

UNIVERSIDADE DO SAGRADO CORAÇÃO

CARLA TOMÁS BUÊNO

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

BAURU
2015

CARLA TOMÁS BUÊNO

**EFEITO DA ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA COM
CORRENTE AUSSIE NO REPARO MORFOLÓGICO
DO NERVO FIBULAR COMUM E 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

B9285e	<p>Bueno, Carla Tomas</p> <p>Efeito da estimulação elétrica com corrente aussie no reparo morfológico do nervo fibular comum e recuperação funcional de ratos após neurorrafia término-lateral / Carla Tomas Bueno. -- 2015. 39f. : il.</p> <p>Orientador: Prof. Dr. Geraldo Marco Rosa Junior.</p> <p>Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade do Sagrado Coração – Bauru – SP.</p> <p>1. Neurorrafia termino-lateral. 2. Eletroestimulação. 3. Nervo fibular. I. Rosa Junior, Geraldo Marco. II. Título.</p>
--------	--

CARLA TOMÁS BUÊNO

**EFEITO DA ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA COM CORRENTE AUSSIE
NO REPARO MORFOLÓGICO DO NERVO FIBULAR COMUM E
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 da Prof. Dr. Geraldo Marco Rosa Junior.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Geraldo Marco Rosa Junior

Prof. Me. Luis Henrique Simionato

Guilherme Eleutério Alcade

Bauru, 26 de novembro de 2015.

Dedico este trabalho à minha família, por sua capacidade de acreditar, incentivar e investir em mim. Pai e mãe, sem vocês esse trabalho nunca teria sido realizado.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Universidade do Sagrado que me proporcionou um ensino de qualidade, e me incentivou desde o primeiro ano a realização de projetos de Iniciação Científica - me fazendo entender melhor e importância da pesquisa e a beleza que a envolve, e de Extensão, me proporcionando um contato maior com a sociedade, permitindo ampliar minha visão humanista.

Aos meus professores, que me incentivaram, me ensinaram, e acima de tudo, me orientaram nesse caminho arduo até o final.

Ao Grupo de Estudos de Interação Mioneural – GEIM, que compartilharam comigo minhas melhores experiências e aprendizado desde o meu primeiro ano de faculdade. Sem meus colegas e professores esse trabalho jamais seria concluído.

Aos meus amigos, que estiveram comigo desde o início. Em especial a Juliana Azanha, Juliana Prado, Marcella Nicollini e Letícia Casado, pois sem elas, chegar ao final seria muito mais difícil e menos divertido do que foi com a companhia delas.

Ao meu namorado Felipe, que esteve comigo desde o ensino médio, me apoiando e me incentivando na realização dos meus sonhos, acreditando em mim desde sempre.

Em especial ao meu orientador Professor Doutor Geraldo Marco Rosa Júnior, que não foi apenas um excelente professor e orientador, mas um amigo, que me orientou desde o início deste longo caminho, e que possui total mérito por todo conhecimento que adquiri até aqui.

E por fim a minha família, que me guiou, me apoiou, e investiu em mim. E mais especificamente ao meu pai Renato, que trabalhou de segunda a segunda para que eu pudesse realizar esse sonho de ser Biomédica, sem ele eu não chegaria ao final dessa jornada.

“Os dois dias mais importantes da sua vida são: O dia em que você nasceu, e o dia em que você descobre o porquê” (Mark Twain).

RESUMO

Lesões de nervos periféricos podem levar a uma perda funcional elevada ao paciente. Devido a este fator, muitas pesquisas buscam propor técnicas para melhorar a funcionalidade de um músculo reinervado. Desta forma, a neurorrafia término-lateral (NTL) sem lesão no nervo doador trouxe grande contribuição, pois, a partir desta descoberta, qualquer nervo pode ser utilizado como nervo doador sem prejuízos para este ou para as estruturas por ele inervadas. Entretanto, após uma neurorrafia, o tempo para a regeneração axonal determinará atrofia das fibras musculares. A estimulação elétrica preveniria este fator negativo. Esta pesquisa terá como objetivo estudar a eficiência da estimulação elétrica Aussie na recuperação do nervo fibular após secção e neurorrafia término-lateral do coto distal do nervo fibular à face lateral do nervo tibial. Foram utilizados 40 ratos da raça Wistar, machos, com 80 dias de vida, fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Sagrado Coração (USC). Os animais foram divididos, aleatoriamente, em cinco grupos experimentais. Grupo Controle Inicial (GCI), Grupo Controle Final (GCF), Grupo Desnervado (GD), Grupo Controle Cirúrgico (GCC), Grupo Neurorrafia Término-Lateral com Estimulação Aussie (GNTLEA). Os animais do grupo GNTLEA foram submetidos a três sessões semanais durante os 90 dias, totalizando 36 sessões. Receberam estimulação elétrica o músculo tibial cranial com corrente aussie, com frequência de 1000 hz, sincronizada, com frequência de base de 1 Khz, com duração do pulso de 2 milissegundos com tempo de contração de 10 segundos por 20 segundos de relaxamento, durante 20 minutos. Foram realizadas análise morfológica do tecido nervoso dos ratos de todos os cinco grupos comparando a regeneração nervosa entre os grupos.

Palavras-Chave: Neurorrafia término-lateral. Eletroestimulação. Nervo fibular.

ABSTRACT

Lesions of peripheral nerves can lead to a high loss of function for the patient. Due to this factor, many studies seek to propose techniques to improve the functionality of a reinnervated muscle. Thus, the end-side neurorrhaphy (NTL) without injury to the donor nerve brought great contribution because, from this discovery, any nerve can be used as donor nerve without harming themselves or for the structures innervated by it. However, after neurorrhaphy, the time for axonal regeneration determine atrophy of muscle fibers. Electrical stimulation would prevent this negative factor. This research will have to study the efficiency of electrical stimulation Aussie in recovering the peroneal nerve after section and neurorrhaphy-end side of the distal stump of the peroneal nerve to the lateral aspect of the tibial nerve. Rats wistar were used Wistar, males with 80 days old, provided by the Central Animal Vivarium of the Sacred Heart University (USC). The animals were divided randomly into five groups. Control Group Initial (ICG), Control Group Final (GCF), denervated group (GD) Surgical Control Group (GCC), neurorrhaphy group End-Side with Aussie stimulation (GNTLEA). The animals of GNTLEA group underwent three sessions per week for 90 days, totaling 36 sessions. Received electrical stimulation of the tibial cranial to Aussie current with frequency of 1000 Hz, synchronized with base frequency 1 kHz, with pulse duration of 2 milliseconds with contraction time of 10 seconds per 20 seconds of relaxation for 20 minutes . Morphological analysis of nervous tissue of the rats were performed from all five groups nerve regeneration compared between the groups. The GNTLEA group showed better morphometric and functional results. Thus we concluded that electrical stimulation favored peripheral nerve regeneration.

Keywords: end-side neurorrhaphy. Electrical stimulation. Peroneal nerve.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - <i>Rattus norvegicus</i> linhagem Wistar.....	15
Figura 2 - Técnica de Neurorrafia Termino-Lateral.	16
Figura 3 - Acesso cirúrgico com a Técnica de Neurorrafia Termino-Lateral realizada.	18
Figura 4 - Eletroestimulação.....	19
Figura 5 - Teste Eletrofisiológico.....	20
Figura 6 - Gráfico com as Médias Obtidas pela Análise da Marcha	23
Figura 7 - Gráfico da média da amplitude (mV).....	24
Figura 8 - Gráfico da média da latência (ms).....	25
Figura 9 - Gráfico da média de força muscular (N).....	26
Figura 10 - Gráfico da média (μm^2) da área das fibras nervosas.....	27
Figura 11 - Gráfico da Média (μm) do diâmetro das fibras nervosas.....	28
Figura 12 - Gráfico da média das áreas dos axônios.....	29
Figura 13 - Gráfico da média (μm) do diâmetro dos axônios.....	30
Figura 14 - Gráfico da média (μm^2) das áreas das bainhas de mielina.....	31
Figura 15 - Gráfico da média (μm) das espessuras das bainhas de mielina.....	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Média e Desvio Padrão dos Índices Funcionais apresentados pelos grupos.	24
Tabela 2 – Média e Desvio Padrão da Amplitude apresentado pelos grupos.....	25
Tabela 3 – Média e Desvio Padrão da Latência apresentado pelos grupos.....	26
Tabela 4 – Média e Desvio Padrão da Força Muscular dos grupos.	27
Tabela 5 – Média e Desvio Padrão da Área das Fibras Nervosas entre os grupos. .	28
Tabela 6 – Média e Desvio Padrão do Diâmetro das Fibras Nervosas entre os grupos.	29
Tabela 7 – Média e Desvio Padrão da Área dos Axônios entre os grupos.....	30
Tabela 8 – Média e Desvio Padrão do Diâmetro dos Axônios entre os grupos.....	30
Tabela 9 – Média e Desvio Padrão da Área das Bainha de Mielina entre os grupos.	31
Tabela 10 – Média e Desvio Padrão da Espessura das Bainhas de Mielina entre os grupos.	32

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	OBJETIVO	14
3	METODOLOGIA	15
3.1	Animais	15
3.2	Grupos experimentais	15
3.3	Cirurgia	17
3.4	Estimulação Elétrica	18
3.5	Teste de Marcha	19
3.6	Teste Eletrofisiológico	19
3.7	Coleta das peças histológicas e eutanásia	20
3.8	Processamento histológico dos segmentos de nervo	20
3.9	Digitalização das imagens das lâminas histológicas de nervos	21
3.10	Medidas de área, diâmetro mínimo e contagem total das fibras nervosas	21
3.11	Análise Estatística	22
4	RESULTADOS	23
5	DISCUSSÃO	33
6	CONCLUSÃO	35
	REFERÊNCIAS	36

1 INTRODUÇÃO

Lesões nervosas periféricas podem levar a uma perda funcional muito alta para o paciente. (SATO, 2005). Dentre os danos que reduzem a qualidade de vida das pessoas acometidas por estas lesões, estão incluídas a incapacitação física e a perda total ou parcial de suas atividades produtivas, o que leva a importantes consequências econômicas. Além do altíssimo custo social gerado pelo aumento das despesas da saúde pública e previdenciária, sendo de extrema importância ressaltar o impacto que essas lesões dessa dimensão são capazes de provocar sobre o indivíduo, familiares e sociedade. (SEBBEN, *et al.*, 2013). Devido a isso, muitas pesquisas buscam aprimorar técnicas cirúrgicas e tratamentos pós-cirúrgicos com a finalidade de minimizar a perda funcional do paciente. (SATO, 2005).

Os nervos periféricos estão sujeitos a doenças inflamatórias, traumáticas, metabólicas, tóxicas, genéticas e neoplásicas (GIROLAMI, ANTHONY, FROSCHE, 2000). E ainda, mais comumente, sujeitas as lesões por projeteis de arma de fogo, quedas e acidentes automobilísticos, sendo este último o mais descrito. (KOUYOUMDJIAN, 2006). Estes acometimentos levam a diferentes tipos e graus de lesões (POLITIS *et al.*, 1982; LUNDBORG *et al.*, 2000).

Em 1943, Seddon classificou as lesões nervosas periféricas em três tipos segundo o nível de gravidade: neuropraxia, axonotmese e neurotmese. A neuropraxia consiste apenas na desmielinização das fibras nervosas sem interrupção axonal, sendo de regeneração rápida e espontânea. Na axonotmese ocorre a perda da continuidade axonal e da bainha de mielina, contudo ainda há um potencial de regeneração espontânea, porém algumas técnicas fisioterapêuticas são utilizadas para potencializar o reparo nervoso. A neurotmese, por sua vez, refere-se à lesão de pior prognóstico por tratar-se da secção total do nervo interrompendo o crescimento axonal.

Sunderland, em 1951, descreveu as lesões em cinco diferentes graus: o primeiro 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).

A classificação das lesões por Seddon é simples e 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).

O foco abordado nesse estudo baseia-se na lesão do tipo neurotmeze. E para que ela não evolua para um quadro de neuroma de amputação, é necessário de uma cirurgia de reparo. (ARSLANTUNALI et al., 2014).

No reparo de lesões de nervos periféricos, quando se dispõem dos cotos proximais e distais, a neurorrafia término-terminal (NTT) é, frequentemente, utilizada para fazer a união dos cotos do nervo lesado através de uma sutura. (ROVAK et al., 2001).

Viterbo (1992) propõem a neurorrafia término-lateral sem lesão no nervo doador e, até mesmo, sem a remoção do epineuro. (VITERBO et al., 1994). Com trabalho experimental em ratos, VITERBO et al., (1992) realizaram a secção do nervo fibular, que inerva o músculo tibial cranial (MTC), e seu coto distal foi suturado à face lateral do nervo tibial intacto, sem a remoção do epineuro. Obtiveram, pela primeira vez, reinervação muscular sem prejuízo ao nervo doador. Foi grande a contribuição desta técnica, pois, a partir dela, qualquer nervo pode ser utilizado como nervo doador sem prejuízos para este ou para as estruturas por ele inervadas.

No entanto, mesmo com o avanço das microcirurgias, ainda não foi possível uma recuperação motora completa no reparo do nervo lesionado, pois esta recuperação completa da função motora é dependente do crescimento axonal, e o processo de atrofia dos músculos inervados pelo nervo ocorrem durante a regeneração do axônio, fato este que leva a um dano funcional ao músculo. (MACIEL. et al., 2013).

Muitas linhas de pesquisa mostraram que agentes físicos como campo magnético, ultrassom e eletricidade podem influenciar de forma positiva na regeneração e cicatrização de diferentes tecidos, como a pele, o osso, os músculos e tendões e os nervos periféricos. (SENE et al.,2013). A estimulação elétrica com finalidade regenerativa, embora controvertida, (WILLIAMS, 1996; NEMETH, 1982; IÑIGO, 1998; SOUZA, DEL CARLO, VILORIA, 2001; KOTWAL & SCHMIDT, 2001; CARVALHO et al., 2002), tornou-se objeto de estudo na recuperação funcional muscular, pois a mesma pode ser aplicada como método de prevenção da atrofia muscular que retardaria e, em alguns casos, evitaria a perda de tecido muscular resultante de um período de inatividade ou por desnervação .

A corrente Aussie é uma corrente elétrica terapêutica alternada com frequência na faixa de 1 kHz com alguma semelhança em relação a Corrente Russa. A diferença está no valor da corrente em kHz utilizada, bem como no formato de onda, onde a frequência é de 2,5 kHz com Burst ajustável até 150 Hz, com um ciclo de trabalho de até 50%. O estímulo é aplicado por 10 segundos (on) período seguido por 50 segundos (off) ou descanso, com um tempo de tratamento recomendado de 10 minutos por sessão de estimulação. Este regime de aplicação da corrente é conhecido como "10/50/10", entretanto, esses padrões podem ser ajustáveis. A corrente Russa apresenta duração de pulso de 4ms, já a corrente aussie apresenta duração de 2ms. Estudos sugerem ainda, que para uma estimulação motora intensa e eficiente, com desconforto mínimo, a frequência de 1000Hz ou 1kHz deve ser utilizada combinada com a modulação em Burst com duração de 2 ms. (WARD, 2007; SELKOWITZ, 1989).

O estudo funcional da regeneração nervosa e da recuperação de um músculo após neurografia, 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. (De MEDINACELLI *et al.*, 1982; BAIN *et al.*, 1989; SATO, 2005).

2 OBJETIVO

Objetivo Geral

Verificar a eficácia da eletroestimulação por meio da Corrente Aussie na manutenção dos aspectos morfológicos do nervo fibular após neurografia terminolateral.

Objetivos Específicos

Comparar os resultados obtidos no grupo experimental eletroestimulado com o grupo experimental sem eletroestimulação.

Comparar os resultados dos grupos experimentais com os grupos controles e verificar qual obteve melhor resultado morfológico.

3 METODOLOGIA

Este trabalho foi realizado no Laboratório da Universidade Sagrado Coração (treinamento, aplicação da estimulação elétrica, eutanásia dos animais, coleta das peças histológicas e morfometria).

3.1 Animais

Todos os procedimentos realizados estão de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

O trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNESP-Universidade Estadual Paulista, da Faculdade de Medicina – campus Botucatu, protocolado com o número 1043-2013. Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central da USC – Universidade Sagrado Coração – campus Bauru.

Foram utilizados 40 ratos (*Rattus norvegicus*) da linhagem *Wistar*, machos com 80 dias de vida. Os animais foram divididos em 5 grupos experimentais. Estes foram eutanasiados com 90 dias de treinamento.

Figura 1 - *Rattus norvegicus* linhagem *Wistar*.



Fonte: Elaborado pela autora.

3.2 Grupos experimentais

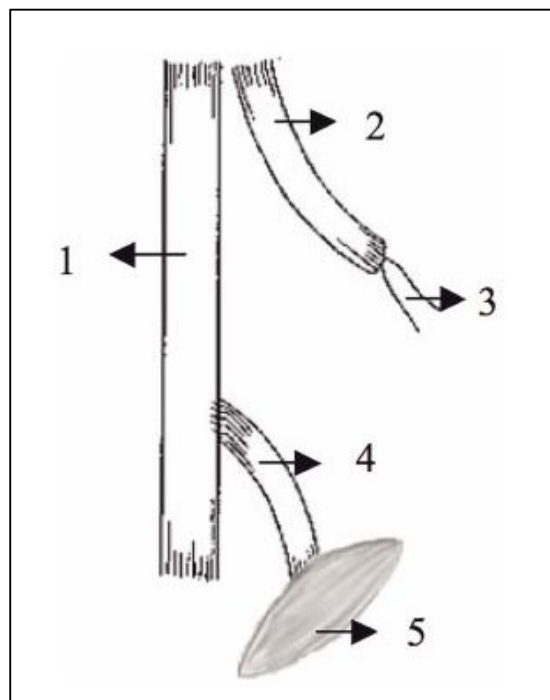
Os ratos foram agrupados em: Grupo Controle Final (GCF) com 8 animais, Grupo Controle Cirúrgico (GCC) com 8 animais, Grupo Neurorrafia Término-Lateral

com Estimulação Aussie (GNTLA) com 8 animais, Grupo Desnervado (GD) com 8 animais e Grupo Controle Inicial (GCI) com 8 animais.

No Grupo Desnervado (GD), com 8 animais, o nervo fibular foi seccionado e seus cotos foram invertidos 180 graus. O coto distal foi fixado à musculatura subjacente. O coto proximal foi transpassado por uma incisão na musculatura glútea e suturado no plano subcutâneo a fim de impedir contaminação motora.

No Grupo Neurorrafia Término-Lateral com Estimulação Aussie (GNTLA) com 8 animais, o nervo fibular 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 foi encurvado, aproximadamente 80 graus, e suturado lateralmente ao nervo tibial assim como é demonstrado na Figura 2 abaixo. Após a cirurgia, os animais receberam estimulação elétrica com corrente aussie no músculo tibial cranial como parte do tratamento.

Figura 2 - Técnica de Neurorrafia Término-Lateral.



Fonte: BOER (2015).

Legenda: 1= Nervo Tibial; 2= Coto proximal do nervo fibular; 3= Músculo adjacente; 4= Coto distal do nervo fibular; 5= Músculo Tibial Cranial.

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 serão anestesiados com ketamina (80mg/kg) e xilasina (10mg/kg) intraperitoneal, e realizada tosquia.

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. Foram usadas as drogas até não haver mais sinais de dor. A analgesia pós-operatória foi feita com: acetaminofenol (paracetamol) 2 mg/mL de água, na água do bebedouro.

A face dorso-lateral do membro posterior direito, sofreu incisão de 2 a 3 cm longitudinalmente ao maior eixo do membro, comprometendo pele e tecido subcutâneo com posterior divulsão da musculatura. Após, foi realizado o procedimento, de acordo com o grupo experimental.

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

As neurorrafias 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.

Figura 3 – Acesso cirúrgico com a Técnica de Neurorrafia Terminolateral realizada.



Fonte: Elaborado pela autora.

Os animais foram mantidos em caixas apropriadas, contendo quatro 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.

3.4 Estimulação Elétrica

A estimulação elétrica Aussie teve início com cinco dias de pós-operatório. Os animais do grupo GNTLA foram submetidos a três sessões semanais durante 90 dias, totalizando 24. Receberam estimulação elétrica com corrente Aussie, com frequência de 1000 Hz, sincronizada, com frequência de base de 1Khz, modulação em 30 e 100 Hz, com duração de 2 ms, tempo de contração de 10 segundos por 20 segundos de relaxamento, durante 10 minutos cada modulação. A corrente inicial foi aquela suficiente para promover a contração muscular. Foi utilizado estimulador elétrico Neurodyn® 10 Canais da empresa Ibramed.

Os animais foram estimulados acordados e sem anestesia. Para isto foi desenvolvida uma cápsula metálica com abertura posterior para a cauda e duas aberturas laterais para fixação dos membros posteriores. Após esta imobilização, os eletrodos de um centímetro quadrado de área foram fixados sobre o ventre dos músculos. Para aplicação da estimulação elétrica foi usado eletrodos autoadesivos.

Foram utilizadas 4 cápsulas ao mesmo tempo, para otimizar o trabalho da estimulação.

Figura 4 – Eletroestimulação.



Fonte: Elaborado pela autora.

3.5 Teste de Marcha

Os animais foram submetidos à avaliação funcional e, para isto, um a um, caminharam por um aparelho chamado *CatWalk™*, o qual, automaticamente, registrou as pegadas no assoalho, que foram utilizadas para análise funcional. Este procedimento foi repetido duas vezes com cada animal. Os dados foram submetidos ao tratamento estatístico obedecendo ao índice de $p < 0,05$ para todas as amostras.

3.6 Teste Eletrofisiológico

Para a realização do teste eletrofisiológico a temperatura ambiente foi mantida em torno de 25°C.

O teste eletrofisiológico foi realizado antes da eutanásia dos animais.

Após anestesia com ketamina (80mg/kg) e xilasina (10mg/kg) intramuscular, os animais foram imobilizados em decúbito ventral. Foram realizadas tricotomia e ampla incisão no membro posterior previamente operado, 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 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 cinza (dispersivo), introduzido em local distante da região estudada.

Os eletrodos registraram 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 apresentou a maior amplitude registrada.

Os dados de amplitude e latência foram comparados entre os grupos. Foi utilizado eletromiógrafo da marca Sapphire II 4ME.

Figura 5 - Teste Eletrofisiológico



Fonte: Elaborado pelo autora.

3.7 Coleta das peças histológicas e eutanásia

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

Os segmentos de nervo coletados foram fixados e mantidos em solução de Karnovisk 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 Karnovisk, 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, permaneceu 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.

Os fragmentos nervosos foram incluídos em parafina e corados com prata de Bielschowsky, com o objetivo de comprovar o neuroma de amputação ou contaminação motora e brotamento na neurorrafia término-lateral.

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 será obtida subtraindo-se a área axonal da área da fibra nervosa, e a espessura da bainha de mielina será obtida subtraindo-se o diâmetro mínimo do axônio do diâmetro mínimo da fibra e dividindo-se por dois. Será 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

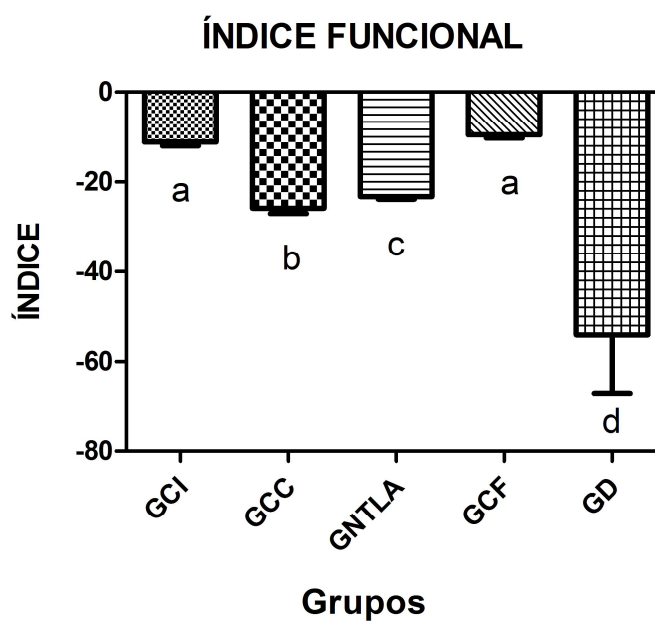
Para a comparação dos grupos, foi utilizado o teste de análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste de TUKEY, quando detectada diferença significativa. Em todas as análises, foi utilizado o nível de significância $p \leq 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Análise funcional da marcha

A média dos resultados da análise funcional da marcha (Figura 6) e (Tabela 1) demonstrou que o GNTLA obteve os melhores resultados entre os grupos que realizaram neurorrafia. Nenhum grupo apresentou resultados semelhantes ao GCF, entretanto, todos apresentaram resultados significativamente superiores ao GD.

Figura 6 - Gráfico com as médias obtidas pela análise de marcha.



Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda: Letras diferentes indicam diferença estatística.

Tabela 1 – Média e Desvio Padrão dos Índices Funcionais apresentados pelos grupos.

	Média	DP
GCI	-11,12 ^a	2,77
GCC	-25,84 ^b	3,71
GNTLA	-23,3 ^c	1,86
GCF	-9,51 ^a	2,30
GD	-54,05 ^d	41,78

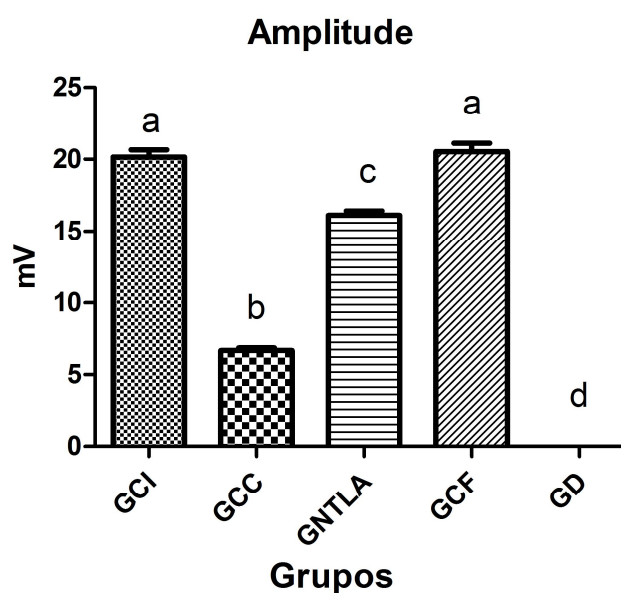
Fonte: Elaborado pela autora

Legenda: Letras diferentes indicam diferença estatística.

4.2 Análise eletrofisiológica

A média dos resultados de amplitude (mV) demonstrou que o GNTLA obteve melhor resultado entre os grupos que realizaram neurorrafia. Nenhum grupo apresentou resultados semelhantes ao GCF, entretanto, todos apresentaram resultados significativamente superiores ao GD. Os resultados da análise eletrofisiológica – amplitude, podem ser observados na Figura 7 e Tabela 2.

Figura 7 - Gráfico da média da amplitude (mV).



Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda: Letras diferentes indicam diferença estatística.

Tabela 2 – Média e Desvio Padrão da Amplitude apresentado pelos grupos.

	Média	DP
GCI	20,17 ^a	1,52
GCC	6,68 ^b	0,63
GNTLA	16,12 ^c	0,99
GCF	20,53 ^a	1,84
GD	0,0 ^d	0,0

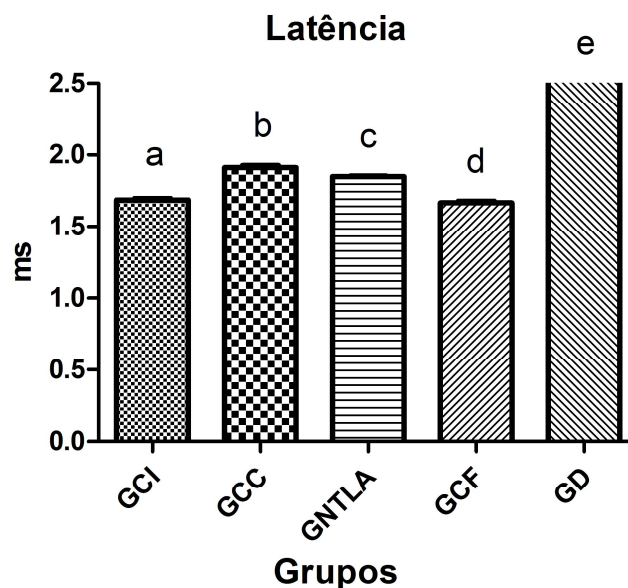
Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda: Letras diferentes indicam diferença estatística.

Em relação à média dos resultados de latência (ms), o grupo GNTLA apresentou o melhor resultado entre os grupos. Nenhum grupo apresentou resultados semelhantes ao GCF, entretanto, todos apresentaram resultados significativamente superiores ao GD.

Os resultados da análise eletrofisiológica – latência, podem ser observados na Figura 8 e na Tabela 3.

Figura 8 - Gráfico da média da latência (ms).



Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda: Letras diferentes indicam diferença estatística.

Tabela 3 – Média e Desvio Padrão da Latência apresentado pelos grupos.

	Média	DP
GCI	1,69 ^a	0,03
GCC	1,91 ^b	0,05
GNTLA	1,85 ^c	0,02
GCF	1,67 ^d	0,04
GD	1000 ^e	0,0

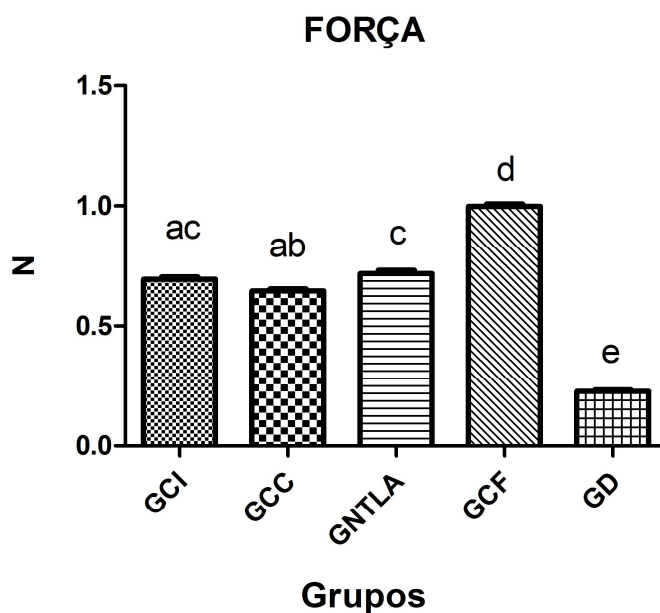
Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda: Letras diferentes indicam diferença estatística.

4.3 Força muscular

A média dos resultados da Força Muscular (N) demonstrou que o GNTLA obteve melhor resultado em comparação ao GCC. Nenhum grupo apresentou resultados semelhantes ao GCF, entretanto, todos apresentaram resultados significativamente superiores ao GD. Os resultados da força, podem ser observados na Figura 9 e na Tabela 4.

Figure 9 - Gráfico da média de força muscular (N).



Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda: Letras diferentes indicam diferença estatística.

Tabela 4 – Média e Desvio Padrão da Força Muscular dos grupos.

	Média	DP
GCI	0,69 ^{ac}	0,03
GCC	0,65 ^{ab}	0,02
GNTLA	0,72 ^c	0,03
GCF	1,00 ^d	0,03
GD	0,23 ^e	0,01

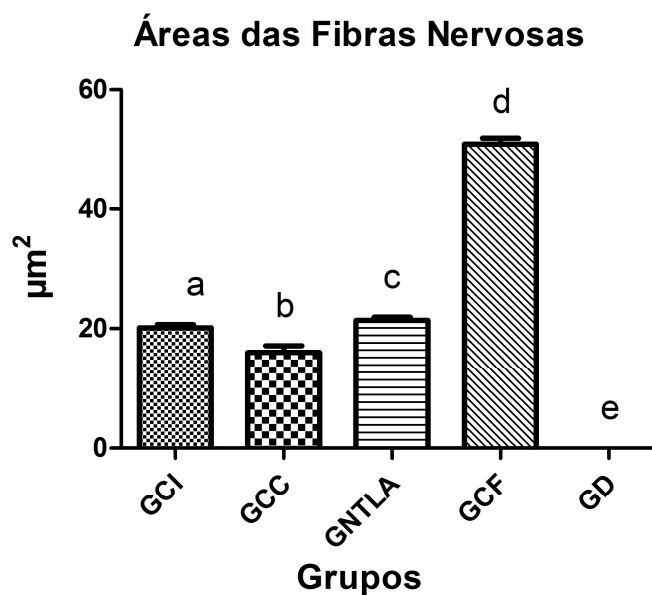
Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda: Letras diferentes indicam diferença estatística.

4.4 Áreas e Diâmetros das Fibras Nervosas

Os dados obtidos da média e diâmetro das áreas das fibras nervosas mostram que o grupo GNTLA apresentou o melhor resultado de área quando comparado ao grupo GCC. Nenhum grupo apresentou resultados semelhantes ao GCF, entretanto, todos apresentaram resultados significativamente superiores ao GD. Os resultados podem ser observados nas Figuras 10 e 11 e nas Tabelas 5 e 6.

Figure 10 - Gráfico da média (μm^2) da área das fibras nervosas.



Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda: Letras diferentes indicam diferença estatística.

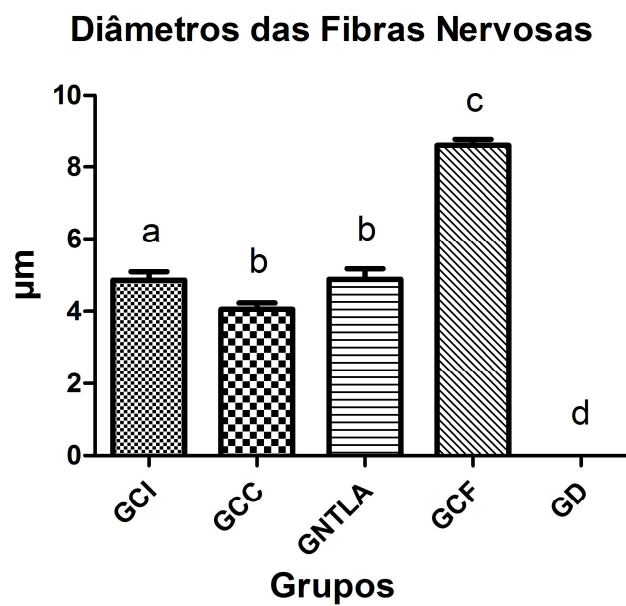
Tabela 5 – Média e Desvio Padrão da Área das Fibras Nervosas entre os grupos.

	Média	DP
GCI	20,12 ^a	1,77
GCC	16,00 ^b	3,55
GNTLA	21,38 ^c	1,81
GCF	50,76 ^d	3,27
GD	0,00 ^e	0,00

Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda: Letras diferentes indicam diferença estatística.

Figure 11 - Gráfico da Média (μm) do diâmetro das fibras nervosas.



Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda: Letras diferentes indicam diferença estatística.

Tabela 6 – Média e Desvio Padrão do Diâmetro das Fibras Nervosas entre os grupos.

	Média	DP
GCI	4,86 ^a	0,74
GCC	4,05 ^b	0,56
GNTLA	4,88 ^{bc}	0,93
GCF	8,59 ^c	0,55
GD	0,00 ^d	0,00

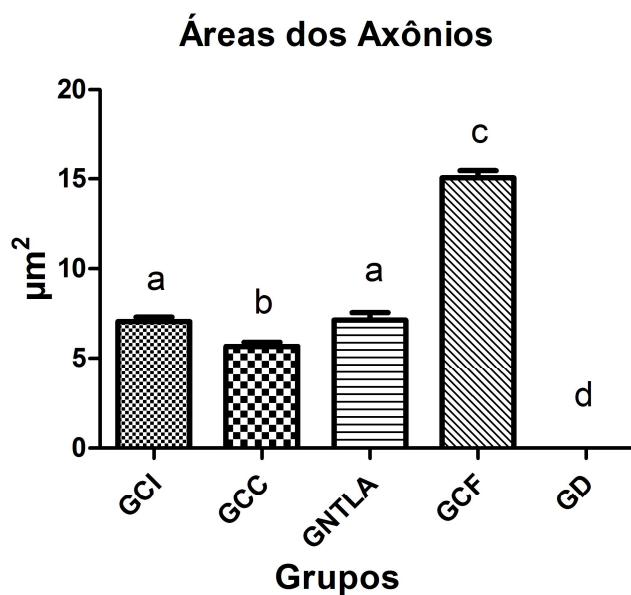
Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda: Letras diferentes indicam diferença estatística.

4.4 Áreas e Diâmetros dos Axônios

Os dados obtidos da média das áreas e diâmetros, o grupo GNTLA obteve resultado semelhante e melhor que o grupo GCC. Nenhum grupo apresentou resultados semelhantes ao GCF, entretanto, todos apresentaram resultados significativamente superiores ao GD. Os resultados podem ser observados nas Figuras 12 e 13 e nas Tabelas 7 e 8.

Figura 12 - Gráfico da média das áreas dos axônios.



Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda: Letras diferentes indicam diferença estatística.

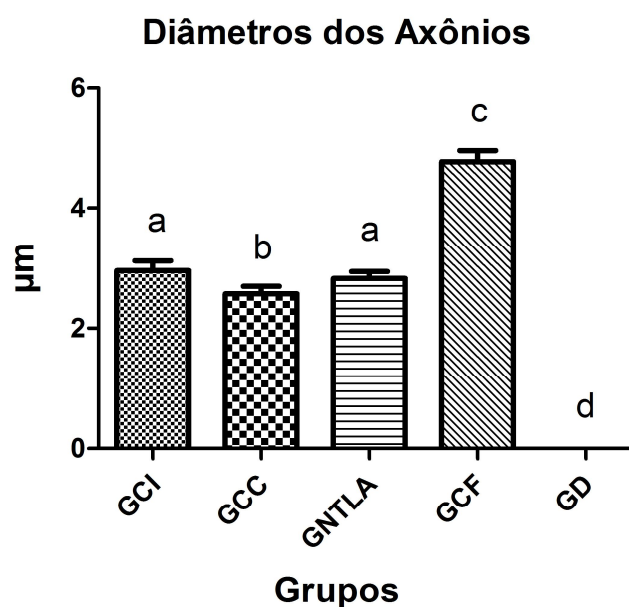
Tabela 7 – Média e Desvio Padrão da Área dos Axônios entre os grupos.

	Média	DP
GCI	7,05 ^a	0,80
GCC	5,68 ^b	0,74
GNTLA	7,15 ^a	1,28
GCF	15,06 ^c	1,24
GD	0,00 ^d	0,00

Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda: Letras diferentes indicam diferença estatística.

Figura 13 - Gráfico da média (μm) do diâmetro dos axônios.



Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda: Letras diferentes indicam diferença estatística.

Tabela 8 – Média e Desvio Padrão do Diâmetro dos Axônios entre os grupos.

	Média	DP
GCI	2,96 ^a	0,51
GCC	2,57 ^b	0,39
GNTLA	2,83 ^a	0,37
GCF	4,77 ^c	0,59
GD	0,00 ^d	0,00

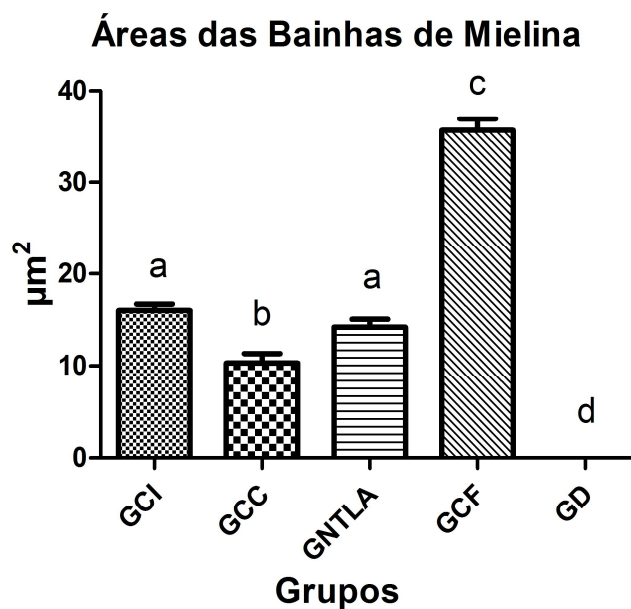
Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda: Letras diferentes indicam diferença estatística.

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

Os dados obtidos da média das áreas e espessuras da bainha de mielina, o grupo GNTLA obteve melhor resultado que o grupo GCI. Nenhum grupo apresentou resultados semelhantes ao GCF, entretanto, todos apresentaram resultados significativamente superiores ao GD. Os resultados podem ser observados nas Figuras 14 e 15 e nas Tabelas 9 e 10.

Figura 14 - Gráfico da média (μm^2) das áreas das bainhas de mielina.



Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda: Letras diferentes indicam diferença estatística.

Tabela 9 – Média e Desvio Padrão da Área das Bainha de Mielina entre os grupos.

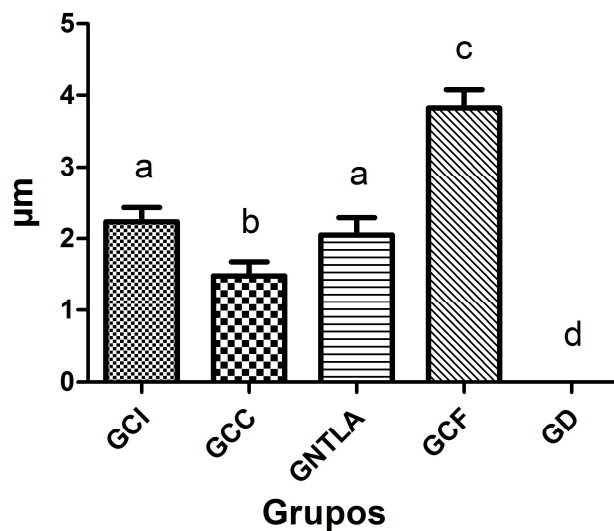
	Média	DP
GCI	16,01 ^a	2,23
GCC	10,32 ^b	3,28
GNTLA	14,23 ^a	2,67
GCF	35,70 ^c	3,93
GD	0,00 ^d	0,00

Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda: Letras diferentes indicam diferença estatística.

Figura 15 - Gráfico da média (μm) das espessuras das bainhas de mielina.

Espessuras das Bainhas de Mielina



Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda: Letras diferentes indicam diferença estatística.

Tabela 10 – Média e Desvio Padrão da Espessura das Bainhas de Mielina entre os grupos.

	Média	DP
GCI	2,24 ^a	0,63
GCC	1,48 ^b	0,63
GNTLA	2,05 ^a	0,77
GCF	3,82 ^c	0,80
GD	0,00 ^d	0,00

Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda: Letras diferentes indicam diferença estatística.

5 DISCUSSÃO

O modelo animal (*Rattus norvegicus*) da linhagem *Wistar* foi escolhido nesta pesquisa por vários motivos: são dóceis, permitindo fácil manuseio, apresentam resistência imunológica e sua manutenção requer baixo custo financeiro. Além dessas características já citadas, podemos destacar especialmente o padrão isogênico semelhante ao ser humano. O animal apresenta uma taxa de regeneração e degeneração nervosa e muscular parecida e bem relatada em vários estudos, fazendo que a relação cobaia e ser humano, mesmo apresentando um metabolismo mais acelerado, sejam interpretados com tranquilidade. Essas características fazem com que o rato wistar seja um modelo consagrado na reparação de nervos periféricos. (CLOUTIER et al., 2013; GEORGIU et al., 2013; HUNDESHAGEN et al., 2013; SU et al., 2013).

A escolha do gênero masculino deve-se ao fato de uma escolha metodológica da qual se diminua uma variável no estudo, pois animais do gênero feminino poderiam apresentar alterações dos ritmos hormonais, o que causaria variações nos resultados. Como relatado por Kovacic et al., (2009), os hormônios femininos promovem efeitos neurotróficos na regeneração de nervos periféricos, entretanto autores relatam prejuízos quando se realizado experimentos com animais do gênero feminino. (KANE et al. 2002).

É importante a escolha de animais jovens, porque além de serem os mais utilizados, e por isso, apresentarem uma maior margem para comparação, sabe-se que quanto mais idoso o animal, mais lentos são os fenômenos envolvidos na reparação dos nervos periféricos. (SAYGILI et al., 2012.).

O anestésico utilizado foi à associação do Cloridato de Ketamina com o Cloridato de Xilazina, pelo fato de ser uma das mais utilizadas em animais de pequeno porte. Apresenta na sua associação além do sedativo o relaxante muscular, que atua na vasoconstrição, evitando sangramentos extensos, que são preocupantes em animais como o rato, o qual apresenta baixo peso, pequena área corporal e alto metabolismo. Por essas razões essa associação é vastamente utilizada por outros pesquisadores. A via de administração escolhida foi a intramuscular, por proporcionar sedação gradativa por maior tempo utilizando uma concentração de anestésico baixa (0,10ml/100g), já que a cirurgia experimental empregada desprende um tempo grande de trabalho (DUPLAS et al., 2001). Outros

autores utilizam vias de administração diferentes, como por exemplo, a intraperitoneal, a qual apresenta uma sedação mais rápida e maior absorção, empregada em estudos que é necessário um tempo menor de sedação da cobaia.

6 CONCLUSÃO

Com base na metodologia utilizada, pudemos concluir que a estimulação elétrica pela corrente aússia proporcionou melhora morfológica e funcional em ratos com lesão nervosa periférica após a realização de neurorrafia término-lateral.

REFERÊNCIAS

ARSLANTUNALI, D., *et al.* Peripheral nerve conduits: technology update. **Med Devices.** v. 7. p.405-424, 2014.

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.129-36; 1989.

BPR GUIA DE REMÉDIOS®. Edição: 2010-2011.

CARVALHO, D. C. I.; ROSIM, G. C.; GAMA, L. O. R.; TAVARES, M. R.; TRIBIOLI, R. A.; SANTOS, I. R.; CLIQUET JÚNIOR, A. Tratamentos não farmacológicos na estimulação da osteogênese. **Rev Saúde Pública.** v.36, n.5, p. 647-54, 2002.

CLOUTIER, F. C.; ROULEAU, D. M.; HÉBERT-DAVIES, J.; BEAUMONT, P. H.; BEAUMONT, E. Atorvastatin is beneficial for muscle reinnervation after complete sciatic nerve section in rats. **J Plast Surg Hand Surg,** Canadá, July. 2013. In press. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/> >. Acesso em: 23 jul. 2013.

DE MEDINACELLI, L.; FREED, W.J.; WYATT, R.J. Na 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.

DUPLAS, J.; VACHON, P.; CUVELLIEZ, S.; BLAIS, D. Anesthésie du lapin de Nouvelle-Zélande utilisant les combinaisons tiletamine-zolazepam et ketamine-midazolam avec ou sans xylazine. **Can Vet J.** Quebec, v. 42, n. 6, p. 455-460, Junho. 2001.

GEORGIU, M.; BUNTING, S.C.; DAVIES H.A.; LOUGHLIN A.J.; GOLDING, J.P.; PHILLIPS, J.B. **Engineered neural tissue for peripheral nerve repair.** Biomaterials. Milton Keynes, v. 34, n. 30, p. 7335–7343, Outubro. 2013.

GIROLAMI, U.; 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. p.1135-54; 2000.

HUNDESHAGEN, G.; SZAMEIT, K.; THIEME, H.; FINKENSIEPER, M.; ANGELOV, D. N.; GUNTINAS-LICHIUS, O.; IRINTCHEV, A. Deficient functional recovery after facial nerve crush in rats is associated with restricted rearrangements of synaptic terminals in the facial nucleus. **Neuroscience,** Jena, v. 248, p. 307-318, Setembro. 2013.

IÑIGO, P. R. Estimulación concorrentes de alta frecuencia para laticatrización de la ruptura de meniscos en las lesiones en zona vacular y avascular, reporte preliminar de um nuevo abordaje terapéutico. **Ver Mex Ortop Traumatol.** v.12, n.5, p.421-4, 1998.

KANE, D. D.; SHOTT, S.; HUGHES, W. F.; KERNS, J. M. Motor Pudendal Nerve Characterization in the Female Rat. **Anat Rec (Hoboken)**. Chicago, v. 266, n.1, p. 21-29. Outubro. 2002.

KOTWAL, A.; SCMIDT, C. E. Electrical stimulation alters absorption and nerve cell interactions with electrically conducting biomaterials. **Biomaterials**. v.22, n.10, p.1055-64, 2001.

KOUYOUMDJIAN, J. A. Peripheral nerve injuries: a retrospective survey of 456 cases. **Muscle Nerve**. São José do Rio Preto/Brasil. v. 34, n. 6, p. 785–788, Dezembro. 2006.

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

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 Cir Bras**. v.28, n.1, p.39-47. Janeiro, 2013.

NEMETH, P. M. Electrical stimulation of denervated muscle prevents decreases in oxidative enzymes. **Muscle Nerve**. v.5, n.2, p.134-9, 1982.
P.R. VADE-MÉCUM, 2009-2010.

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 Research**. v.253, p.1-12, 1982.

ROVAK, J. M.; CEDERNA, P. S.; KUZON, W. M. Termino lateral neurorrhaphy: a review of the literature. **J Reconstr Microsurg**, v.17, n.8, p.615-24, 2001.

SATO, K. M. **Comparação de neurorrafias término-terminais e término-laterais na reconstrução do nervo mediano: pesquisa experimental em ratos Wistar adultos** [TCC Graduação Medicina]. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

SAYGILI, E.; KLUTTIG, R.; RANA, O. R.; SAYGILI, E.; GEMEIN, C.; ZINK, M. D.; RACKAUSKAS, G.; WEIS, J.; SCHWINGER, R. H.; MARX, N.; SCHAUERTE, P. Age-related regional differences in cardiac nerve growth factor expression. **Age (Dordr)**, Alemanha, v. 34, n. 3, p. 659-667, Junho. 2012.

SEBEN, A. D, *et al.* Efeito de fatores neurotróficos sobre o reparo de nervo periférico/ Effect of neurotrophic factors on peripheral nerve repair. **Sciencia Medica**. Porto Alegre, v. 21, n. 2, p. 81-89, 2013.

SELKOWITZ, D.M.; High frequency electrical stimulation in muscle strengthening. **Am J Sports Med**. v.17, p.103–111, 1989.

SENE, G. A. L., *et al.* Efeitos da laserterapia na regeneração nervosa periférica / Effects of laser therapy in peripheral nerve regeneration. **Acta ortop.** v.21, n.5, p.266-270, 2013.

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.819-24, 2001.

SU, H.; YUAN, Q.; QIN, D.; YANG, X.; WONG, W. M.; SO, K. F.; WU, W. Ventral root re-implantation is better than peripheral nerve transplantation for motoneuron survival and regeneration after spinal root avulsion injury. **BMC Surg.** China, v. 13, n. 1, p. 21, Junho. 2013.

VITERBO, F. **Neurorrafia Látero-Terminal, estudo experimental no rato.** [Tese de Doutorado]. Botucatu: Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina, 1992.

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. **Plastic and Reconstructive Surgery.** v.94, p.1038-47, 1994.

WARD, A.R.; LUCAS-TOUMBOUROU, S. Lowering of sensory, motor and pain-tolerance thresholds with burst duration using kHz frequency alternating current electrical stimulation. **Archives of Physical Medicine and Rehabilitation.** v.88, n.8, p.1036-1041, 2007.

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.589-96, 1996.