al., 2013; GAO et al., 2015; LIU et al., 2015; PAPALIA et al., 2012).

Viterbo et al. (2012) compararam dois novos métodos abraçantes de sutura de neurorrafia término-lateral com seu método tradicional: (1) um com a extremidade do coto distal do nervo fibular comum dividido longitudinalmente em duas partes, com seus axônios removidos, resultando em abas epi-perineuro as quais foram suturadas “abraçando” o nervo tibial; (2) e o outro, suturado ao nervo fibular comum, “abraçou” com um ponto único de nylon o nervo tibial. Ao final foi concluído que os três tipos de neurorrafias não apresentaram diferenças relacionadas à massa muscular e ao número de fibras nervosas. Por isso, para essa

pesquisa, foi utilizada a neurografia término-lateral tradicional, coto distal suturado na face lateral do nervo tibial, por tratar-se de uma técnica mais simples e com menor possibilidade de dano ao nervo doador por erro cirúrgico.

A estimulação elétrica é uma alternativa muito utilizada no ambiente clínico com o objetivo de potencializar a regeneração nervosa e a ação muscular, evitando e/ou melhorando o quadro de atrofia devido à lesão. Além disso, a manutenção da atividade muscular aumenta a liberação de fator trófico, que age sobre os neurônios em regeneração, modulando a plasticidade neuronal. (UDINA; PUIGDEMASA; NAVARRO, 2011).

Segundo a pesquisa realizada por Alves (2012), o tratamento com estimulação elétrica estimulou as propriedades biomecânicas (tensão máxima, rigidez e deformidade relativa) do músculo e promoveu uma modulação da deposição do colágeno fibrilar.

A Estimulação Russa consiste em uma corrente de média frequência alternada de 2.500 Hz (BORGES, 2006) que foi introduzida na década de 1970 para fins eletroterapêuticos e, posteriormente, utilizada como um tratamento complementar. (DELITTO, 2002). Os principais empregos clínicos da Corrente Russa são para fortalecimento e contração muscular como resposta motora (ROBERTSON et al., 2009), e por estar em uma faixa de alcance biológico de estímulo (entre 0,1 e 200 Hz), a estimulação torna-se relativamente confortável. (NELSON et al., 2003).

Na pesquisa realizada por Maciel et al. (2013), também foram utilizados ratos submetidos à neurografia término-lateral (grupo experimental) os quais receberam eletroestimulação com uma corrente de 1 KHz. Foi observado que o grupo que recebeu a eletroestimulação obteve uma melhora do Índice Funcional do Fibular maior em relação ao grupo não estimulado, 60,5% e 9,5%, respectivamente. Também foi notado que os ratos submetidos à neurografia com estimulação elétrica alcançaram resultados semelhantes aos dos ratos do grupo controle. A força muscular foi outro fator que contribuiu para a melhora funcional, sendo que o grupo experimental estimulado teve resultado estatisticamente significativo ao grupo não estimulado. Neste trabalho pode ser notado que o grupo tratado (GER) e o grupo não tratado (GENT) obtiveram semelhança estatística em relação à Análise Funcional da Marcha (Índice Funcional do Ciático), com resultados de -23,25 e -20,08, respectivamente.

Rosa Junior et al. (2013) utilizaram uma corrente elétrica de baixa frequência em ratos desnervados com propósito de manutenção dos aspectos morfológicos dos músculos Sóleo e EDL. Morfológicamente foi observado que a eletroestimulação minimizou a atrofia muscular dos animais com uma diferença estatisticamente significativa ao se comparar aos não tratados.

O grupo eletroestimulado foi o que mais se aproximou do grupo controle final, destacando a utilidade do tratamento para reparo de lesões nervosas periféricas.

Outra variável utilizada para o tratamento de lesões nervosas periféricas é a laserterapia. Sabe-se que a irradiação do laser interfere na função do nervo, aumentando a velocidade da condução do impulso nervoso (ENDO et al., 2008), o que traz uma melhoria ao quadro clínico do paciente. É também uma técnica muito vantajosa por ser não invasiva, com habilidade de irradiar nervos lesionados proporcionando uma elevação do metabolismo dos neurônios e um aumento da produção de mielina pelas células de Schwann. (REIS et al., 2008).

A eletroneuromiografia estuda os sistemas nervoso periférico e muscular, avaliando a integridade funcional dos neurônios motores periféricos, sensitivos, das placas mioneurais e dos músculos. (FALOPPA; LEITE, 2013). É um exame complementar de grande importância que permite avaliar, por exemplo, a intensidade da lesão (MURADE; NETO; AVANZIO, 2002), buscando prevenir as deficiências associadas às lesões nervosas. (ESER et al., 2009).

Maciel et al. (2013), observaram um aumento do diâmetro mínimo das fibras nervosas no grupo experimental em relação ao não tratado (8,42 μm e 7,19 μm), respectivamente, o que nesta pesquisa não foi encontrado diferenças estatisticamente significantes entre GER e GENT (4,88 μm e 4,05 μm), respectivamente. Eles também encontraram resultados superiores no grupo experimental em relação ao não tratado na variável da área da bainha de mielina (58,39 μm^2 e 40,86 μm^2), respectivamente, assim como nesta pesquisa em relação ao GER e GENT (14,23 μm^2 e 10,32 μm^2), respectivamente.

Endo et al. (2008) realizaram uma pesquisa utilizando a laserterapia de baixa potência para acelerar a regeneração de nervos periféricos lesionados, e notaram uma melhora no Índice Funcional do Ciático (IFC) tanto nos grupos experimentais quanto nos controles (69% e 45%), respectivamente. Enquanto os resultados desta pesquisa foram de -23,25 e -20,08 para o GER e GENT, respectivamente. Endo et al. (2008) também observaram que houve um aumento na densidade das fibras dos grupos experimentais e uma diminuição nos grupos controle, com uma diferença significativa ($p=0,001$) entre ambos. Neste trabalho também foi observado um aumento da área das fibras nervosas do GER em relação ao GENT (21,38 μm^2 e 16,00 μm^2), respectivamente, contudo não houve diferença estatisticamente significando ao comparar o GER em relação ao GCI (20,12 μm^2).

Por este trabalho não ter alcançado resultados funcionais satisfatórios, sugere-se que trabalhos futuros sejam realizados com tempo maior de tratamento pós-cirúrgico.

6 CONCLUSÃO

Baseado na metodologia utilizada pode ser concluído que houve regeneração axonal e melhora da mielinização das fibras nervosas.

Com base nas variáveis morfológicas estudadas, pudemos concluir que a Corrente Russa atuou positivamente na recuperação morfológica.

Os grupos GER e GENT não apresentaram diferença na análise funcional da marcha.

REFERÊNCIAS

- ALVES, E. S. **Efeito do uso da estimulação elétrica muscular durante o processo de reparação tecidual graus distintos de axotmese experimental do nervo ciático de ratos**. 2012. 97 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.
- ARTIOLI, D. P. et al. O uso da corrente polarizada na Fisioterapia. **Rev Bras Clin Med**, São Paulo, v. 9, n. 6, p. 428-431, 2011.
- 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. 83, n. 1, p. 129-136, 1989.
- BORGES, F. S. **Modalidades terapêuticas nas disfunções estéticas**. 1. ed. São Paulo: Phorte, 2006.
- 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. L. et al. Tratamentos não farmacológicos na estimulação da osteogênese. **Rev Saúde Pública**, v. 36, n. 5, p. 647-654, 2002.
- CASTILLO-GALVÁN, M. L. et al. Study of peripheral nerve injury in trauma patients. **Gac Méd Méx**, v. 150, n. 6, p. 519-523, 2014.
- CHEN, T. Y. et al. Far-Infrared Therapy Promotes Nerve Repair following End-to-End Neurorrhaphy in Rat Models of Sciatic Nerve Injury. **Evid Based Complement Alternat Med**, v. 2015, p. 1-10, 2015.
- CHHABRA, A. et al. Peripheral nerve injury grading simplified on MR neurography: As referenced to Seddon and Sunderland classifications. **Indian J Radiol Imaging**, v. 24, n. 3, p. 217-224, 2014.
- COHEN, M.; ABDALLA, R.J. **Lesões nos esportes: Diagnóstico, Prevenção e Tratamento**. 1ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2005.
- DE MEDINACELI, 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. 634-643, 1982.
- DELITTO, A. “Russian Electrical Stimulation”: Putting This Perspective Into Perspective. **Phys Ther**, v. 82, n. 10, p. 1017-1018, 2002.
- DONG, C. et al. Reconstruction of anorectal function through end-to-side neurorrhaphy by autonomic nerves and somatic nerve in rats. **J Surg Res**, v. 180, n. 2, p. e63-e71, 2013.
- ENDO, C. et al. A laserterapia de baixa intensidade acelera a regeneração de nervos periféricos. **Acta Ortop Bras**, v. 16, n. 5, p. 305-310, 2008.

- ESER, F. et al. Etiological factors of traumatic peripheral nerve injuries. **Neurol India**, v. 57, n. 4, p. 434-437, 2009.
- FALOPPA, F.; LEITE, N. M. Eletroneuromiografia: bases e aplicações. In: NOBREGA, J. A. M.; MANZANO, G. M. **Propedêutica Ortopédica e Traumatológica**. 1. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.
- FREY, M.; GIOVANOLI, P. End-to-side neurorrhaphy of motor nerves: reinnervation of free muscle transplants—first clinical application. **Eur J Plast Surg**, v. 26, n. 2, p. 89-94, 2003.
- GAO, W. et al. End-to-side neurorrhaphy for nerve repair and function rehabilitation. **J Surg Res**, v. 197, n. 2, p. 427-435, 2015.
- GEUNA, S.; PAPALIA, I.; TOS, P. End-to-side (terminolateral) nerve regeneration: a challenge for neuroscientists coming from an intriguing nerve repair concept. **Brain Res Rev**, v. 52, n. 2, p. 381-388, 2006.
- GIROLAMI, U. D.; ANTHONY, D. C.; FROSCH, M. P.; Nervo periférico e músculo esquelético. In: COTRAN, R. S.; KUMAN, V.; COLLINS, T. **Robbins Patologia Estrutural e Funcional**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.
- HOUGHTON, P. E. et al. Electrical stimulation therapy increases rate of healing of pressure ulcers in community-dwelling people with spinal cord injury. **Arch Phys Med Rehabil**, v. 91, n. 5, p. 669-678, 2010.
- IÑIGO, P. R. Estimulación con corrientes de alta frecuencia para la cicatrización de la ruptura de meniscos en las lesiones en zona vascular y avascular, reporte preliminar de un nuevo abordaje terapéutico. **Ver 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**, n.283, p. 296-301, 1992.
- KITCHEN, S. **Eletroterapia: Prática baseada em evidências**. 2. ed. São Paulo: Manole, 2003.
- KOTWAL, A.; SCHMIDT, C. E. Electrical stimulation alters absorption and nerve cell interactions with electrically conducting biomaterials. **Biomaterials**, v. 22, n; 10, p. 1055-1064, 2001.
- KOUYOUMDJIAN, J. A. Peripheral nerve injuries: a retrospective survey of 456 cases. **Muscle Nerve**, 34, p. 785–788, 2006.
- LIU, H. F. et al. Efficacy of the End-to-Side Neurorrhaphies with Epineural Window and Partial Donor Neurectomy in Peripheral Nerve Repair: An Experimental Study in Rats. **J Reconstr Microsurg**, v. 31, n. 1, p. 31-38, 2015.
- LUNDBORG, G. A 25-year perspective of peripheral nerve surgery: involving neuroscientific concepts and clinical significance. **J Hand Surg**, v. 25, n. 3, p. 391-414, 2000.

MACIEL, F. O.; VITERBO, F.; CHINAQUE, L. D. F. C.; SOUZA, B. M. Effect of electrical stimulation of the cranial tibial muscle after end-to-side neuroorrhaphy of the peroneal nerve in rats. **Acta Cir Bras**, v. 28, n. 1, p. 39-47, 2013.

MATTARAIA, V. G. M.; MOURA, A. S. A. M. T. Produtividade de ratos Wistar em diferentes sistemas de acasalamento. **Ciênc Rural**, v. 42, n. 8, p. 1490-1496, 2012.

MURADE, E. C. M.; NETO, J. S. H.; AVANZIO, O. Estudo da relação e da importância entre a semiologia clínica, tomografia axial computadorizada e eletroneuromiografia nas radiculopatias lombares. **Acta Ortop Bras**, v. 10, n. 4, p. 18-25, 2002.

NELSON, R.M. et al. **Eletroterapia clínica**. 3.ed. São Paulo: Manole, 2003.

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

NUNES, N., PEDRO, R. Benefícios da aplicação de estimulação elétrica neuromuscular em esclerose múltipla. **Salutis Scientia**, v. 4, p. 54-67, jul. 2012.

PAPALIA, I. et al. Direct muscle neurotization after end-to end and end-to-side neuroorrhaphy: An experimental study in the rat forelimb model. **Neural Regen Res**, v. 7, n. 29, p. 2273-2278, 2012.

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

RAT GENOME SEQUENCING PROJECT CONSORTIUM, Genome sequence of the Brown Norway rat yields insights into mammalian evolution. **Nature**, v. 428, p. 493-521, 2004.

REIS, F. A.; BELCHIOR, A. C. G; NICOLAU, R. A.; FONSECA, T. S.; CARVALHO, P. T. C. Efeito da terapia com laser de arsenieto de gálio e alumínio (660nm) sobre a recuperação do nervo ciático de ratos após lesão por neurotmesa seguida anastomose epineural: análise funcional. **Rev Bras Fisioter**, v. 12, n. 3, p. 215-221, 2008.

ROBERTSON, V. et al. **Eletroterapia explicada: princípios e prática**. 4.ed. São Paulo: Elsevier, 2009.

RODRIGUES, M. L.; QUINTILIANO, N. A.; CHINGUI, L. J. Corrente russa versus correntes na reabilitação de músculos esqueléticos desnervados. **Anuário da Produção de Iniciação Científica Discente**, v. 13, n. 16, p. 45-55, 2011.

ROSA JUNIOR, G. M. da et al. Efeito da corrente alternada simétrica sinusoidal na musculatura estriada esquelética desnervada experimentalmente. **SALUSVITA**, v. 32, n. 3, p. 211-225, 2013.

ROVAK, J. M.; CEDERNA, P. S.; KUZON, W. M. Terminolateral neuroorrhaphy: a review of the literature. **J Reconstr Microsurg**, v. 17, n. 8, p. 615-624, 2001.

SANTOS, R. L.; SOUZA, M. L. S. P.; SANTOS, F. A. Neuromuscular electric stimulation in patellofemoral dysfunction: literature review. **Acta Ortop Bras**, v. 21, n. 1, p. 52-58, 2013.

SATO, K. M. **Comparação de neurorrafias término-terminais e término-laterais na reconstrução do nervo mediano**: pesquisa experimental em ratos Wistar adultos. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação Medicina) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

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

SIQUEIRA, R. Lesões Nervosas Periféricas: Uma Revisão. **Rev Neurocienc**, v. 15, n. 3, p. 226-233, 2007.

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, n. 5, p. 819-824, 2001.

SUNDERLAND, S. A classification of peripheral nerve injuries producing loss of function. **Brain**, v. 74, n. 4, p. 491-516, 1951.

SUNDERLAND, S.; RAY, L. J. Denervation changes in mammalian striated muscles. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, v. 13, n. 3, p. 159-177, 1950.

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, n. 4, p. 500-509, 2011.

VITERBO, F. **Neurorrafia Látero-Terminal**: Estudo Experimental no Rato. 1992. 198 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina da Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 1992.

VITERBO, F., SALVIO, A. G., GRIVA, B. L., & MACIEL, F. O. The embracing end-to-side neurorrhaphy in rats. **Acta Cir Bras**, v. 27, n. 3, p. 260-265, 2012.

VITERBO, F.; TRINDADE, J. C.; HOSHINO, K.; MAZZONI NETO, A. End-to-side neurorrhaphy with removal of the epineurial sheath: an experimental study in rats. **Plast Reconstr Surg**, v. 94, n. 7, p. 1038-1047, 1994.

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.

ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA

**COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
CEUA - USC****CERTIFICADO**

PROTOCOLO Nº 24/13

A CEUA USC dentro de suas competências e seguindo normas vigentes no Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal – CONCEA analisou o projeto “EFEITO DA ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA COM CORRENTE DE MÉDIA FREQUÊNCIA NO REPARO MORFOLÓGICO DO NERVO FIBULAR DE RATOS APÓS NEURORRAFIA TÉRMINO-LATERAL”, sob a responsabilidade do pesquisador Prof. Me. Carlos Henrique Fachim Bortoluci e o considerou **APROVADO** com as seguintes recomendações:

1. O procedimento de analgesia com paracetamol não relata a dosagem a ser utilizada por via oral (no protocolo). No projeto indica o uso de paracetamol ou de AAS, esclarecer qual dos métodos será realmente empregado;
2. Ajustar a dose do anestésico (xilasina: 10mg/kg de peso animal), a dosagem da quetamina está correta.

Bauru, 16 de Dezembro de 2013.

Dra. Dulce H. J. Constantino
Presidente CEUA - USC

Francine Souza
Secretária CEUA - USC