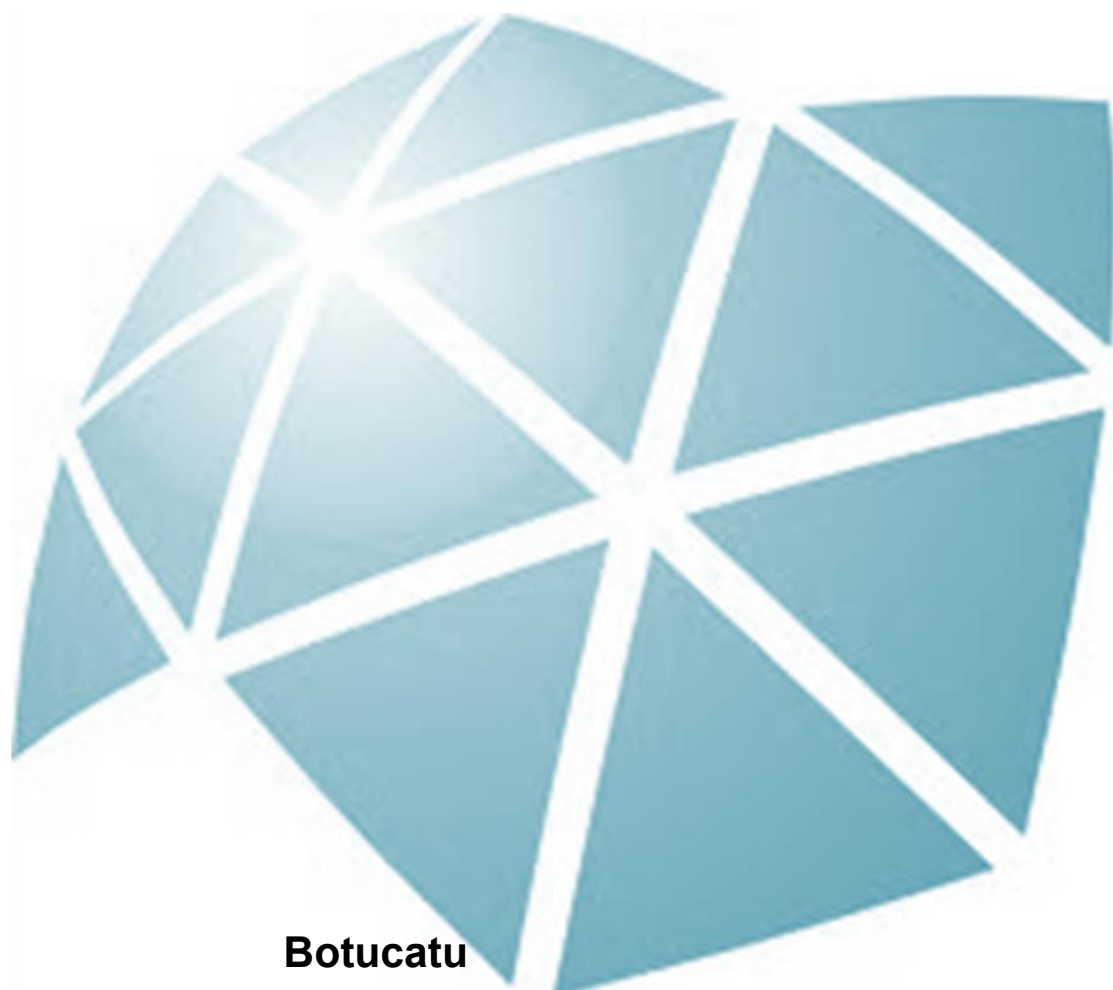




UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

**ANÁLISE DO EXERCÍCIO FÍSICO E ELETROESTIMULAÇÃO  
DO MÚSCULO TIBIAL CRANIAL APÓS NEURORRAFIA  
TÉRMINO-LATERAL DO NERVO FIBULAR EM RATOS.**



**Botucatu**

**2015**

**VÍVIAN CRISTINA ROSA**

**ANÁLISE DO EXERCÍCIO FÍSICO E ELETROESTIMULAÇÃO  
DO MÚSCULO TIBIAL CRANIAL APÓS NEURORRAFIA  
TÉRMINO-LATERAL DO NERVO FIBULAR EM RATOS**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Medicina de Botucatu, para obtenção do título de Mestra em Bases Gerais da Cirurgia.

**Orientador: Prof. Adj. Fausto Viterbo**

**Botucatu**

**2015**

## **VÍVIAN CRISTINA ROSA**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Medicina de Botucatu, para obtenção do título de Mestra em Bases Gerais da Cirurgia.

Orientador: Prof. Adj. Fausto Viterbo.

Comissão Examinadora:

---

Prof. Adj. Fausto Viterbo de Oliveira Neto  
Faculdade de Medicina de Botucatu – FMB/UNESP

---

Botucatu, 24 de fevereiro de 2015.

# *Dedicatória*

Dedico este trabalho à minha família, que com muito carinho e apoio, não mediu esforços para que eu chegasse até esta etapa da minha vida.

# *Agradecimentos*

Agradeço a **Deus** por ter me dado força e paciência para alcançar os meus objetivos.

Ao **Prof. Dr. Fausto Viterbo**, pela oportunidade de realizar minha dissertação com sua orientação, fazendo desenvolver meu crescimento pessoal e profissional no período do mestrado.

Ao meu irmão **Dr. Geraldo Marco Rosa Junior** por toda dedicação, ajuda e ensinamentos. Sua presença foi fundamental na realização do meu mestrado. Tenho como referência seu esforço, entusiasmo e determinação, que vou levar por toda minha vida.

Aos meus pais **Geraldo** e **Salete**, por todo o suporte, paciência e amor que demonstraram durante essa fase de estudos e trabalhos.

À **Natália Orti** e **Cecília Malheiro**, por todos os momentos de convívio e dedicação para ajudar a finalizar essa dissertação.

À **Clínica Omnia**, pela compreensão durante minhas ausências para estudar para o mestrado.

À equipe da seção de pós-graduação e a secretária do programa de Bases Gerais da Cirurgia, **Márcia Fonseca Piagentini Cruz**, pelo atendimento prestado, pelos esclarecimentos e competência.

Aos funcionários do Laboratório de Cirurgia Experimental, em especial ao funcionário **Bardella** pelo acompanhamento, ensinamentos e apoio nas cirurgias.

Aos funcionários do Laboratório Experimental de Urologia, em especial ao funcionário **Lucas** pelo processamento histológico das amostras, pelos cortes, morfometrias e colorações.

Aos Docentes do Programa Bases Gerais da Cirurgia – Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP.

Aos funcionários da biblioteca.

Ao GAP (Grupo de Apoio à Pesquisa).

*Epigrafe*



“Paciência e persistência são qualidades vitais no resultado final para realizar algum esforço que valha a pena.” Joseph Pilates

# *Sumário*

## SUMÁRIO

RESUMO	
ABSTRACT	
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	
LISTA DE TABELAS	
1 INTRODUÇÃO	17
2 OBJETIVO	23
3 MÉTODO	25
3.1 ANIMAIS	26
3.2 DELINEAMENTO DOS GRUPOS	26
3.3 PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS	28
3.4 EXERCÍCIO DE NATAÇÃO	30
3.5 ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA	30
3.6 ANÁLISE FUNCIONAL DA MARCHA	32
3.7 ANÁLISE ELETROFISIOLÓGICA	33
3.8 FORÇA MUSCULAR	34
3.9 COLETA DAS AMOSTRAS	34
3.10 PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO DOS NERVOS	35
3.11 PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO DOS MÚSCULOS	35
3.12 ANÁLISE MORFOMÉTRICA	35
3.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA	37
4 RESULTADOS	38
4.1 ÁREAS E DIÂMETROS DAS FIBRAS NERVOSAS	39
4.2 ÁREAS E DIÂMETROS DOS AXÔNIOS	41
4.3 ÁREAS E ESPESSURAS DAS BAINHAS DE MIELINA	44
4.4 RAZÃO G	47
4.5 MORFOMETRIA DAS FIBRAS MUSCULARES	48
4.6 ANÁLISE ELETROFISIOLÓGICA	51
4.7 FORÇA MUSCULAR	54
4.8 ANÁLISE FUNCIONAL DA MARCHA	56
5 DISCUSSÃO	58
5.1 MÉTODOS	59

5.2 ANÁLISE FUNCIONAL DA MARCHA.....	62
5.3 ANÁLISE ELETROFISIOLÓGICA.....	63
5.4 ANÁLISE DA FORÇA MUSCULAR .....	64
5.5 ANÁLISE MORFOMÉTRICA.....	65
6 CONCLUSÃO.....	66
REFERÊNCIAS.....	68
ANEXO.....	77

## RESUMO

Lesões de nervos periféricos podem ser extremamente incapacitantes. Nesse contexto, a microcirurgia vem apresentando um papel fundamental no tratamento dos pacientes. Entretanto, mesmo com todo refinamento técnico obtido com a microcirurgia, ainda não se obtém total recuperação motora. Tal fato se justifica pela degeneração muscular, atrofia e perdas funcionais geradas pela desnervação. Em âmbito clínico, alguns recursos fisioterapêuticos têm sido sugeridos na tentativa de minimizar as perdas decorrentes do quadro de desnervação. Dentre esses recursos, destacam-se a eletroestimulação e o exercício físico. A utilização da eletroestimulação é justificada por esta ser capaz de minimizar a atrofia durante a desnervação. De maneira diferente, a aplicação do exercício tem como principal justificativa o estímulo na produção de fatores neurotróficos, fato este que poderia potencializar a regeneração axonal e, por conseguinte, promover uma melhor reinervação. Todavia, tanto para aplicação da eletroestimulação quanto para execução do exercício físico, existem algumas controvérsias no que se refere aos parâmetros utilizados. O objetivo desse trabalho foi analisar a eficiência da eletroestimulação, do exercício de natação, e da associação entre os dois recursos, na regeneração nervosa após neurorrafia término-lateral do nervo fibular. Para a realização do experimento, os animais foram divididos em 2 grupos controles GC e GD e 4 grupos experimentais GNTL, GNTL+EE, GNTL+N e GNTL+EE+N. Os animais dos grupos experimentais passaram por cirurgia experimental de neurorrafia término-lateral, sendo que em três grupos protocolos pós-cirúrgicos de eletroestimulação, exercício de natação e de associação entre eletroestimulação e natação foram utilizados. Os resultados obtidos demonstraram que a eletroestimulação, o exercício físico e a associação dos tratamentos apresentaram resultados superiores em relação ao grupo GNTL e o grupo GNTL+EE+N foi superior aos grupos de tratamentos isolados na regeneração nervosa e muscular.

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

## ABSTRACT

Lesions of peripheral nerves can be extremely disabling. In this context, microsurgery has presented a major role in the treatment of patients. However, even with all technical refinement achieved by microsurgery, full motor recovery has not been ensured yet. This can be explained by muscle degeneration, atrophy and functional losses generated by denervation. In the clinical setting, some physiotherapy resources have been suggested in order to minimize losses due to denervation. Among these resources, electrical stimulation and exercise are the main options. The use of electrical stimulation is justified because it is able to minimize the atrophy during denervation. Differently, the application of exercise is justified to stimulate the production of neurotrophic factors, a fact that could enhance axonal regeneration and, next, to promote better reinnervation. However, to both electrical stimulation and exercise there are some controversies regarding the parameters used. The aim of this study was to analyze the efficiency of electrical stimulation, swimming exercise and the association between these two actions, in nerve regeneration after fibular nerve end-to-side neurorrhaphy. For the experiment, the animals were divided into two control groups GC and GD and 4 experimental groups GNTL, GNTL + EE, GNTL + N and GNTL + EE + N. The animals of the experimental groups underwent experimental surgery of end-to-side neurorrhaphy and in three post surgical groups the protocols of electrostimulation, swimming exercise and the association between electrostimulation and swimming were used. The results demonstrated that electrical stimulation, physical exercise and the association of the treatments showed superior results compared to GNTL group and the group GNTL + EE + N was superior to treatment isolated groups in nerve and muscle regeneration.

**Keywords:** End-to-side Neurorrhaphy. Electrostimulation. Swimming exercise. Experimental surgery. Muscle atrophy.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Esquema representativo das cirurgias nos grupos .....	28
Figura 2 – Ramos do nervo isquiático .....	29
Figura 3 – Neurorrafia Término-Lateral .....	29
Figura 4 – Exercício de natação realizado em tanque cilíndrico .....	30
Figura 5 – Aparelho utilizado para estimulação elétrica .....	31
Figura 6 – Cápsula metálica usada para a eletroestimulação .....	32
Figura 7 – Eletromiógrafo da marca Sapphire II 4ME utilizado para as análises .....	34
Figura 8 - Sistema de análise de imagem .....	36
Figura 9 – Análise morfométrica dos nervos .....	36
Figura 10 – Análise morfométrica dos músculos .....	37
Figura 11 – Gráfico da média da área das fibras nervosas .....	40
Figura 12 - Gráfico da média do diâmetro das fibras nervosas .....	41
Figura 13 – Gráfico da média da área dos axônios .....	42
Figura 14– Gráfico da média do diâmetro dos axônios .....	43
Figura 15 – Gráfico da média das áreas da bainha de mielina .....	45
Figura 16 –Gráfico da média da espessura da bainha de mielina .....	46
Figura 17 – Gráfico da média da Razão G .....	47
Figura 18 – Gráfico da média da fibra muscular .....	48
Figura 19 – Gráfico da média do diâmetro da fibra muscular .....	49
Figura 20 – Gráfico da média da amplitude .....	51
Figura 21 – Gráfico da média da latência .....	52
Figura 22 – Gráfico da média da força muscular .....	53
Figura 23 – Gráfico com as médias obtidas pela análise de marcha .....	55

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Média e desvio padrão da área das fibras nervosas.....	39
Tabela 2 - Média e desvio padrão dos diâmetros mínimos das fibras nervosas.....	40
Tabela 3 - Média e desvio padrão da área dos axônios .....	42
Tabela 4 - Média e desvio padrão dos diâmetros mínimos dos axônios.....	43
Tabela 5 - Média e desvio padrão das áreas das bainhas de mielina.....	44
Tabela 6 - Média e desvio padrão das espessuras das bainhas de mielina.....	45
Tabela 7 – Média e desvio padrão da Razão G.....	46
Tabela 8 - Média e desvio padrão das áreas das fibras musculares.....	48
Tabela 9 - Média e desvio padrão dos diâmetros mínimos das fibras musculares.....	49
Tabela 10 - Média e desvio padrão da amplitude .....	50
Tabela 11 – Média e desvio padrão da latência.....	51
Tabela 12- Média e desvio padrão da força muscular.....	53
Tabela 13 - Média e desvio padrão da análise funcional da marcha.....	54



# *Introdução*

## 1 INTRODUÇÃO

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

Atualmente a técnica cirúrgica mais difundida na reparação de nervos periféricos é a neurorafia término-terminal. Nesse tipo de cirurgia, os cotos proximal e distal devem apresentar-se visíveis e íntegros, sem perda de tecido, para que estes sejam religados novamente através de uma sutura (Rovak *et al*, 2001). No entanto, em algumas situações específicas, o coto proximal do nervo lesado é perdido, permanecendo apenas o coto distal, sendo inviável a execução cirúrgica término-terminal. Nesse caso, a opção pela neurorafia término-lateral parece ser a melhor forma de tratamento, visto que não há necessidade de enxerto nervoso e, conseqüentemente, o sacrifício de um nervo doador. Essa neurorafia, sem lesão no nervo doador foi introduzida por Viterbo (1992).

A neurorafia término-lateral consiste na coaptação do coto distal lesionado em um nervo doador intacto adjacente. A partir de então, os axônios presentes no nervo doador emitem ramos em um processo denominado brotamento colateral (MARTIN et al, 2000; KOVACIC et al, 2007; RAY & MACKINNON, 2009; YU et al,

2011), no qual ocorre a entrada dos novos axônios no nervo coaptado, por onde estes irão crescer até que atinjam a estrutura-alvo.

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

Apesar de alguns estudos demonstrarem resultados satisfatórios com relação à neurorrafia término-lateral, outros resultados ainda apresentam controvérsias (BERTELLI et al, 1996; BERTELLI & GHIZONI, 2003; PONDAAG & GILBERT, 2008). Por isso, diante dessa divergência de evidências, a neurorrafia término-lateral é sugerida como opção em situações clínicas específicas, ou seja, nos casos em que o segmento proximal do tronco nervoso lesionado não esteja disponível (LUNDBORG, 1994; LUNDBORG, 2000).

Entretanto, mesmo com todo o refinamento técnico obtido com a microcirurgia e por melhor que tenha sido realizada a reparação do nervo lesionado, ainda não se obtém total recuperação motora (SUNDERLAND, 1985). Tal fato se justifica pelo período de desnervação parcial, no qual ocorrerá atrofia da musculatura, que promove prejuízo funcional para o músculo dependente dessa inervação (STARKEY, 2001; LOW & REED 2001; ROBINSON & SNYDER-MACKLER, 2001; ROMÃO et al, 2007).

Sob uma perspectiva ultraestrutural, além da atrofia das fibras musculares, o processo de desnervação resulta na redução da área de secção transversa da fibra

muscular e a transição de todas as fibras, independente de sua morfologia anterior, para fibras do tipo rápidas (FITTS et al, 2000). Ademais, após longo período de desnervação, evidencia-se uma invasão de células adiposas no tecido muscular (RODRIGUES et al, 2007), com conseqüente apoptose das fibras musculares (DAVATZ et al, 2007).

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

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

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

As investigações sobre o uso da eletroestimulação com finalidade regenerativa são extensas, porém os procedimentos utilizados ainda são controversos. Portanto, não há consenso quanto à intensidade, frequência, duração e métodos de avaliação utilizados. Vários autores, como Tagami et al (2009), observaram que a regeneração neuromuscular durante a aplicação de

eletroestimulação acontece de forma benéfica e sem prejuízos funcionais, tanto em ratos (NEMETH, 1982; KANAYA & TAJIMA, 1992; WILLIAMS, 1996; IÑIGO, 1998; GORDON et al, 2009; MACIEL et al, 2013) como em humanos (NICOLAIDS & WILLIAMS, 2001; MODLIN et al, 2005). Em contrapartida, outros pesquisadores afirmam que a aplicação da eletroestimulação pode ser nociva (SOUZA et al, 2001; KOTWAL; SCHMIDT, 2001; CARVALHO et al, 2002), podendo acelerar a atrofia muscular (GIGO-BENATO et al., 2010).

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

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

A natação é considerada uma das técnicas mais utilizadas em pesquisas, com a finalidade de se estudar os efeitos do exercício em âmbito experimental. Segundo Gobatto et al (2001), esse tipo de exercício possui diversas vantagens,

principalmente devido a não necessidade da seleção de animais, já que todos possuem habilidade inata de nadar. Embora sejam poucos os estudos que investigaram a influência da natação sobre a regeneração nervosa periférica, os resultados destes mostraram-se positivos (TEODORI et al, 2011) ou que a natação não interferiu no processo regenerativo (OLIVEIRA et al, 2008).

Considerando o vasto universo de possibilidades terapêuticas, especialmente a eletroestimulação e o exercício físico, a proposta do presente trabalho consistiu em investigar se essas modalidades de tratamento teriam a capacidade de melhorar a recuperação do músculo após neurraxia término-lateral.

*Objetivo*

## **2 OBJETIVO**

O objetivo deste trabalho foi investigar o efeito da eletroestimulação, do exercício físico e da associação desses tratamentos sobre a regeneração nervosa e a consequente resposta muscular nos aspectos morfológicos, morfométricos e funcionais de nervos periféricos e músculo estriado esquelético após neurorrafia término-lateral do nervo fibular.



*Método*

### 3 MÉTODO

#### 3.1 ANIMAIS

Foram utilizados 110 ratos machos da linhagem Wistar, os quais apresentaram massa entre 200 e 250 gramas, com aproximadamente três meses de idade, provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina de Botucatu – FMB/UNESP. Os animais foram mantidos em caixas apropriadas (quatro animais por caixa) e recebiam água e ração “*ad libitum*”, respeitando ciclos de 12 horas de luz, em temperatura média de 24°C.

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

#### 3.2 DELINEAMENTO DOS GRUPOS

Os 110 animais foram aleatoriamente distribuídos em seis grupos, constituídos da seguinte forma:

**1. Grupo Controle Final (GC):** Constituído por 10 animais. Os animais não passaram por nenhum tipo de intervenção e foram sacrificados no final do experimento. (Fig. 1-A).

**2. Grupo Desnervado (GD):** Constituído por 20 animais. Os animais passaram por procedimento cirúrgico de desnervação (Fig. 1-B) e não foram submetidos a nenhum tipo de tratamento. Para a desnervação, o nervo fibular foi seccionado, o coto proximal foi transpassado por uma incisão na musculatura glútea e suturado em sua porção externa a fim de impedir reinervação motora. O coto distal foi suturado na tela subcutânea.

**3. Grupo Neurorrafia Término-Lateral (GNTL):** Constituído por 20 animais. Os animais passaram por procedimento cirúrgico para realização da neurorrafia término-lateral (Fig. 1-C). Para isso, o nervo fibular foi seccionado e seu coto proximal encurvado medialmente, transfixando o músculo adutor, sendo suturado na face superficial desse músculo, impedindo a regeneração espontânea. O coto distal do nervo fibular foi encurvado e suturado lateralmente ao nervo tibial, com fio monofilamentar de náilon 10-0, a partir de dois pontos simples.

**4. Grupo Neurorrafia Término-Lateral + Estimulação Elétrica (GNTL+EE):** Constituído por 20 animais. Os animais passaram por procedimento cirúrgico para realização da neurorrafia (Fig. 1-C), com aplicação de estimulação elétrica nos três meses subsequentes.

**5. Grupo Neurorrafia Término-Lateral + Natação (GNTL+N):** Constituído por 20 animais. Os animais passaram por procedimento cirúrgico para realização da neurorrafia (Fig. 1-C) e foram submetidos a um protocolo de exercício de natação nos três meses subsequentes.

**6. Grupo Neurorrafia Término-Lateral + Estimulação Elétrica + Natação (GNTL+EE+N):** Constituído por 20 animais. Os animais passaram por procedimento cirúrgico para realização da neurorrafia (Fig. 1-C) e foram submetidos a um protocolo de estimulação elétrica e exercício de natação.

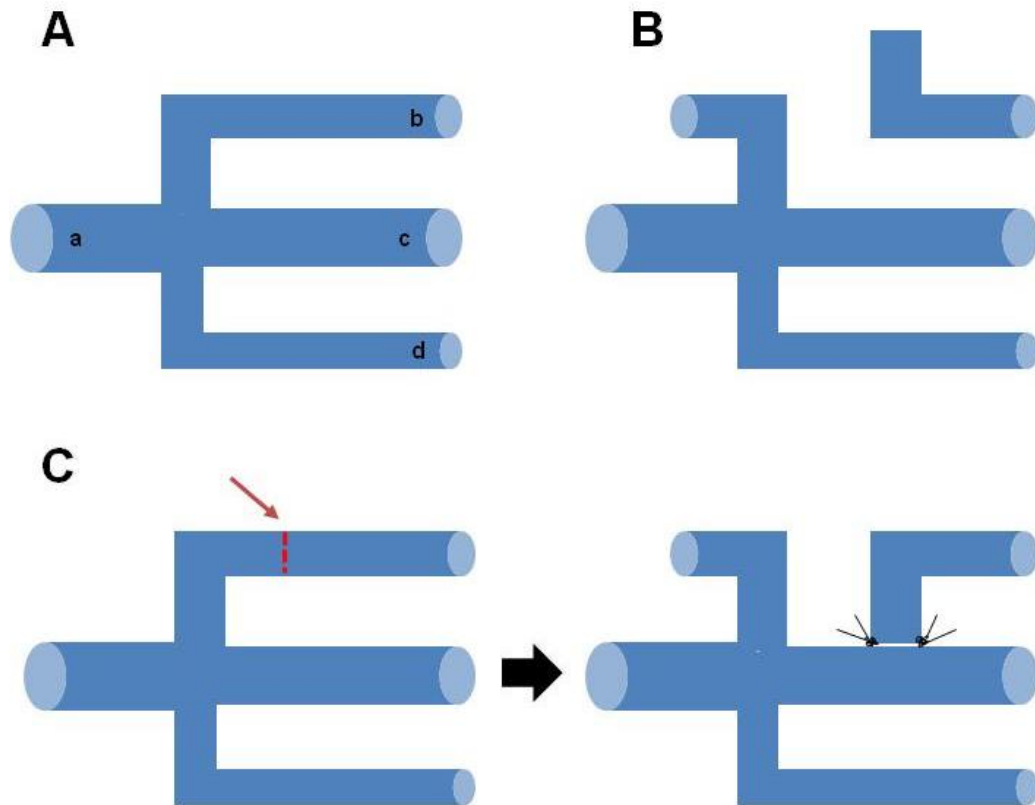


Figura 1 – Esquema representativo das cirurgias nos grupos. A- GCF; B- GD; C- GNTL, GNTL+EE, GNTL+N e GNTL+EE+E. Seta vermelha representa o local da transecção no nervo fibular comum; a = nervo isquiático, b = nervo fibular comum, c = nervo tibial, e d = nervo sural.

### 3.3 PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS

Os animais tiveram suas massas definidas e foram submetidos à anestesia geral através de injeção intramuscular de ketamina (70 mg/Kg) e xilasina (30 mg/Kg) na região dorso lateral do membro pélvico esquerdo. Por conseguinte, foi realizada a tricotomia da face dorso-lateral do membro pélvico direito.

Anestesiados, os animais foram posicionados em decúbito ventral sobre placa de cortiça. O membro pélvico direito foi fixado com fita adesiva, para que então fosse efetuada uma incisão longitudinal na face dorso-lateral. A pele e a tela subcutânea foram rebatidas e os músculos suprajacentes divulsionados para exposição do nervo

isquiático e seus respectivos ramos, nesse caso, os nervos fibular comum, tibial e sural (Fig. 2).

As neurorrafias foram realizadas com a ajuda de um microscópio cirúrgico DF Vasconcelos (Brasil) com aumentos de 10 e 16 vezes.

As neurorrafias foram realizadas sem abertura da janela epineural, apenas com dois pontos simples de fio monofilamentar de náilon 10-0 comprometendo o epineuro tanto do nervo doador quanto do nervo receptor, conforme Fig. 3.

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

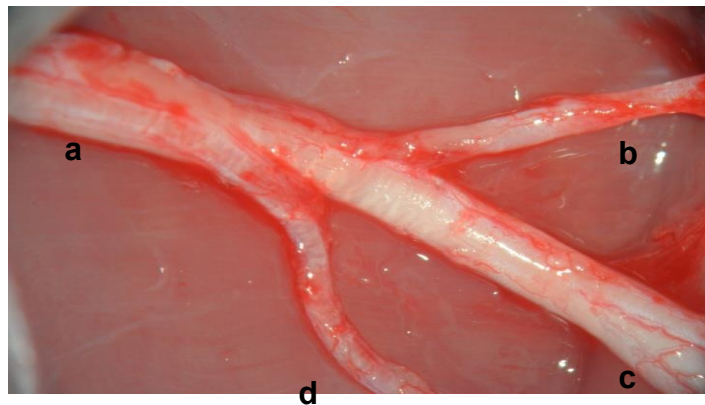


Figura 2 – Ramos do nervo isquiático; a = nervo isquiático, b = nervo fibular comum, c = nervo tibial, e d = nervo sural.



Figura 3 – Neurorrafia término-lateral.

### 3.4 EXERCÍCIO DE NATAÇÃO

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

Em cada sessão de exercício os animais realizavam 30 minutos de natação de forma coletiva, em tanque cilíndrico de plástico, com água aquecida ( $32\pm 2^\circ$ ) e preenchida até aproximadamente 40 cm de altura (Fig. 4).

Foi utilizado um programa de exercício básico sem provocar nenhum tipo de estresse físico para o animal.



Figura 4 – Exercício de natação realizado em tanque cilíndrico.

Após o término do exercício o animal foi retirado da água, secado com auxílio de uma toalha e realocado em sua respectiva caixa.

### 3.5 ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA

Uma semana após o procedimento cirúrgico, os animais do GNTL+EE e GNTL+EE+N foram submetidos à aplicação de estimulação elétrica de média

frequência por três meses. Para o grupo GNTL+EE a estimulação elétrica foi aplicada três vezes por semana, enquanto que para o GNTL+EE+N foi aplicada duas vezes por semana, nos dias em que os animais não realizavam natação.

A estimulação elétrica foi aplicada durante 20 minutos usando-se o aparelho Endophasys-KLD® (Fig. 5), ajustado com os seguintes parâmetros: frequência de 2500 Hz, período de 0,4 ms, modulação de 50%, frequência de 30 Hz e 100 Hz, 10 minutos em cada, tempos de contração (TON) e relaxamento (TOFF) de 10 segundos e 20 segundos, respectivamente. A intensidade (mA) da corrente foi ajustada de modo a promover a contração do músculo tibial cranial, caracterizada pelo movimento de dorsiflexão.



Figura 5 – Aparelho Endophasys – R KLD® utilizado na estimulação elétrica.

Para aplicação da corrente os animais foram colocados em cápsulas metálicas (Fig. 6), de forma a imobilizar sua cintura pélvica e garantir a exposição de ambos os membros pélvicos. Esse método é considerado vantajoso, visto que se torna desnecessária a anestesia do animal durante a aplicação da estimulação elétrica.



Figura 6 – Cápsula metálica usada para a eletroestimulação.

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

### 3.6 ANÁLISE FUNCIONAL DA MARCHA

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



### 3.7 ANÁLISE ELETROFISIOLÓGICA

Para análise eletrofisiológica os animais foram anestesiados com ketamina (0,3 ml/kg, i.m.) associada à xilasina (0,3 ml/kg, i.m.) e imobilizados em placas de cortiça em decúbito ventral.

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

A avaliação das propriedades funcionais do músculo foi feita por meio de estímulos elétricos deflagrados por um eletrodo bipolar, especialmente desenvolvido para este propósito, cujo cátodo e ânodo estavam distantes 2mm. O eletrodo de estimulação bipolar foi posicionado diretamente sobre o nervo isquiático, anterior à região da neurorrafia término-lateral, e a estimulação foi realizada proximal à neurorrafia, possibilitando a propagação dos impulsos elétricos através dela.

A frequência do estímulo foi fixada em 1pps e a duração em 100  $\mu$ s. A intensidade de estímulo utilizada, constante em todos os animais, foi de 5,1 volts. Os dados de amplitude e latência foram comparados entre os seis grupos. Para todo procedimento foi utilizado eletromiógrafo da marca Sapphire II 4ME (Fig. 7).



Figura 7 – Eletromiógrafo da marca Sapphire II 4ME utilizado para as análises.

### 3.8 FORÇA MUSCULAR

O tendão distal do MTC foi seccionado e conectado a um transdutor de força FT03 Grass Technologies Company, Astro-Med, Inc. (West Warwick, RI), através do uso de um fio monofilamentar de náilon 4-0. O comprimento ideal do músculo foi mantido em uma carga de pré tensão de 0,18 N e foi zerada entre os testes.

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

### 3.9 COLETA DAS AMOSTRAS

Após a realização do teste de força de contração muscular o nervo fibular Comum foi coletado juntamente com o músculo tibial Cranial. As amostras dos nervos foram fixadas e mantidas em solução de Karnovisk e ficaram refrigerados a

4°C até ser realizado o processamento histológico. Os músculos foram mantidos em nitrogênio líquido a -196°C até ser realizado o processamento histológico.

### **3.10 PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO DOS NERVOS**

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

### **3.11 PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO DOS MÚSCULOS**

Para o tratamento histológico as amostras dos músculos passaram por um protocolo de congelamento em nitrogênio líquido, para obtenção de cortes histológicos de dez micrômetros em criostato a -20°C e confecção das lâminas histológicas em coloração de Hematoxilina e Eosina (HE).

### **3.12 ANÁLISE MORFOMÉTRICA**

A captura das imagens foi realizada com auxílio de um micro computador com software de captura e análise de imagem, acoplado a um microscópio óptico (Leica DMLS) (Fig. 8). Todas as imagens foram analisadas com auxílio do programa de análise de imagem Sigma Scan Pro 5.0. Foram mensuradas 220 fibras nervosas por animal. As variáveis morfométricas estudadas foram: área e diâmetro mínimo das fibras e dos axônios e área e espessura das bainhas de mielina (Fig. 9). Para análise dos músculos, foram mensuradas 220 fibras musculares por animal. As variáveis morfométricas estudadas foram área e diâmetro mínimo da fibra muscular (Fig. 10).



Figura 8 - Sistema de análise de imagem

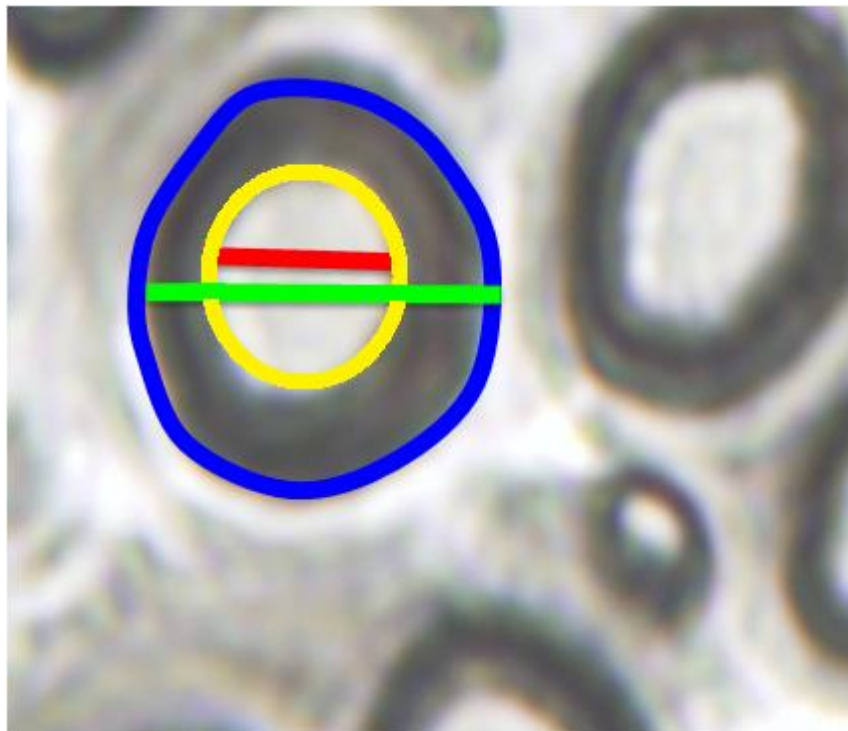


Figura 9 – Análise morfométrica dos nervos.  
Representam: área azul = área da fibra nervosa; área amarela = área do axônio; linha verde = diâmetro mínimo da fibra nervosa; linha vermelha = diâmetro mínimo do axônio.

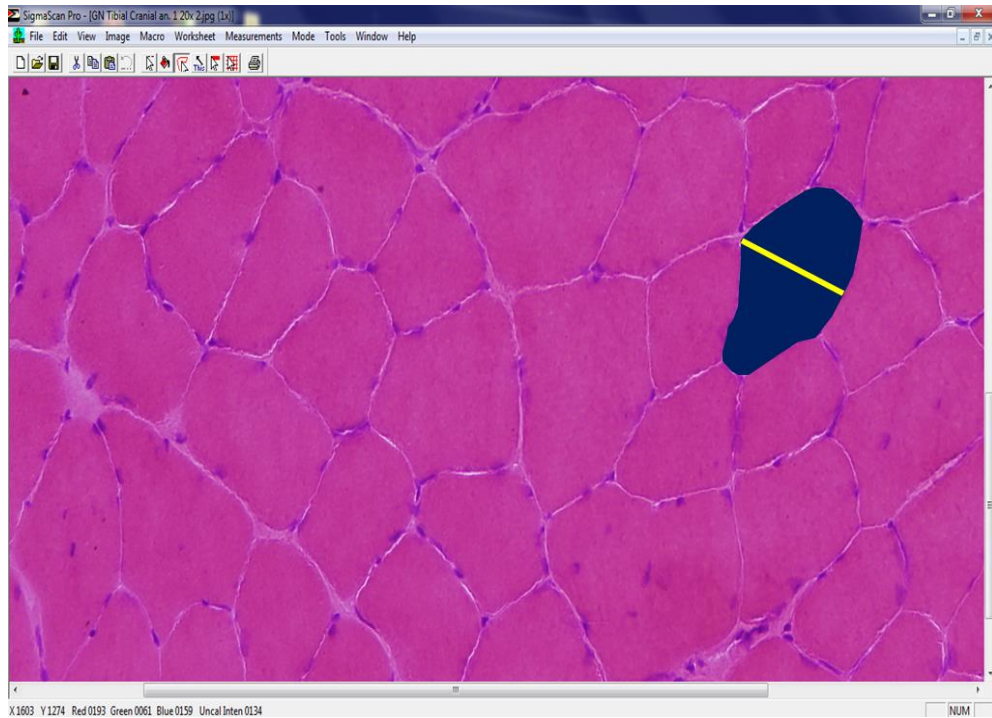


Figura 10 – Análise morfométrica dos músculos. Representam: área azul = área da fibra muscular; linha amarela = diâmetro mínimo da fibra muscular.

### 3.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA

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

*Resultados*

## 4 RESULTADOS

### 4.1 ÁREAS E DIÂMETROS DAS FIBRAS NERVOSAS

Os dados obtidos pela média das áreas das fibras nervosas mostram que o grupo GNTL+EE+N apresentou o melhor resultado dos grupos experimentais ( $29,13\mu\text{m}^2$ ), respectivamente. Na sequência, o grupo com melhor resultado foi o GNTL+N ( $25,41\mu\text{m}^2$ ), seguido pelo GNTL+EE, que na variável área das fibras nervosas apresentou melhor resultado ( $21,38\mu\text{m}^2$ ) quando comparado com o grupo GNTL ( $16,00\mu\text{m}^2$ ).

Na variável do diâmetro mínimo das fibras nervosas o grupo GNTL+EE+N apresentou o melhor resultado ( $5,96\mu\text{m}$ ) a diferença entre o GNTL+EE ( $4,88\mu\text{m}$ ) e GNTL ( $4,05\mu\text{m}$ ) não foi significativa. Os resultados podem ser observados nas tabelas 1 e 2 e nas figuras 11 e 12.

Tabela 1 – Média ( $\mu\text{m}^2$ ) e desvio padrão da área das fibras nervosas. Letras diferentes indicam diferença estatística.

	Áreas das Fibras Nervosas	
	Média	DP
<b>GD</b>	0 <sup>a</sup>	0
<b>GNTL</b>	16,00 <sup>b</sup>	3,55
<b>GNTL+EE</b>	21,38 <sup>c</sup>	1,81
<b>GNTL+N</b>	25,41 <sup>d</sup>	2,02
<b>GNTL+EE+N</b>	29,13 <sup>e</sup>	2,73
<b>GC</b>	50,76 <sup>f</sup>	3,27

Avaliando as áreas das fibras nervosas tem-se  $\text{GCF} > \text{GNTL+EE+N} > \text{GNTL+N} > \text{GNTL+EE} > \text{GNTL} > \text{GD}$ .

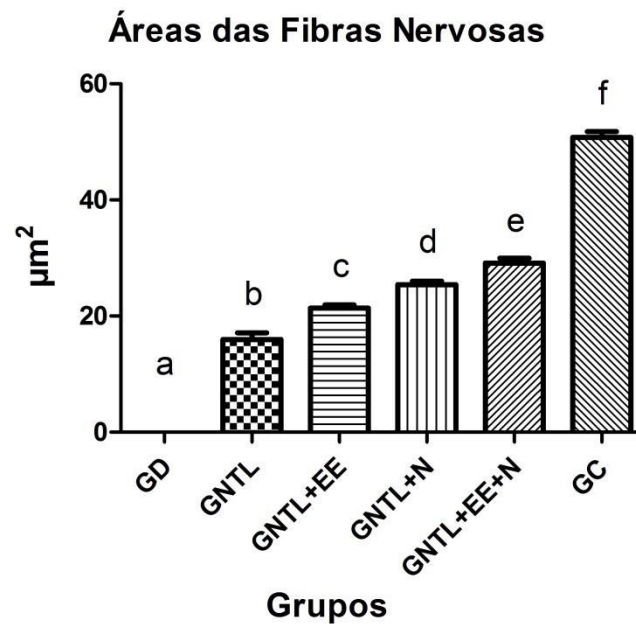


Figura 11 – Gráfico da média ( $\mu\text{m}^2$ ) da área das fibras nervosas. Letras diferentes indicam diferença estatística.

Tabela 2 – Média ( $\mu\text{m}$ ) e desvio padrão dos diâmetros mínimos das fibras nervosas. Letras diferentes indicam diferença estatística.

	<b>Diâmetros mínimos das Fibras Nervosas</b>	
	<b>Média</b>	<b>DP</b>
<b>GD</b>	$0^a$	0
<b>GNTL</b>	$4,05^b$	0,56
<b>GNTL+EE</b>	$4,88^{bc}$	0,93
<b>GNTL+N</b>	$5,11^c$	0,68
<b>GNTL+EE+N</b>	$5,96^d$	0,67
<b>GC</b>	$8,59^e$	0,55

Avaliando os diâmetros mínimos das fibras nervosas tem-se  $\text{GCF} > \text{GNTL+EE+N} > \text{GNTL+N} = \text{GNTL+EE}, \text{GNTL+EE} = \text{GNTL} > \text{GD}$ .



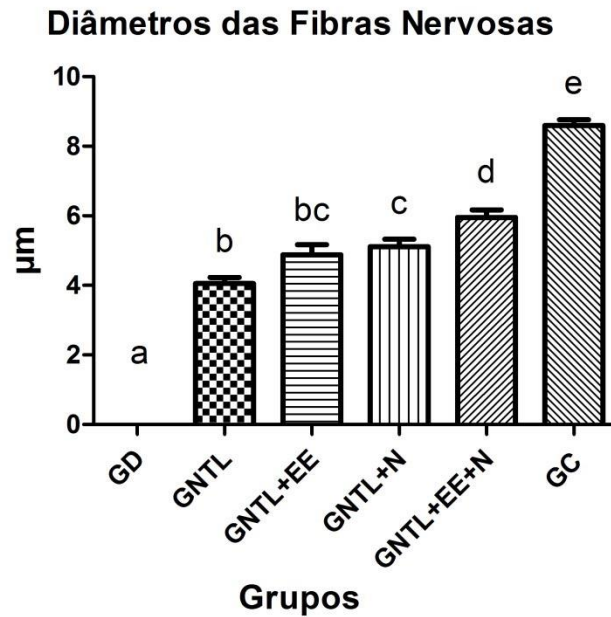


Figura 12 – Gráfico da Média ( $\mu\text{m}$ ) dos diâmetros mínimos das fibras nervosas. Letras diferentes indicam diferença estatística.

#### 4.2 ÁREAS E DIÂMETROS DOS AXÔNIOS

Os dados obtidos pela média das áreas dos axônios mostram que o grupo GC apresentou o melhor resultado ( $15,06 \mu\text{m}^2$ ), seguido pelo GNTL+EE+N ( $10,61 \mu\text{m}^2$ ). Na sequência da análise da área dos axônios, os grupos GNTL+N e GNTL+EE apresentaram resultados semelhantes, com  $7,37 \mu\text{m}^2$  e  $7,15 \mu\text{m}^2$ .

Na variável diâmetro mínimo, o GNTL+EE+N obteve o melhor resultado dos grupos experimentais, juntamente com grupo GNTL+N e o grupo GNTL+EE, com  $3,20 \mu\text{m}$ ,  $2,98 \mu\text{m}$  e  $2,83 \mu\text{m}$ , respectivamente. Os resultados podem ser observados nas tabelas 3 e 4 e nas figuras 13 e 14.

Tabela 3 – Média ( $\mu\text{m}^2$ ) e desvio padrão da área dos axônios Letras diferentes indicam diferença estatística.

Áreas dos Axônios		
	Média	DP
<b>GD</b>	0 <sup>a</sup>	0
<b>GNTL</b>	5,68 <sup>b</sup>	0,74
<b>GNTL+EE</b>	7,15 <sup>bc</sup>	1,28
<b>GNTL+N</b>	7,37 <sup>c</sup>	1,41
<b>GNTL+EE+N</b>	10,61 <sup>d</sup>	1,36
<b>GC</b>	15,06 <sup>e</sup>	1,24

Avaliando as áreas dos axônios,  $\text{GCF} > \text{GNTL+EE+N} > \text{GNTL+N} > \text{GNTL+EE} > \text{GNTL} > \text{GD}$ .

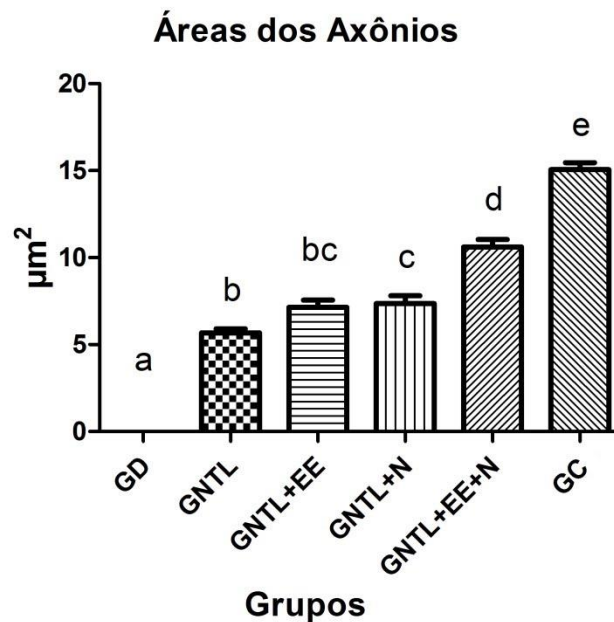


Figura 13 – Gráfico da média ( $\mu\text{m}^2$ ) das áreas dos axônios. Letras diferentes indicam diferença estatística.

Tabela 4 – Média ( $\mu\text{m}$ ) e desvio padrão dos diâmetros mínimos dos axônios. Letras diferentes indicam diferença estatística.

<b>Diâmetros dos Axônios</b>		
	<b>Média</b>	<b>DP</b>
<b>GD</b>	0 <sup>a</sup>	0
<b>GNTL</b>	2,57 <sup>b</sup>	0,39
<b>GNTL+EE</b>	2,83 <sup>bc</sup>	0,37
<b>GNTL+N</b>	2,98 <sup>bc</sup>	0,42
<b>GNTL+EE+N</b>	3,20 <sup>c</sup>	0,41
<b>GC</b>	4,77 <sup>d</sup>	0,59

Avaliando os diâmetros mínimos dos axônios,  $\text{GCF} > \text{GNTL+EE+N} = \text{GNTL+N} = \text{GNTL+EE}$ ,  $\text{GNTL+N} = \text{GNTL+EE} = \text{GNTL}$

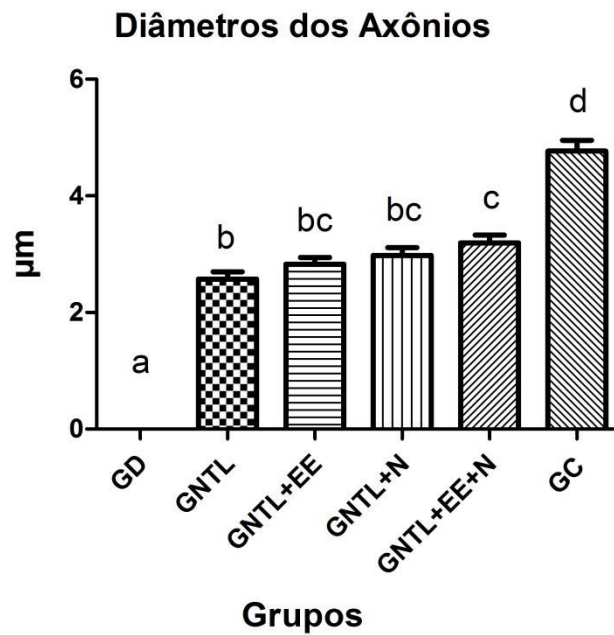


Figura 14 – Gráfico da média ( $\mu\text{m}$ ) dos diâmetros mínimos dos axônios. Letras diferentes indicam diferença estatística.

#### 4.3 ÁREAS DA BAINHA DE MIELINA E ESPESSURAS DA BAINHA DE MIELINA

Na avaliação das médias das áreas das bainhas de mielina, os grupos GNTL+EE+N e GNTL+N obtiveram os melhores resultados ( $18,51\mu\text{m}^2$  e  $18,04\mu\text{m}^2$ , respectivamente). Na sequência, observamos o grupo GNTL+EE com  $14,23\mu\text{m}^2$ .

Na avaliação da espessura da bainha de mielina, os grupos GNTL+EE+N, GNTL+N e GNTL+EE não apresentaram diferença significativa, atingindo  $2,76\mu\text{m}^2$ ,  $2,14\mu\text{m}^2$  e  $2,05\mu\text{m}^2$ , respectivamente. Nenhum grupo experimental obteve semelhança com relação ao grupo controle e todos foram superiores ao grupo GD. Os valores podem ser visualizados nas tabelas 5 e 6 e nas figuras 15 e 16.

Tabela 5 – Média ( $\mu\text{m}^2$ ) e desvio padrão das áreas das bainhas de mielina. Letras diferentes indicam diferença estatística.

Áreas da Bainha de Mielina		
	Média	DP
<b>GD</b>	0 <sup>a</sup>	0
<b>GNTL</b>	10,32 <sup>b</sup>	3,28
<b>GNTL+EE</b>	14,23 <sup>c</sup>	2,67
<b>GNTL+N</b>	18,04 <sup>d</sup>	3,00
<b>GNTL+EE+N</b>	18,51 <sup>d</sup>	2,55
<b>GC</b>	35,70 <sup>e</sup>	3,93

Avaliando a área da bainha de mielina tem-se  $\text{GCF} > \text{GNTL+EE+N} = \text{GNTL+N} > \text{GNTL+EE} > \text{GNTL} > \text{GD}$ .

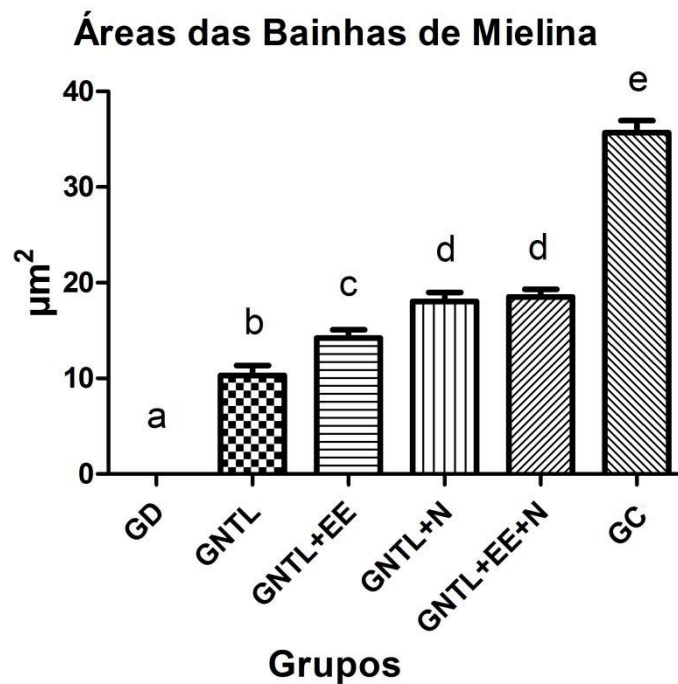


Figura 15 – Gráfico da média ( $\mu\text{m}^2$ ) das áreas das bainhas de mielina. Letras diferentes indicam diferença estatística.

Tabela 6 – Média ( $\mu\text{m}$ ) e desvio padrão das espessuras das bainhas de mielina. Letras diferentes indicam diferença estatística.

<b>Espessuras das Bainhas de Mielina</b>		
	<b>Média</b>	<b>DP</b>
<b>GD</b>	0 <sup>a</sup>	0
<b>GNTL</b>	1,48 <sup>b</sup>	0,63
<b>GNTL+EE</b>	2,05 <sup>bc</sup>	0,77
<b>GNTL+N</b>	2,14 <sup>bc</sup>	0,78
<b>GNTL+EE+N</b>	2,76 <sup>c</sup>	0,80
<b>GC</b>	3,82 <sup>d</sup>	0,80

Avaliando as espessuras das bainhas de mielina tem-se  $\text{GCF} > \text{GNTL+EE+N} = \text{GNTL+N} = \text{GNTL+EE}$ ,  $\text{GNTL+N} = \text{GNTL+EE} = \text{GNTL} > \text{GD}$ .

### Espessuras das Bainhas de Mielina

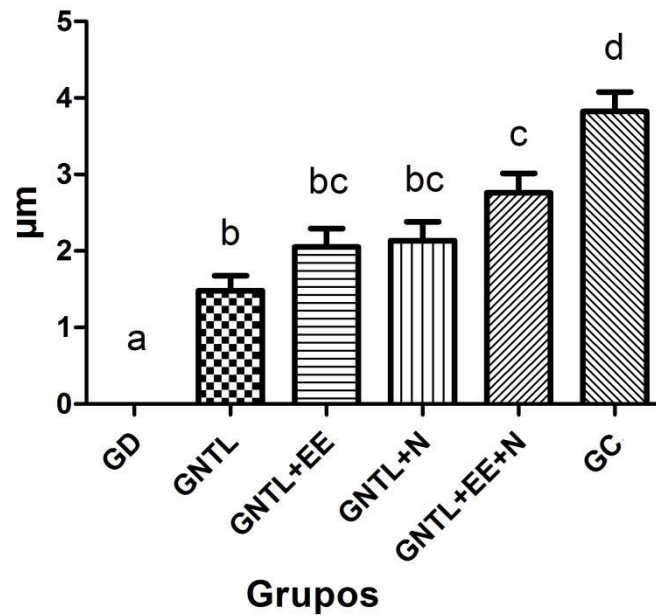


Figura 16 – Gráfico da média ( $\mu\text{m}$ ) das espessuras das bainhas de mielina. Letras diferentes indicam diferença estatística.

#### 4.4 RAZÃO G

Calculando a razão G, pela qual se obtém o índice de mielinização, não foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos experimentais e controles. Os dados estão demonstrados na tabela 7 e figura 17.

Tabela 7 – Média e desvio padrão da Razão G

	Razão G	
	MÉDIA	DP
GC	0,55	0,08
GD	0	0
GNTL	0,64	0,12
GNTL+EE	0,59	0,09
GNTL+N	0,59	0,11
GNTL+EE+N	0,54	0,1

Avaliando a Razão G temos  $GC = GNTL = GNTL+EE = GNTL+N = GNTL+EE+N > GD$

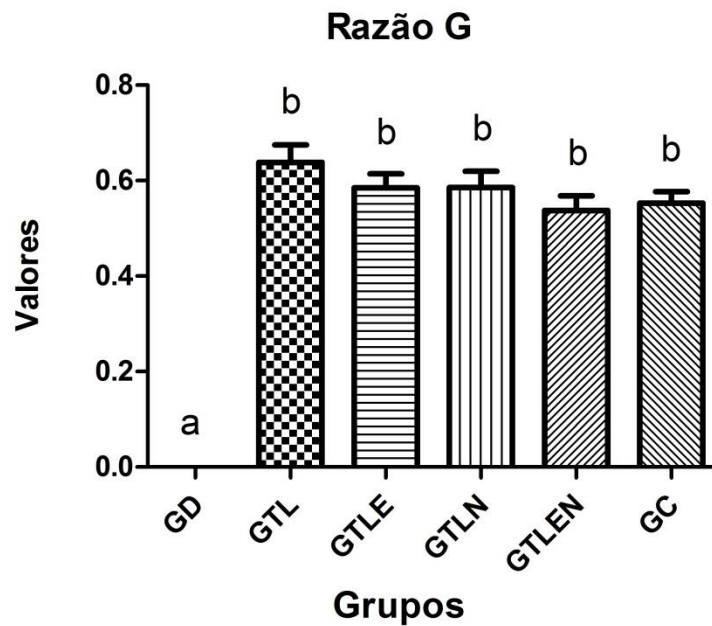


Figura 17 – Gráfico da média do cálculo da Razão G. Letras diferentes indicam diferença estatística.

#### 4.5 MORFOMETRIA DAS FIBRAS MUSCULARES

A média dos resultados das áreas ( $\mu\text{m}^2$ ) das fibras musculares demonstrou que o GNTL+N ( $2752,50 \mu\text{m}^2$ ) e o GNTL+EE+N ( $2977,63 \mu\text{m}^2$ ) obtiveram resultados superiores quando comparados ao GNTL+EE ( $1970,88 \mu\text{m}^2$ ). Esses valores foram significativamente superiores aos encontrados no GNTL ( $1524,88 \mu\text{m}^2$ ). Nenhum grupo apresentou resultados semelhantes ao GC ( $3569,88 \mu\text{m}^2$ ); entretanto, todos apresentaram resultados significativamente superiores ao GD ( $748,75 \mu\text{m}^2$ ).

Para o diâmetro mínimo o grupo GNTL+N ( $51,38 \mu\text{m}$ ) e o GNTL+EE+N ( $55,13 \mu\text{m}$ ) obtiveram resultados superiores quando comparados ao GNTL+EE ( $35,88 \mu\text{m}$ ). Esses resultados foram significativamente superiores aos encontrados no GNTL ( $25,75 \mu\text{m}$ ). Nenhum grupo apresentou resultados semelhantes ao GC ( $65,13 \mu\text{m}$ ).



Todos os grupos apresentaram resultados superiores ao GD (12,50  $\mu\text{m}$ ). Os resultados morfométricos podem ser observados nas tabelas 8 e 9 e figuras 18 e 19.

Tabela 8 – Média e desvio padrão das áreas ( $\mu\text{m}^2$ ) das fibras musculares. Letras diferentes indicam diferença estatística.

	<b>Áreas das fibras musculares</b>	
	<b>Média</b>	<b>DP</b>
<b>GC</b>	3569,88 <sup>e</sup>	239,86
<b>GD</b>	748,75 <sup>a</sup>	67,35
<b>GNTL</b>	1524,88 <sup>b</sup>	143,79
<b>GNTL+EE</b>	1970,88 <sup>c</sup>	247,04
<b>GNTL+N</b>	2752,50 <sup>d</sup>	86,38
<b>GNTL+EE+N</b>	2977,63 <sup>d</sup>	199,97

Avaliando as áreas das fibras musculares tem-se GC > GNTL+EE+N = GNTL+N > GNTL+EE > GNTL > GD.

### ÁREAS DAS FIBRAS DO M. TIBIAL CRANIAL

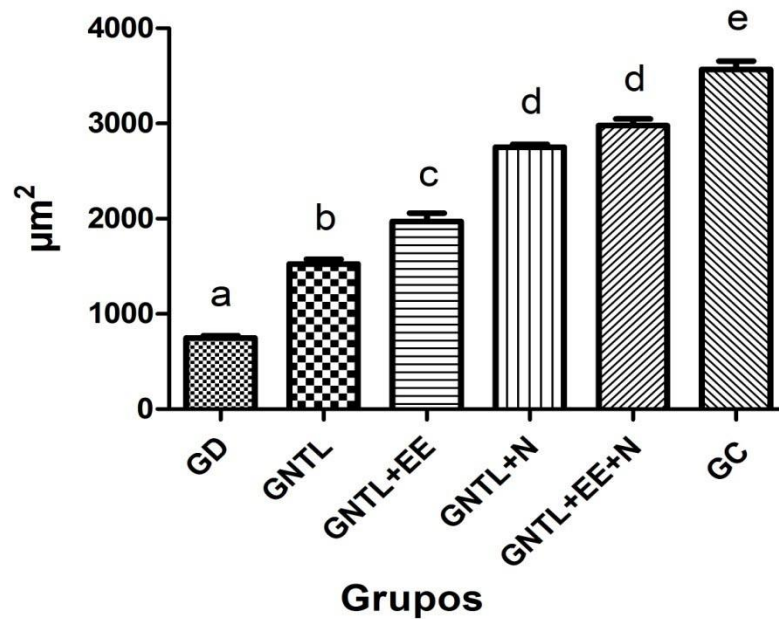


Figura 18 – Gráfico da média das áreas das fibras musculares ( $\mu\text{m}^2$ ). Letras diferentes indicam diferença estatística.

Tabela 9 – Média e desvio padrão dos diâmetros mínimos ( $\mu\text{m}$ ) das fibras musculares. Letras diferentes indicam diferença estatística.

	Diâmetros mínimos das fibras musculares	
	Média	DP
<b>GC</b>	65,13 <sup>e</sup>	4,05
<b>GD</b>	12,50 <sup>a</sup>	1,20
<b>GNTL</b>	25,75 <sup>b</sup>	2,71
<b>GNTL+EE</b>	35,88 <sup>c</sup>	2,75
<b>GNTL+N</b>	51,38 <sup>d</sup>	1,60
<b>GNTL+EE+N</b>	55,13 <sup>d</sup>	3,83

Avaliando os diâmetros mínimos das fibras musculares tem-se  $GC > GNTL+EE+N = GNTL+N > GNTL+EE > GNTL > GD$ .

### DIÂMETROS DAS FIBRAS DO MÚSCULO TIBIAL CRANIAL

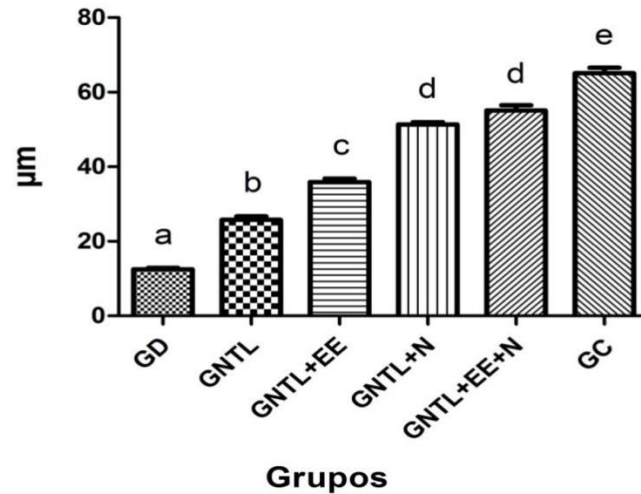


Figura 19 – Gráfico das médias dos diâmetros mínimos das fibras musculares ( $\mu\text{m}$ ). Letras diferentes indicam diferença estatística.

#### 4.6 ANÁLISE ELETROFISIOLÓGICA

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

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

Os resultados da análise eletrofisiológica podem ser observados nas tabelas 10 e 11 e figuras 20 e 21.

Tabela 10 - Média e desvio padrão da amplitude (mV) captada pela análise eletrofisiológica. Letras diferentes indicam diferença estatística.

	<b>Amplitude</b>	
	<b>Média</b>	<b>DP</b>
<b>GC</b>	20,53 <sup>d</sup>	1,84
<b>GD</b>	0 <sup>a</sup>	0
<b>GNTL</b>	6,68 <sup>b</sup>	0,63
<b>GNTL+EE</b>	16,12 <sup>c</sup>	0,99
<b>GNTL+N</b>	16,16 <sup>c</sup>	1,04
<b>GNTL+EE+N</b>	18,56 <sup>d</sup>	0,74

Avaliando amplitude tem-se  $GCF = GNTL+EE+N > GNTL+N = GNTL+EE > GNTL > GD$ .

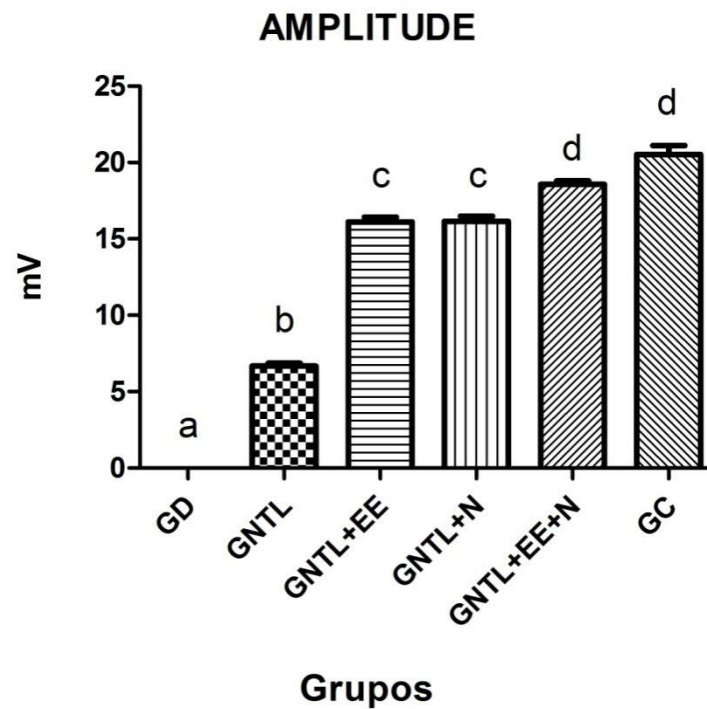


Figura 20 – Gráfico da média da amplitude (mV).  
Letras diferentes indicam diferença estatística.

Tabela 11 - Média e desvio padrão da latência (ms) captada pela análise eletrofisiológica. Letras diferentes indicam diferença estatística.

	<b>Latência</b>	
	<b>Média</b>	<b>DP</b>
<b>GC</b>	1,61 <sup>c</sup>	0,07
<b>GD</b>	10,00 <sup>a</sup>	0,0
<b>GNTL</b>	1,91 <sup>b</sup>	0,05
<b>GNTL+EE</b>	1,85 <sup>b</sup>	0,02
<b>GNTL+N</b>	1,85 <sup>b</sup>	0,02
<b>GNTL+EE+N</b>	1,80 <sup>b</sup>	0,02

Avaliando a latência tem-se GD > GNTL+EE+N = GNTL+N = GNTL+EE = GNTL > GC

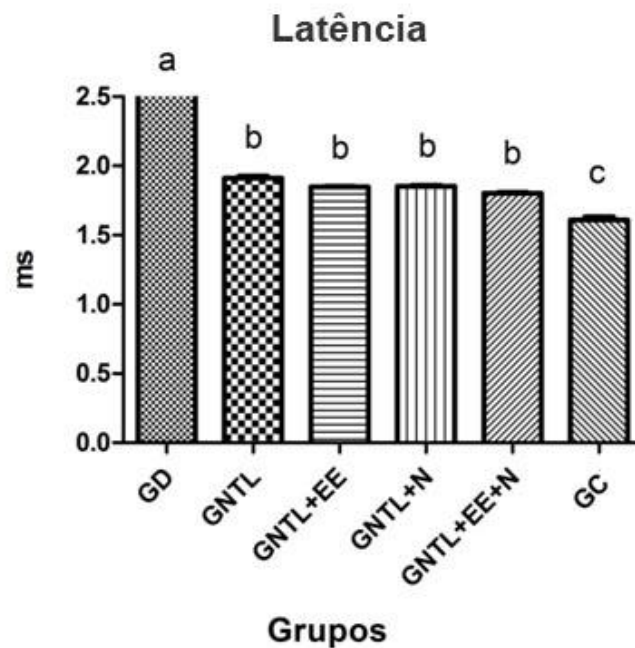


Figura 21 - Gráfico da média da latência (ms). Letras diferentes indicam diferença estatística.

#### 4.7 FORÇA MUSCULAR

A média dos resultados de força muscular demonstrou diferença significativa entre todos os grupos. O GNTL+EE+N (0,92) obteve resultados superiores quando comparado ao GNTL+N (0,80) e ao GNTL+EE (0,72), os quais também apresentaram diferença entre ambos. Esses valores foram significativamente superiores aos encontrados no grupo GNTL (0,65) e inferiores aos observados no GCF (1,00). Todos os resultados foram superiores ao obtido pelo GD (0,23). Os resultados de força muscular podem ser observados na tabela 12 e figura 22.

Tabela 12 - Média e desvio padrão da força muscular captada pelo transdutor. Letras diferentes indicam diferença estatística.

Força muscular		
	Média	DP
<b>GC</b>	1,00 <sup>f</sup>	0,03
<b>GD</b>	0,23 <sup>a</sup>	0,01
<b>GNTL</b>	0,65 <sup>b</sup>	0,02
<b>GNTL+EE</b>	0,72 <sup>c</sup>	0,03
<b>GNTL+N</b>	0,80 <sup>d</sup>	0,02
<b>GNTL+EE+N</b>	0,92 <sup>e</sup>	0,03

Avaliando a força muscular tem-se  $GC > GNTL+EE+N > GNTL+N > GNTL+EE > GNTL > GD$ .

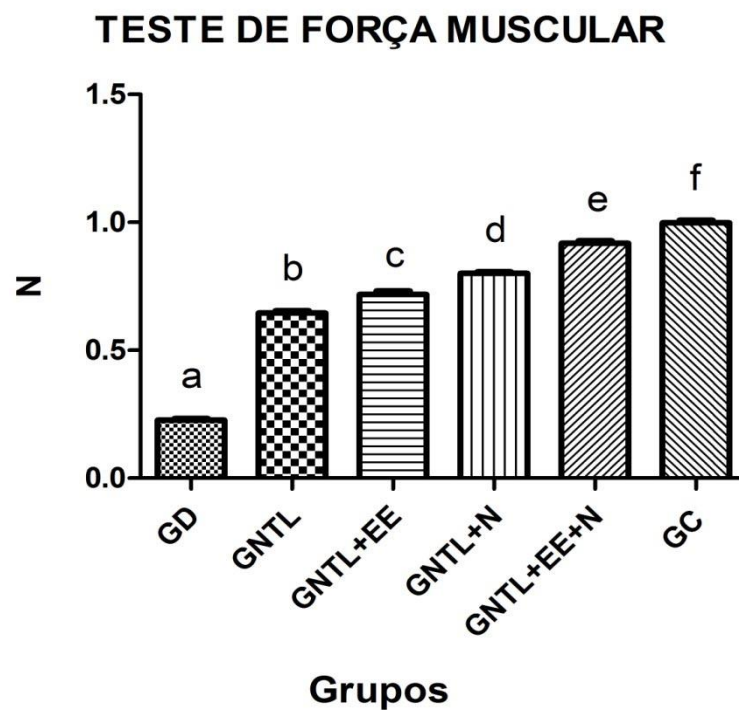


Figura 22 – Gráfico da média de força muscular. Letras diferentes indicam diferença estatística.

#### 4.8 ANÁLISE FUNCIONAL DA MARCHA

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

Tabela 13 - Média e desvio padrão da análise funcional da marcha.

<b>Análise Funcional</b>		
	<b>Média</b>	<b>DP</b>
<b>GC</b>	-7,02 <sup>e</sup>	1,59
<b>GD</b>	-57,12 <sup>a</sup>	4,18
<b>GNTL</b>	-35,42 <sup>b</sup>	4,07
<b>GNTL+EE</b>	-21,17 <sup>c</sup>	1,86
<b>GNTL+N</b>	-24,33 <sup>c</sup>	2,09
<b>GNTL+EE+N</b>	-14,01 <sup>d</sup>	3,14

Avaliando a análise funcional da marcha, GC > GNTL+EE+N > GNTL+N = GNTL+EE > GNTL > GD. Letras diferentes indicam diferença estatística.



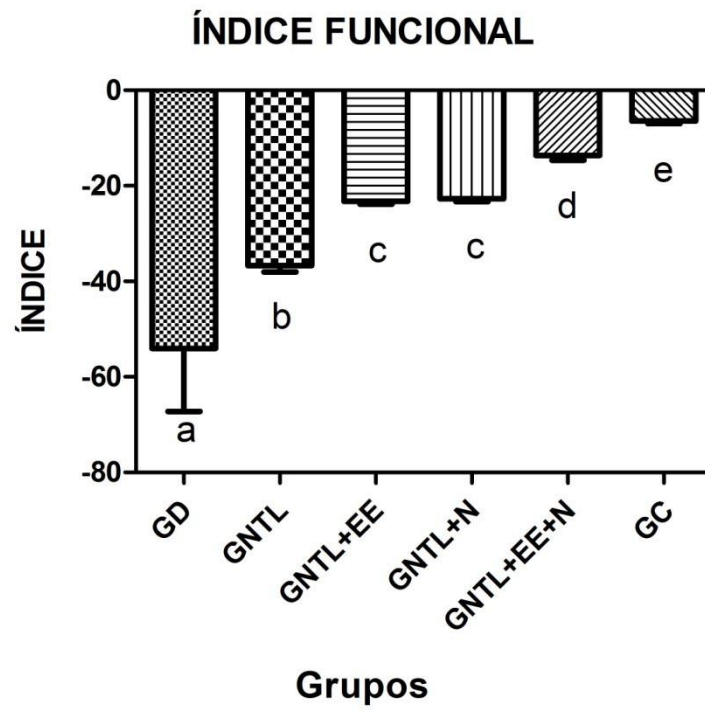


Figura 23 – Gráfico com as médias obtidas pela análise de marcha. Letras diferentes indicam diferença estatística.

*Discussão*

## 5 DISCUSSÃO

### 5.1 MÉTODOS

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

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

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

O modelo de neurorafia término-lateral realizada neste estudo foi descrita por Viterbo *et al.* (1992), sem abertura da janela epineural e utilizando o nervos fibular (receptor) e tibial (doador). Segundo esses autores este modelo apresenta duas vantagens, o músculo tibial cranial é inervado exclusivamente pelo nervo fibular, repercutindo nesse todas as alterações efetuadas sobre o nervo fibular. Além disso, a localização superficial do músculo tibial cranial possibilita o acompanhamento

clínico do trofismo desse músculo e conseqüentemente o processo da regeneração nervosa e da reinervação muscular.

Para o tratamento com a estimulação elétrica (EE) foram desenvolvidos vários estudos pilotos em nosso grupo de pesquisa e o presente trabalho foi baseado no protocolo de estimulação elétrica descrito por Maciel (2013).

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

A corrente de estimulação foi determinada com base em parâmetros criteriosamente pré-estabelecidos, a partir de estudos anteriores realizados em nosso laboratório. As frequências de 30 Hz e 100 Hz utilizadas neste experimento estavam de acordo com as características do músculo tibial cranial (MTC), no qual há distribuição homogênea das fibras musculares do tipo I e do tipo II.

Oliveira *et al* (2008), realizaram estudo associando o exercício de natação com a eletroestimulação, entretanto a associação foi realizada no mesmo dia. Os resultados do grupo associado, quando comparados com os protocolos isolados não apresentaram resultados positivos. Os autores apresentam a possibilidade da associação no mesmo dia ter propiciado uma sobrecarga na musculatura. No presente estudo, utilizamos a associação da eletroterapia com o exercício de natação em dias isolados, com finalidade de não causar a sobrecarga na musculatura.

Dow *et al* (2004), apresentam questionamentos relacionados ao tempo de utilização da eletroestimulação e o número de contrações realizadas pela musculatura. Os autores constataram que um número pequeno de contrações

diárias não são eficientes para retardar a atrofia muscular, entretanto, um número excessivo pode causar danos adicionais ao tecido. Em decorrência dos resultados apresentados pelos autores, optamos por utilizar no grupo associado, o protocolo de eletroestimulação duas vezes na semana evitando contração excessiva.

Em relação ao exercício físico, a técnica da natação foi escolhida por apresentar diversas vantagens como o baixo custo do equipamento e a não necessidade de seleção dos animais, já que todos apresentam habilidade inata de nadar (GOBATTO *et al.* 2001). Além disso, são poucas as pesquisas que observaram os efeitos do exercício de natação na regeneração nervosa periférica.

Com relação ao tratamento de natação empregado nesse estudo, utilizamos um programa básico para averiguar se o exercício contribuiria para a recuperação dos ratos lesionados. Com esse tratamento os ratos não tiveram intensidades altas de treinamento, apenas praticaram o exercício para estimular a recuperação física, em decorrência da padronização utilizada, no grupo associado o exercício de natação foi utilizados por três vezes na semana.

Sobral *et al* (2008), compararam o efeito do exercício tardio e imediato após lesão por esmagamento no nervo isquiático. Os resultados apresentados mostram semelhança dos protocolos utilizados, entretanto, os autores optaram pelo exercício em esteira, protocolo descartado no presente estudo, pois, para a prática de exercício na esteira, os ratos devem passar por seleção, uma vez que não apresentam habilidade para correr como apresentam para nadar.

A partir da obtenção de resultados significativos com relação ao exercício físico sugere-se a realização de futuras pesquisas com diversos tipos de protocolos publicados, envolvendo diferentes objetivos, como ganhos de força e resistência muscular.

Os resultados obtidos nesse trabalho permitirão melhor entendimento da aplicação da eletroestimulação e da natação na recuperação das lesões nervosas periféricas reinervadas por meio da neurografia termino-lateral.

## 5.2 ANÁLISE FUNCIONAL DA MARCHA

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

Os resultados verificados na presente avaliação demonstram que o GNTL+EE e o GNTL+N apresentaram valores superiores ao GNTL e GD, indicando eficiência da EE e do exercício de natação em promover melhora funcional. Corroborando com os nossos achados, Teodori *et al* (2011) constataram que o exercício de natação, quando realizado após a axonotmese e durante 30 dias, pode acelerar a regeneração nervosa e melhorar a recuperação funcional.

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

Em estudo semelhante ao nosso este, Maciel *et al* (2013) verificaram o efeito da aplicação da EE por 180 dias no MTC de ratos após a neurografia término-lateral

do nervo fibular comum. Em seus resultados, os autores constataram efeitos benéficos da aplicação da EE, que foi importante na regeneração nervosa e na manutenção da funcionalidade do músculo.

Oliveira *et al* (2008) verificaram o efeito da combinação da EE e do exercício de natação durante 22 dias em ratos após axonotmese. Os autores verificaram prejuízo na recuperação funcional e atribuíram a este atraso a hipótese de sobrecarga dos músculos na fase de reinervação. Estes resultados divergiram dos encontrados em nosso estudo, no qual o GNTL+EE+N apresentou melhor resultado funcional dentre os grupos experimentais. Contudo, devemos considerar a diferença de métodos utilizados em ambos os estudos, em relação ao tipo de lesão nervosa induzida e o período de tratamento.

### **5.3 ANÁLISE ELETROFISIOLÓGICA**

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

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

Em relação à latência, a análise eletrofisiológica não demonstrou diferença entre os grupos GNTL, GNTL+EE, GNTL+N e GNTL+EE+N. Embora todos tenham

apresentado inferioridade em comparação ao GCF, infere-se que o restabelecimento da inervação ocorreu em todos os grupos submetidos à neurorrafia.

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

#### **5.4 ANÁLISE DA FORÇA MUSCULAR**

O teste de força muscular consistiu na aplicação de estímulo elétrico diretamente no MTC para obtenção da força de contração máxima. A aplicação ocorreu no músculo, pois o GD não permite que a estimulação seja feita no nervo, já que foi realizada a secção do nervo e seus cotos foram invertidos.

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

Quanto ao papel do exercício físico, acredita-se que este tenha exercido influência na regeneração nervosa (não avaliada neste estudo), acelerando o



crescimento axonal por intermédio do aumento na expressão de fatores neurotróficos. Dessa maneira, com a reinervação precoce do MTC, as características estruturais e funcionais do tecido muscular podem ter sido mais bem preservadas.

## 5.5 ANÁLISE MORFOMÉTRICA

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

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

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

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

É importante ressaltar que este é o primeiro trabalho associando a eletroestimulação e a natação na neurorrafia término-lateral no sentido de obter melhor resultado quanto à reinervação muscular.

*Conclusão*

## 6 CONCLUSÃO

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

- Em relação aos atributos área da fibra nervosa, diâmetro da fibra nervosa, área do axônio, amplitude do teste eletrofisiológico, força muscular e análise funcional da marcha, o grupo GNTL+EE+N obteve o melhor resultado dentre os grupos experimentais.

- Em relação aos atributos área da bainha de mielina, área da fibra muscular e diâmetro da fibra muscular, os grupos que realizaram exercício físico (GNTL+EE+N e GNTL+N) obtiveram os melhores resultados dos grupos experimentais.

- Em relação aos atributos diâmetro dos axônios, espessura da bainha de mielina e latência, os grupos que realizaram algum tipo de tratamento pós-cirúrgico obtiveram os melhores resultados dos grupos experimentais.

## *Referências*

## REFERÊNCIAS

- AKGUL, T.; GULSOY, M.; GULCUR, H. O. Effects of early and delayed laser application on nerve regeneration. **Lasers Med. Sci.**, v. 29, p.351-357, 2014.
- ARAKAWA, T.; KATADA A.; SHIGYO H.; KISHIBE K.; ADACHI M. Electrical stimulation prevents apoptosis in denervated skeletal muscle. **Neuro Rehabilitation**, v. 27, n. 2, p. 147-154, 2010.
- BAIN, J. R.; MACKINNON, S. E.; HUNTER, D. A. Functional evaluation of complete sciatic, peroneal, and posterior tibial nerve lesions in the rat. **Plast Reconstr Surg.**, v. 82, p. 129-136, 1989.
- BERTELLI, J. A.; DOS-SANTOS, A. R.; CALIXTO, J. B. Is axonal sprouting able to traverse the conjunctival layers of the peripheral nerve? A behavioral, motor, and sensory study of end-to-side nerve anastomosis. **Journal of Reconstructive Microsurgery**, v. 12, n. 8, p. 559-563, 1996.
- BERTELLI, J. A.; GHIZONI, M. F. Nerve repair by end-to-side coaptation or fascicular transfer: a clinical study. **Journal of Reconstructive Microsurgery**, v. 19, n. 5, p. 313-318, 2003.
- CARANDENTE, F.; ANGELI A.; CANDIANI GB.; CROSIGNANI PG.; DE CECCO D.; MARRAMA P.; MASSORBIO M.; MARTINI L. Rhythms in the ovulatory cycle. 2nd: LH, FSH, estradiol and progesterone. **Chronobiologia**, v. 16, n. 4, p. 353-363, 1989.
- CARVALHO, D.C.I.; ROSIM, G. C.; GAMA, L. O. R.; TAVARES, M. R.; TRIBIOLI, R. A.; SANTOS, I. R.; CLIQUET JR., A. Tratamentos não farmacológicos na estimulação da osteogênese. **Rev Saúde Pública**, v. 36, n. 5, p. 647-654, 2002.
- CHARGE, S. B. P.; RUDNICKI, M. A. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. **Physiol Rev** , v. 84, p. 209-238, 2003.
- COBIANCHI, S.; MARINELLI S.; FLORENZANO F.; PAVONE F.; LUVISETTO S.; Short- but not long-lasting treadmill running reduces allodynia and improves functional recovery after peripheral nerve injury. **Neuroscience**, v.168, p. 273-287, 2010.
- DAVATZ, G. C. ANDREO, J. C.; RODRIGUES, A. C.; ROSA-JUNIOR, G. M.; MORAES, L. H. R. Apoptosis in denervated skeletal muscle. **Int. J. Morphol.**, v. 25, n. 3, p. 529-536, 2007.

DE MEDINACELLI, L.; FREED, W. J.; WYATT, R. J. An index of the functional condition of rat sciatic nerve based on measurements made from walking tracks. **Exp. Neurol.**, v. 77, n. 3, p. 634-43, 1982.

DE SÁ, J. M. R.; MAZZER N.; BARBIERI CH.; BARREIRA A.A. The end-to-side peripheral nerve repair functional and morphometric study using the peroneal nerve of rats. **J. Neurosci. Methods**, v. 136, p. 45-53, 2004.

DEUMENS, R.;BOZKURT, A.; MEEK, M.F.; MARCUS, M.A.; JOOSTEN, E.A.; WEIS, J.; BROOK, G.A. Repairing injured peripheral nerves: Bridging the gap. **Prog Neurobiol.**, v. 92, p. 245-276, 2010.

DOW, D.E.; CEDERNA, O.S.; HASSETT, C.A.; KOSTROMINOVA, T.Y.; FAULKNER, J.A.; DENNIS R.G. Number of contractions to maintain mass and force of a denervated rat muscle. **Muscle & Nerve**, v. 30, p. 77-86, 2004.

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

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

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

GIGO-BENATO, D.; RUSSO, T.L.; GEUNA, S.; DOMINGUES, N. R. S. R.; SALVINI, T. F.; PARIZOTTO, N.A. Electrical stimulations impairs early functional recovery and accentuates skeletal muscle atrophy after sciatic nerve crush injury in rats. **Muscle Nerve**, v. 41, n. 5, p. 685-693, 2010.

GOBATTO, C. A.; DE MELLO, M.A.; SIBUYA C.Y.; DE AZEVEDO J.R.; DOS SANTOS L.A.; KOKUBUN, E. Maximal lactate steady state in rats submitted to swimming exercise. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A**, v. 130, p. 21-27, 2001.

GOMEZ-PINILLA, F.; YING Z.; ROY R.R.; MOLTENI R.; EDGERTON V.R. Voluntary exercise induces a BDNF-mediated mechanism that promotes neuroplasticity. **J Neurophysiol.**, v. 88, p.2187-2195, 2002.

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

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

GUO, B.S.CHEUNG, K.K.; YEUNG S.S.; ZHANG B.T.; YEUNG E.W. Electrical stimulation influences satellite cell proliferation and apoptosis in unloading-induced muscle atrophy in mice. **PLoS One**, v.7, n.1, 2012.

ILHA, J.; ARAUJO, R.T.; MALYSZ, T.; HERMEL, E.E.; RIGON, P.; XAVIER, L.L.; ACHAVAL, M. Endurance and resistance exercise training programs elicit specific effects on sciatic nerve regeneration after experimental traumatic lesion in rats. **Neurorehabil Neural Repair**, v. 22, n. 4, p. 355-366, 2008.

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

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

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

KARALAKI, M.; FILI, S.; PHILIPPOU, A.; KOUTSILIERIS, M. Muscle regeneration: cellular and molecular events. **In vivo**, v. 23, p. 779-796, 2009.

KAVLAK, E.; BÜKER, N.; ALTUG, F.; KITIS, A. Effects of pulsed electromagnetic field and swimming exercise on rats with experimental sciatic nerve injury. **J. Phys. Ther. Sci.**, v. 26, n. 9, p. 1355-1361, 2014.

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

KOVACIC, U.; TOMSIC, M., SKETELJ, J.; BAJROVIĆ, F.F. Collateral sprouting of sensory axons after end-to-side nerve coaptation – A longitudinal study in the rat. **Experimental Neurology**, v. 203, p. 358-369, 2007.

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

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

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

LUNDBORG, G.; ZHAO, Q.; KANJE, M.; DANIELSEN, N.; KERNS, J.M. Can sensory and motor collateral sprouting be induced from intact peripheral nerve by end-to-side anastomosis? **J Hand Surgery**, v. 19B, p.277-282, 1994.

LUNDBORG, G.; DAHLIN, L.B.; DANIELSEN, N.; NACHEMSON, A.K. Tissue specificity in nerve regeneration. **Scandinavian Journal of Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 20, p. 279-283, 1986.

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

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

MARQUESTE, T.; ALLIEZ, J.R.; ALLUIN, O.; JAMMES, Y.; DECHERCHI, P. Neuromuscular rehabilitation by treadmill running or electrical stimulation after peripheral nerve injury and repair. **J. Appl Physiol.**, v. 96, p. 1988-1995, 2004.

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

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

MODLIN, M.; FORSTNER, C.; HOFER, C.; MAYR, W.; RICHTER, W.; CARRARO, U. PROTASI, F.; KERN, H. Electrical stimulation of denervated muscles: first results of a clinical study. **Artificial Organs**, v. 29, n. 3, p.203-206, 2005.



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

MOLTENI, R.; ZHENG, J.Q.; YING, Z.; GÓMEZ-PINILLA, F.; TWISS, J.L. Voluntary exercise increases axonal regeneration from sensory neurons. **Proc Natl Acad Sci.**, v. 101, p. 8473-8478, 2004.

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

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

OLIVEIRA, L. S.; SOBRAL, L.L.; TAKEDA, S.Y.; BETINI, J.; GUIRRO, R.R.; SOMAZZ, M.C.; TEODORI, R.M. Electrical stimulation and swimming in the acute phase of axonotmesis: their influence on nerve regeneration and functional recovery. **Rev Neurol.**, v.47, p. 11-15, 2008.

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

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

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

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

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

RODRIGUES, A. C.; ANDREO, J.C.; ROSA, G.M. JR; DOS SANTOS, N.B.; MORAES, L.H.; LAURIS, J.R. Fat cell invasion in long-term denervated skeletal muscle. **Microsurgery**, v. 27, p. 664-667, 2007.

ROMÃO, A. M.; VITERBO, F.; STIPP, E.; GARBINO, J.A.; RODRIGUES, J.A. Eletroestimulação do músculo tibial cranial após esmagamento do nervo fibular

comum: estudo neurofisiológico e morfométrico no rato. **Rev Bras Ortop**, v. 42, n. 3, p. 41-46, 2007.

ROVAK, JM; CEDERNA, PS; KUZON, WM. Terminolateral neurorrhaphy: a review of the literature. **J. Reconstr Microsurg**. 2001; 17(8):615-24.

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

SABATIER, M. J.; REDMON, N.; SCHWARTZ, G.; ENGLISH, A.W. Treadmill training promotes axon regeneration in injured peripheral nerves. **Exp Neurol.**, v. 211, p. 489-493, 2008.

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

SNYDER-MACKLER, L.; DELITTO, A.; STRALKA, S.W.; BAILEY, S.L. Use of electrical stimulation to enhance recovery of quadriceps femoris muscle force production in patients following anterior cruciate ligament reconstruction. **Phys Ther**, v. 74, p. 901-907, 1994.

SOBRAL, L.L.; OLIVEIRA, L.S.; TAKEDA, S.Y.M.; SOMAZZ, M.C.; MONTEBELO, M.I.L.; TEODORI, R.M. Immediate versus late exercise for rat sciatic nerve regeneration after axotomy: histomorphometric and functional analysis. **Rev Bras Fisioter**, v. 12, n. 4, p. 311-316, 2008.

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

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

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

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

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

TAGAMI, Y.; KURIMOTO, T.; MIYOSHI, T.; MORIMOTO, T.; SAWAI, H.; MIMURA, O. Axonal Regeneration Induced by Repetitive Electrical Stimulation of Crushed Optic Nerve in Adult Rats. **Jpn J Ophthalmol.**, v. 53, p. 257-266, 2009.

TEODORI, R. M.; BETINI, J.; SALGADO DE OLIVEIRA, L.; SOBRAL, L. L.; TAKEDA, S. Y. M.; MONTEBELO, M. I. L. Swimming exercise in the acute or late phase after sciatic nerve crush accelerates nerve regeneration. **Neural Plasticity**, p. 1-8, 2011.

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

TOS, P.; COLZANI, J.; CICLAMINI, D.; TITOLO, P.; PUGLIESE, P.; ARTIACO, S. Clinical applications of end-to-side neuroorrhaphy: an update. **Biomed. Res. Int.**, p. 1-5, 2014.

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

UDINA, E.; COBIANCHI, S.; ALLODI, I.; NAVARRO, X. Effects of activity-dependent strategies on regeneration and plasticity after peripheral nerve injuries. **Annals of Anatomy**, p. 1-7, 2011b.

VAN MEETEREN, N.; BRAKKEE, J.H.; HAMERS, F.P.; HELDERS, P.J.; GISPEN, W.H. Exercise training improves functional recovery and motor nerve conduction velocity after sciatic nerve crush lesion. **Arch Phys Med Rehabil.**, v. 78, p. 70-77, 1997.

VITERBO, F.; TRINDADE, J.C.; HOSHINO, K.; MAZZONI NETO, A. End-to-side neuroorrhaphy with removal of the epineurial sheath: an experimental study in rats. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 94, p. 1038-1047, 1994.

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

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

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

WILHELM, J. C.; XU, M.; CUCORANU, D.; CHMIELEWSKI, S.; HOLMES, T.; LAU, K.S.; BASSELL, G.J.; ENGLISH, A.W. Cooperative roles of BDNF expression in neurons and Schwann cells are modulated by exercise to facilitate nerve regeneration. **J. Neurosci.**, v. 32, n. 14, p. 5002-5009, 2012.

WILLAND, M. P.; HOLMES, M.; BAIN, J.R.; FAHNESTOCK, M.; DE BRUIN, H. Electrical muscle stimulation after immediate nerve repair reduces muscle atrophy without affecting reinnervation. **Muscle Nerve**, v. 48, n. 2, p. 219-225, 2013.

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

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

YARROW, J. F.; WHITE, L.J.; MCCOY, S.C.; BORST, S.E. Training augments resistance exercise induced elevation of circulating brain derived neurotrophic factor (BDNF). **Neuroscience Letters**, v.479, p. 161-165, 2010.

YU, Q.; LIN, Z.K.; DING, J.; WANG, T.; CHI, Y.L.; GAO, W.Y. Functional motor nerve regeneration without motor-sensory specificity following end-to-side neurorrhaphy: an experimental study. **J Hand Surg**, v. 36A, p. 2010-2016, 2011.

ZHANG, B.; YEUNG, S.S.; LIU, Y.; WANG, H.H.; WAN, Y.M.; LING, S.K.; ZHANG, H.Y.; LI, Y.H.; YEUNG, E.W. The effects of low frequency electrical stimulation on satellite cell activity in rat skeletal muscle during hindlimbsuspension. **Cell Biology**, v. 87, n. 11, p. 1-9, 2010.

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

ZOLADZ, J. A.; PILC, A.; MAJERCZAK, J.; GRANDYS, M.; ZAPART-BUKOWSKA, J.; DUDA, K. Endurance training increases plasma brain-derived neurotrophic factor concentration in young healthy men. **J. Physiol Pharmacol.**, v. 59, n. 7, p. 119-132, 2008.

*Anexo*

## ANEXO

unesp

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
CAMPUS DE BOTUCATU  
FACULDADE DE MEDICINA

FACULDADE DE MEDICINA  
FMB  
BOTUCATU

CEEA  
Comissão de Ética em Experimentação Animal  
Criada através da Portaria DFM nº 30 de 26/04/99

## Certificado

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

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

*Maria Rosa Bet Moraes Silva*  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Rosa Bet Moraes Silva  
Presidente da CEEA

*Alberto Santos Capellupi*  
Alberto Santos Capellupi  
Secretário da CEEA

Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu - S.P. CEP: 18.618-970 Fone/Fax: (0xx14) 3811-6143 e-mail secretaria: capellupi@fmb.unesp.br

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