

FÁBIO OLIVEIRA MACIEL

**“Efeito da estimulação elétrica do músculo
tibial cranial após neurorrafia término-
lateral do nervo fibular em ratos”**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**Botucatu
2011**

FÁBIO OLIVEIRA MACIEL

“Efeito da estimulação elétrica do músculo tibial cranial após neurraxia término-lateral do nervo fibular em ratos”

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

Orientador: Prof. Adj. Fausto Viterbo

**Botucatu
2011**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

Maciel, Fábio Oliveira.

Efeito da estimulação elétrica do músculo tibial cranial após neurorrafia término-lateral do nervo fibular em ratos / Fábio Oliveira Maciel. – Botucatu: [s.n.], 2011

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Fausto Viterbo

Capes: 40100006

1. Nervos – Enxerto. 2. Suturas. 3. Nervos periféricos. 4. Estímulos elétricos.

Palavras-chave: Estimulação elétrica; Nervo fibular; Nervo periférico; Neurorrafia término-lateral; Músculo tibial cranial; Ratos.



Dedicatória

À minha esposa **Suzane** e aos meus filhos

Alice e Artur.

Agradecimientos

Ao **Professor Dr. Fausto Viterbo**, por ter tido a paciência e a coragem de investir no meu aprendizado.

Aos funcionários da Cirurgia Experimental,

Danilo Chaguri; Danilo Borsatto; Maria Cecília Mercadante; Ednelson Henrique Bianchi; Luis Carlos Edevalter Bardella; Arlindo Sérgio Gabriel; Luzia Gouvea; e José Lucas de Carvalho.

Às alunas de Iniciação Científica;

Bárbara; Laís; Carla; e Luciana.

Aos funcionários da biblioteca.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação.

Ao **GAP** (Grupo de Apoio à Pesquisa).

À FAPEAM, por me conceder a bolsa de estudos.

À FAPESP, por ter financiado esta pesquisa.



Sumário

Resumo	10
Abstract	12
1. Introdução	14
2. Objetivo	24
3. Método	26
3.1. Animais.....	27
3.2. Grupos experimentais.....	28
3.3. Cirurgia	33
3.4. Estimulação Elétrica.....	33
3.5. Testes Realizados.....	36
3.6. Coleta das peças histológicas e sacrifício	41
3.7. Processamento histológico do músculo tibial cranial.....	43
3.8. Processamento histológico dos segmentos nervosos.....	44
3.9. Análise Estatística	47
4. Resultados	48
4.1. Massa Corporal.....	49
4.2. Índice da Massa do Músculo Tibial Cranial.....	50
4.3. Massa do MTC experimental x Massa do MTC normal.....	51
4.4. Teste de avaliação da marcha com Índice Funcional do Fibular.....	52
4.5. Perimetria.....	54
4.6. Teste Eletrofisiológico.....	55
4.7. Teste de Força Máxima.....	56
4.8. Análise Morfométrica.....	58
4.8.1. Análise morfométrica do músculo tibial cranial.....	58
4.8.2. Análise morfométrica dos segmentos nervosos.....	64
4.9. Morfologia dos músculos e nervos.....	69
5. Discussão	75
5.1. Massa corporal e massa do músculo tibial cranial.....	79
5.2. Teste de Avaliação da Marcha	79
5.3. Perimetria.....	81
5.4. Teste Eletrofisiológico.....	81
5.5. Teste de força máxima do músculo tibial cranial.....	82
5.6. Análise do músculo tibial cranial.....	83
5.7. Análise dos nervos.....	83
6. Conclusão	85
7. Referências Bibliográficas	87
Anexos	107

Resumo

No tratamento de lesões de nervos periféricos por neurorrafia, ainda não se obtém total recuperação motora ou sensitiva. Por esse motivo, muitas pesquisas buscam propor técnicas para melhorar a funcionalidade de um músculo reinervado. Neste contexto, a neurorrafia látero-terminal (NLT) 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. Este achado despertou grande interesse na comunidade científica, demonstrando resultados bem-sucedidos em tratamentos como paralisia facial, avulsão de plexo braquial, e outras situações de lesões de nervo periférico. Porém, após uma neurorrafia, o tempo necessário para a regeneração axonal determinará atrofia das fibras musculares. A estimulação elétrica preveniria este fator negativo. Esta pesquisa teve como objetivo estudar a eficiência da estimulação elétrica na recuperação do músculo tibial cranial (MTC) e nervo fibular após secção e neurorrafia látero-terminal do coto distal do nervo fibular à face lateral do nervo tibial. Foram utilizados 60 ratos da raça Wistar, machos, com massa média de, 261,87 g (+/- 28,39)g, fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Estadual Paulista (UNESP) – Campus de Botucatu. Os animais foram divididos, aleatoriamente, em quatro grupos experimentais. Grupo Controle, controle de normalidade; Grupo Desnervado, controle de desnervação; Grupo NLT, neurorrafia látero-terminal do coto distal do nervo fibular à face lateral do nervo tibial; e Grupo NLT+EE, neurorrafia látero-terminal do coto distal do nervo fibular à face lateral do nervo tibial e tratamento com eletroestimulação. Os resultados da análise da marcha e da análise morfométrica demonstraram superioridade do grupo NLT+EE sobre o grupo NLT. Com base em nosso modelo experimental, pudemos concluir que a estimulação elétrica foi eficiente na recuperação funcional do músculo e do nervo pós-neurorrafia látero-terminal.

Palavras-Chave: neurorrafia látero-terminal, eletroestimulação, nervo fibular, músculo tibial cranial



Abstract

Treatment of peripheral nerve injuries by neurorrhaphy, still not achieved full motor or sensorial recovery. For this reason many studies seek to propose techniques to improve the functionality of a reinnervated muscle. In this context the end-to-side neurorrhaphy (ESN) without donor nerve injury brought great contribution for peripheral nerve injuries. Using ESN any nerve can be used as a donor nerve without harming themselves or the structures innervated by them. This finding aroused great interest in the scientific community, demonstrating successful results in treatments such as facial palsy, brachial plexus avulsion, and other situations of peripheral nerve injuries. But after a neurorrhaphy the time needed for nerve regeneration can determine muscle fibers atrophy and electrical stimulation could prevent this negative factor. This research aims to study the efficiency of electrical stimulation in cranial tibial muscle and peroneal nerve recovery after section and end-to-side neurorrhaphy of the distal stump of the peroneal nerve to the lateral surface of the tibial nerve. Sixty Wistar rats, male, weighing an average of 261.87 g (+ / - 28.39) g, provided by Central Vivarium of the Universidade Estadual Paulista – UNESP (Paulista State University) – Botucatu Campus, were used. The animals were divided randomly into four experimental groups: Control Group, normal group; Denervated Group; ; ESN Group, end-to-side neurorrhaphy of the distal stump of the peroneal nerve to the lateral surface of the tibial nerve; ESN+ES Group, end-to-side neurorrhaphy of the distal stump of the peroneal nerve to the lateral surface of the tibial nerve and treatment with electrical stimulation. The results of walking trak analisys (WTA) and morphometric analysis demonstrated superiority of ESN+ES group over ESN group. Based on the used experimental model was conclude that electrical stimulation was effective in functional recovery of muscle and nerve after end-to-side neurorrhaphy.

Keywords: end-side neurorrhaphy, electrical stimulation, peroneal nerve, cranial tibial muscle

1. Introdução

Os nervos periféricos, assim como os demais tecidos do organismo, estão sujeitos 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).

As lesões em nervos periféricos usualmente provocam alterações na estrutura, metabolismo e atividade fisiológica do corpo celular neuronal, podendo interromper a inervação dos órgãos distais à lesão e, tratando-se de neurônio motor, o órgão comprometido é o músculo (Chem, 1978; Da-Silva, 1995).

Os nervos periféricos compõem-se de tecido nervoso e de tecidos conectivos, os quais são auxiliares na manutenção da continuidade, nutrição e proteção aos neurônios. As fibras nervosas apresentam-se envolvidas por tecido conjuntivo, organizados em três níveis: epineuro, perineuro e endoneuro (Junqueira & Carneiro, 1999; Millesi *et al.*, 2007).

Numa visão transversal, o nervo é revestido por uma camada externa de tecido conjuntivo com boa vascularização, o epineuro. No epineuro, encontram-se fibroblastos organizados em camadas concêntricas e separados por fibras colágenas dispostas longitudinalmente (Junqueira & Carneiro, 1999).

Mais internamente, as fibras nervosas são organizadas em fascículos e, ao redor dos fascículos, encontra-se uma camada de tecido conjuntivo formada por fibroblastos e fibras colágenas dos tipos I e III. Esta camada é denominada de perineuro. O perineuro constitui uma barreira químico-mecânica às substâncias difusíveis e às lesões externas, mantendo o microambiente intrafascicular e conferindo resistência aos nervos (Junqueira & Carneiro, 1999).

No interior dos fascículos, encontram-se os feixes de fibras nervosas, as quais são formadas por um axônio envolvido por uma fina camada de tecido conjuntivo chamado endoneuro (Millesi *et al.*, 1995; Junqueira & Carneiro, 1999).

Ao redor do axônio, encontra-se uma camada de células de Schwann, as quais podem apresentar-se como mielínicas, que são formadoras de bainha de mielina, ou amielínicas, que não formam esta bainha (Burt, 1995).

Os nervos periféricos podem apresentar três padrões básicos de arquitetura intraneural de acordo com o número de fascículos: os monofasciculares, os oligofasciculares e os polifasciculares (Junqueira & Carneiro, 1999).

Os axônios que compõem um nervo podem ser motores, sensitivos ou autonômicos, porém, em geral, os nervos apresentam mais de um tipo de axônio, sendo denominados de nervos mistos (Burt, 1995).

Após uma lesão do nervo periférico, ocorrem alterações morfológicas, fisiológicas, moleculares e metabólicas no segmento distal à lesão, em alguns nodos terminais do coto proximal e no corpo celular do neurônio. Esta série de alterações, relatadas inicialmente por Waller, em 1851, foram denominadas de degeneração “Walleriana” e propiciam o meio adequado à regeneração dos axônios (Fu & Gordon, 1997).

De acordo com o envolvimento anatômico do nervo e os achados clínicos após as injúrias, as lesões no nervo periférico foram, inicialmente, classificadas por Seddon (1943) em três níveis: neuropraxia (lesão tipo I), caracterizada por bloqueio localizado da condução elétrica, sem interrupção da continuidade axonal ou degeneração; axoniotmese (lesão tipo II), em que ocorre ruptura na continuidade do axônio, porém os tubos endoneurais permanecem intactos; e neurotmese (lesão tipo III), na qual ocorre ruptura de uma ou mais camadas de tecido conectivo do nervo periférico.

Sunderland (1968) subdividiu esta classificação em cinco níveis de lesões.

Na lesão Tipo I (correspondente à neuropraxia de Seddon), ocorre um bloqueio da condução do impulso nervoso devido a uma alteração exclusivamente na bainha de mielina do nervo. A continuidade dos axônios, excitabilidade da fibra nervosa e a integridade dos órgãos distais à lesão são preservadas.

Na lesão Tipo II (correspondente à axoniotmese de Seddon), ocorre perda da condução do impulso nervoso no sítio da injúria e no segmento distal do nervo devido à lesão do axônio do nervo, sendo preservado apenas o tubo endoneural.

As lesões do Tipo III, IV e V de Sunderland correspondem à neurotmese de Seddon. Sunderland subdividiu a neurotmese de acordo com o envolvimento anatômico do nervo, ou seja, lesão ao nível do endoneuro, perineuro e/ou epineuro.

Na lesão Tipo III, o endoneuro é comprometido estando preservados o perineuro e a bainha de mielina. Deste modo, a lesão fica limitada ao fascículo.

Na lesão do Tipo IV, ocorre a interrupção dos fascículos, devido ao comprometimento do endoneuro e do perineuro. Apenas o epineuro permanece preservado.

Nas lesões do Tipo V, ocorre a transecção total do tronco nervoso, envolvendo tubos endoneurais, perineuro e epineuro. Neste caso, é necessário reparo cirúrgico, e, mesmo assim, obtém-se apenas recuperação limitada da área desnervada.

Lesões de nervos periféricos podem ser extremamente incapacitantes. Nesse contexto, a microcirurgia vem apresentando papel fundamental no prognóstico dos pacientes vítimas desse mal. Dessa forma, estudos para o aprimoramento das técnicas microcirúrgicas de reparação nervosa são de vital importância e têm surtido grande interesse no meio científico a fim de reduzir o número de pessoas inválidas (Sato, 2005).

O primeiro relato de regeneração nervosa foi feito por Galeno (131-201 d.C.) que estudou lesões de nervos periféricos mesmo estando limitado pela tecnologia da época, a observar apenas o que era visível a olho nu, no entanto, a primeira referência cirúrgica de reparo de lesões nervosas data de alguns séculos mais tarde, com Rhazes (850-932) e Avicenna (980-1037) (Majno, 1975; Brushart & Seiler, 1987; Sunderland, 1991; Zhao *et al.*, 1992). Porém, foi atribuído a William de Saliceto (1210-1277) o primeiro registro de uma neurorrafia (Terzis *et al.*, 1997).

Em 1873, Hueter (apud Murray *et al.*, 1994) descreveu a neurorrafia epineural como meio de restaurar a função moto-sensitiva após lesões nervosas. A neurorrafia perineural foi descrita por Langley & Hashimoto em 1917. Sunderland (1945) propagou o reparo de nervos periféricos. Kurze (1964) e Smith (1964) propuseram, simultaneamente, o uso do microscópio cirúrgico para melhorar a visualização e auxiliar nas técnicas cirúrgicas e, com isso, possibilitaram a obtenção de melhores resultados funcionais (Terzis *et al.*, 1997).

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).

Neste procedimento, realiza-se a aproximação dos condutos do epineuro, possibilitando a regeneração das fibras nervosas através da lesão. Essa técnica é conhecida como sutura epineural (Bunnell, 1927; Dogliotti, 1935; Colemam, 1944; Bora, 1967; Bora Jr. *et al.*, 1976; Bora Jr., 1978; Rouleau *et al.*, 1981; Millesi, 1985). Para se obter melhor orientação fascicular, pode-se utilizar a sutura perineural, também chamada de interfascicular ou funicular (Bora, 1967; Hakstian, 1968; Grabb

et al., 1970; Millesi *et al.*, 1972; Hakstian, 1973; Kleinert & Griffin, 1973; Ito *et al.*, 1976; Orgel & Terzis, 1977; Van Dulken & Thomeer, 1978; Millesi, 1982; McQuarrie, 1985). Atualmente, é utilizada, com maior frequência, a sutura epineural, por ser mais rápida e igualmente eficiente (Bratton *et al.*, 1981; Braun, 1982).

Porém, uma das limitações da NTT é a necessidade de não haver perda de tecido nervoso (Seddon, 1963; Lundborg, 1987). Quando existe perda de tecido nervoso impedindo a junção da extremidade proximal e distal para realizar-se a sutura, pode-se usar enxerto de nervo autólogo (Millesi, 1972, 1986; Narakas, 1989; Wong & Scott, 1991; Millesi, 2007). Também existem os implantes com tubos de materiais aloplásticos ou enxertos de tubos de tecido autólogo (Colin & Donoff, 1984; Evans *et al.*, 1991; Hentz, 1991; Rodrigues & Silva, 2001; Colomé *et al.*, 2008).

Quando há perda da extremidade distal do nervo pode-se utilizar a neurotização muscular direta (NMD), método descrito por Heineke, em 1914 (apud Papalia *et al.*, 2001), e por Elsberg (1917).

Porém, existem situações em que ocorre a perda do coto proximal. Nestes casos, sacrifica-se um nervo vizinho, menos importante, e o mesmo é seccionado, sendo seu coto proximal suturado ao coto distal do nervo a ser reconstruído. Pode-se usar enxerto de nervo entre estes dois cotos se for necessário. No entanto, esse procedimento determina déficit motor ao nervo doador e às estruturas por ele inervadas (Harris & Tindal, 1991; Lohman *et al.*, 1997). Além disso, a qualidade da recuperação funcional é menor quando a distância entre os cotos dos nervos forem maiores que seis centímetros (Ögün *et al.*, 2003).

Em 1903, Ballance *et al.* propuseram uma nova técnica como opção para evitar o sacrifício do nervo doador. Tratava-se da neurorrafia látero-terminal (NLT), na qual o coto distal do nervo a ser reconstruído era suturado à face lateral do nervo doador. Porém, os movimentos dos músculos reinervados eram acompanhados de movimentos dos músculos inervados pelo nervo doador. Outros autores desta época (Manasse, 1922; Stookey, 1923; Ballance, 1923; Gatta, 1938) também empregaram esta técnica, mas todos faziam incisão parcial no nervo doador. Esta lesão no nervo doador determinava união tipo término-terminal dos tubos endoneurais e prejuízo no nervo doador e às estruturas por ele inervadas. Isto levou Babcock (1927) a sugerir o abandono desta técnica.

Em 1992, Viterbo e Viterbo *et al.* propuseram a neurorrafia látero-terminal sem lesão no nervo doador e, até mesmo, sem a remoção do epineuro (Viterbo *et*

al., 1994a e b). Em 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. Essa técnica trouxe grande contribuição, pois, a partir daí, qualquer nervo pode ser utilizado como nervo doador sem prejuízos para este ou para as estruturas por ele inervadas. Diversos trabalhos comprovaram os achados de Viterbo, tanto experimental como clinicamente (Viterbo *et al.*, 1994; Al-Qattan & Al-Thunyan, 1998; Jaber *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 1999; Rovak *et al.*, 2001; Lundborg *et al.*, 1994; Ögün *et al.*, 2003; Pardini *et al.*, 2005; Haninec *et al.*, 2007; Müller, 2001).

Com relação à denominação de neurorrafia término-lateral (NTL) ou látero-terminal, há controvérsias na literatura. Ballance *et al.* (1903) descreveram o procedimento realizado como sendo anastomose término-lateral. Viterbo *et al.* (1992, 1994a, 1994b) utilizam os dois termos, neurorrafia látero-terminal ou término-lateral, conforme o nervo doador. Se o doador é suturado na lateral do receptor empregam o termo término-lateral. Quando o receptor é suturado na lateral do doador, denominam o procedimento de NLT. Embora existam diferenças básicas, o termo término-lateral é usado num sentido geral, podendo significar ambas as situações. Dellon *et al.* (2010) chama a atenção para a correta nomenclatura.

Pelo seu ineditismo, a técnica de enxerto nervoso por neurorrafia látero-terminal despertou grande interesse na comunidade científica. Por apresentar potencial considerável (Viterbo *et al.*, 1994a), diversos estudos experimentais de NLT vêm sendo realizados e muitos mostrando resultados bem sucedidos com esse tipo de neurorrafia (Hayashi *et al.*, 2004; Viterbo, 1993; Yamamoto *et al.*, 2003; Kumar & Hassan, 2002; Galli *et al.*, 2002; Koh *et al.*, 2002; Yoleri *et al.*, 2000).

A neurorrafia término-lateral de nervo periférico tem sido sugerida em situações clínicas em que o segmento proximal do nervoso lesionado não esteja disponível (Lundborg *et al.*, 1994, 2000).

No entanto, com todo o avanço técnico obtido com a microcirurgia, ainda não se obtém total recuperação motora, por melhor que tenha sido realizada a reparação do nervo (Sundeland, 1985), pois a recuperação completa da função motora depende da regeneração dos axônios e, durante o tempo de regeneração dos axônios, ocorre o processo de hipotrofia ou mesmo atrofia da musculatura inervada por este

nervo, fato que promove prejuízo funcional para o músculo (Romão *et al.*, 2007; Starkey, 2001; Low & Reed 2001; Robinson & Snyder-Mackler, 2001).

A estimulação elétrica com finalidade regenerativa, embora controversa, (Williams, 1996; Nemeth, 1982; Kanaya & Tajima, 1992; Iñigo, 1998; Souza *et al.*, 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 (Guyton, 1986; Low & Reed 2001; Robinson & Snyder-Mackler, 2001).

No final do século XVIII, Galvani foi quem primeiro publicou experiências com preparados neuromusculares e eletricidade em animais. Por mais de dois séculos, os biólogos trabalharam com a revelação de que o músculo esquelético se contrai ao ser estimulado com eletricidade e que, ao contrair-se por qualquer motivo, gera uma corrente ou tensão perceptível. As descobertas de Galvani marcaram o início da neurofisiologia e do estudo da dinâmica da contração muscular (Basmajian, 1976).

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, à frequência, à duração e aos métodos de avaliação utilizados. Vários autores, como Tagami *et al.* (2009), que observaram regeneração axonal durante a aplicação de eletroestimulação diária em ratos referem ser benéfica e sem prejuízos funcionais (Nemeth, 1982; Kanaya & Tajima, 1992; Williams, 1996; Iñigo, 1998), ao contrário de outros, que afirmam ser nociva, provocando contraturas e espasmos (Souza *et al.*, 2001; Kotwal & Schmidt, 2001; Carvalho *et al.*, 2002).

Alguns pesquisadores afirmam que a EE provoca fadiga muscular mais rapidamente que a contração voluntária (Ruffin & Kinningham, 1993; Kisner & Colby, 2005; Ward & Shkuratova, 2002). Porém, o real mecanismo que provoca este efeito ainda está sendo estudado.

Acredita-se que este mecanismo envolve o tipo de fibra muscular estimulada. Segundo Tessitore *et al.* (2008) as fibras musculares fásicas apresentam pequena concentração de mioglobina, têm grande potência e velocidade de contração porém entram em fadiga rapidamente. Já as fibras tônicas têm grande quantidade de mioglobina e são resistentes à fadiga.

Binder-Macleod & Snyder-Mackler (1993) e Sinacor *et al.* (1994) sugerem que a fadiga muscular precoce provocada por EE ocorre devido a uma reversão no princípio do tamanho das fibras de Henneman. Conforme Henneman *et al.* (1965), a ativação das unidades motoras nas contrações voluntárias ocorre das menores para as maiores unidades. Isto serve como uma proteção contra a fadiga, uma vez que as menores unidades motoras são formadas por fibras musculares tônicas e, por isso, menos susceptíveis à fadiga (Neto, 2007).

Gregory (2005) e Bickel *et al.* (2003) discordam e sustentam que a eletroestimulação realiza um recrutamento não seletivo das fibras musculares e, por este motivo, as fibras fásicas entram em funcionamento antes do necessário provocando fadiga precoce.

As duas explicações só reforçam que o uso da EE deve ser muito bem controlado, devendo-se buscar o protocolo ideal para cada situação, pois existe grande variedade de parâmetros para serem ajustados, do contrário, corremos o risco de não alcançarmos os resultados esperados (Maciel, 2010).

Atualmente, a estimulação elétrica para aumentar o desempenho do músculo esquelético já é aceita e, constantemente, demonstrada em estudos experimentais e clínicos (Ruffin & Kinningham, 1993; Snyder-Mackler *et al.*, 1994; Soo *et al.*, 1988).

Diversos estudos disponíveis investigam o papel da estimulação elétrica como forma de induzir fortalecimento muscular em humanos (McIntyre & Robertson, 1992; Fonseca *et al.*, 2001; Wilk & Reinold, 2001; Stiene *et al.*, 1996; Cabral & Monteiro-Pedro, 2003). A força muscular é uma propriedade que pode ser alterada por fatores externos, como a atividade física voluntária, e, segundo alguns autores, pela estimulação elétrica (Ruffin & Kinningham, 1993; Baker & Juhn, 2000; Cowan *et al.*, 2001; Thomeé *et al.*, 1995; Fox, 1975; MacGregor *et al.*, 2004; Doucette & Child, 1996; Sperandei, 2005).

Rutherford & Jones (1986) sugerem que parte do efeito do treinamento realizado por estimulação elétrica pode estar na facilitação neural em função de um número maior de unidades motoras ativas e aumento na taxa de impulsos ou em um padrão mais eficiente de recrutamento. Muitos trabalhos sugerem que a estimulação elétrica sozinha ou combinada com exercícios voluntários pode ser mais eficiente no aumento de força muscular do que apenas os exercícios voluntários (Ruffin & Kinningham, 1993; McIntyre & Robertson, 1992; Fox, 1975).

O estudo da regeneração nervosa e da recuperação de um músculo após neurorrafia pode ser realizado pela observação das alterações histológicas, pela medida da velocidade de condução elétrica, pela análise eletromiográfica ou pela resposta isométrica do músculo submetido à contração tetânica, ou em situações especiais, como no caso do nervo isquiático em ratos, em que o animal é submetido à análise da marcha (De Medinacelli *et al.*, 1982; Bain *et al.*, 1989; Sato, 2005).

Através da observação destes atributos, diversos autores confirmaram a ocorrência tanto de brotamento colateral motor quanto sensorial, após a neurorrafia látero-terminal, com subsequente recuperação fisiológica do músculo previamente desnervado e recuperação funcional significativa (McCallister *et al.*, 1999; Lutz *et al.*, 2000a; Goheen-Robillard *et al.*, 2002; Hayashi *et al.*, 2004; Beris *et al.*, 2007; Brenner *et al.*, 2007; Matsuda *et al.*, 2008; Beris & Lykissas, 2009).

Goheen-Robillard *et al.* (2002) mostraram que a regeneração sensorial ocorre, predominantemente, em uma neurorrafia término-lateral quatro a seis meses após a cirurgia enquanto Yamamoto *et al.* (2007) observaram regeneração motora com 21 meses de pós-operatório.

A EE é capaz de aumentar a atividade de enzimas oxidativas em fibras musculares, realçar a regeneração muscular e prevenir a atrofia muscular esquelética (Pette & Staron, 1997). Além dos efeitos metabólicos, a EE está relacionada à redução dos danos da imobilização, minimizando a redução da área de secção transversal, fibrose intersticial e deficiência de suprimento sanguíneo (Qin *et al.*, 1997). A EE também promove o aumento da efetividade contrátil das fibras musculares, viabilizando, desse modo, a dinâmica de captação via GLUT-4, metabolismo da glicose e a atividade das vias metabólicas celulares (Guirro *et al.*, 2004). O transportador de glicose expressado, predominantemente, no músculo esquelético é o GLUT-4 (James *et al.*, 1989) e sua expressão, além de ser dependente da ação da insulina, também é relacionada à contratilidade do músculo, existindo, assim, clara associação entre o transporte de glicose nas fibras musculares e o grau de contração muscular basal (Gaster *et al.*, 2000).

Por esses motivos, parte das pesquisas tem ocorrido com objetivo de avaliar a funcionalidade de um músculo reinervado por neurorrafia látero-terminal e também se preocupa em propor intervenções pós-neurorrafia látero-terminal visando a aperfeiçoar a recuperação funcional na região reinervada (Tang, 1995; Fansa *et al.*, 1999; Durigan *et al.*, 2006). Uma dessas possibilidades é a estimulação elétrica

neuromuscular que, durante anos, tem sido objeto de estudo em eletrofisiologia (Dow *et al.*, 2004; Durigan *et al.*, 2006; Romão *et al.*, 2007; Russo *et al.*, 2008; Carvalho *et al.*, 2009; Polônio *et al.*, 2010).

Ainda não se conhece todas as possibilidades de recuperação de uma musculatura reinervada por neurorrafia látero-terminal, porém, alguns trabalhos confirmam a passagem de estímulo elétrico através da mesma e registro de atividade no músculo reinervado (Giovanoli *et al.*, 2000; Isaacs *et al.*, 2005).

No entanto, a necessidade funcional de um paciente vai além da passagem do estímulo pela junção entre o nervo doador e o nervo receptor. O músculo reinervado deveria apresentar características fisiológicas que permitam boa função. Uma das características mais importantes que um músculo hígido deve apresentar é a capacidade de produzir tensão durante a contração objetivando promover movimento (Enoka, 2000).

Dentro desse vasto universo de possibilidades terapêuticas, questiona-se se a eletroestimulação teria capacidade de melhorar a recuperação muscular e nervosa pós-neurorrafia látero-terminal. Acreditamos que os resultados encontrados neste estudo também se aplicarão na neurorrafia término-terminal, porém como a NLT é mais recente e o fato de não lesar o nervo doador aumentar seu potencial e, por isso, certamente será cada vez mais utilizada, nós resolvemos estudar na NLT. A expectativa de responder a esse questionamento justifica a realização desta pesquisa.

2. Objetivo

Analisar a eficiência da estimulação elétrica na manutenção do músculo e regeneração do nervo pós-neurorrafia látero-terminal.

3. Método

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Cirurgia Experimental do Departamento de Cirurgia e Ortopedia (cirurgias, teste da avaliação da marcha, perimetria, teste eletrofisiológico, teste de força, coleta das peças histológicas, sacrifício dos animais e morfometria), no Laboratório de Urologia (confeção das lâminas histológicas), ambos da Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP e no Departamento de Anatomia Patológica do Hospital do Câncer A. C. Camargo (digitalização das lâminas).

3.1. Animais

Todo o procedimento realizado esteve de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), sob o protocolo nº. 746 da Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina da UNESP – Campus de Botucatu (anexo 1).

Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central da UNESP – Campus de Botucatu. Foram utilizados 60 ratos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Wistar, machos, com massa média de 261,87 g (+/- 28,39). Os animais foram divididos, através de sorteio, em quatro grupos experimentais. Os animais foram sacrificados após 180 dias.

3.2. Grupos experimentais

No Grupo Controle, com 10 animais, foi dissecado o nervo fibular, contudo, este não sofreu secção ou neurraxia (Fig. 1).

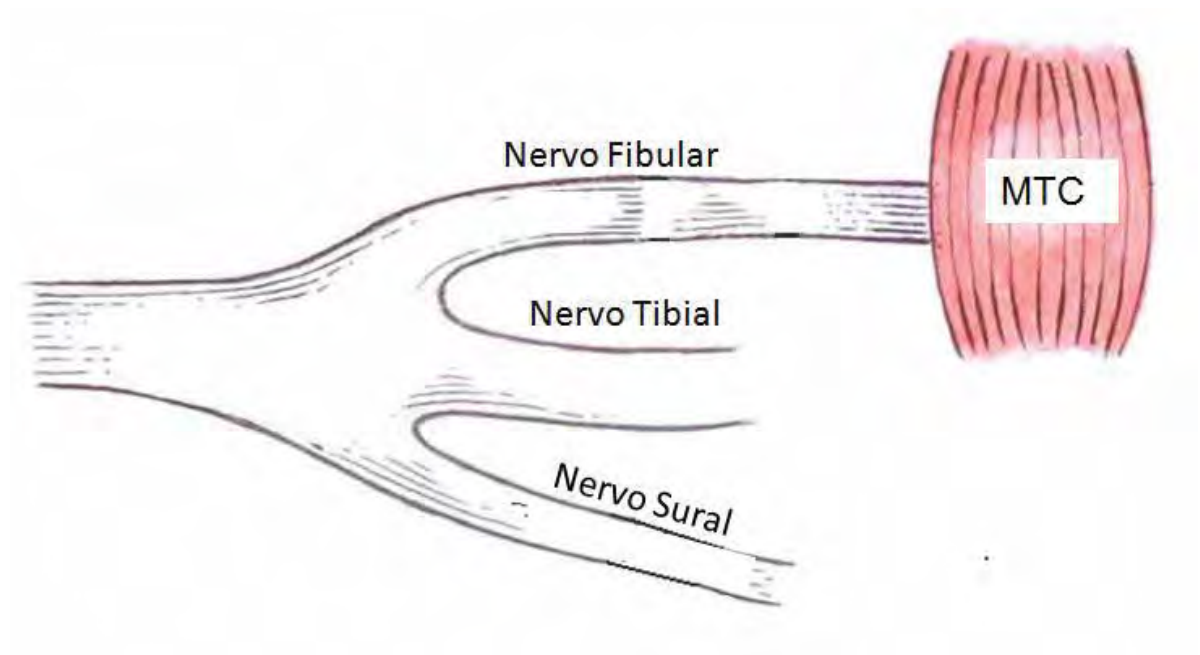


Figura 1 – Indica o procedimento cirúrgico do grupo Controle. **MTC:** Músculo Tibial Cranial.

No Grupo Desnervado (Desnervado), com 10 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 (Fig. 2).

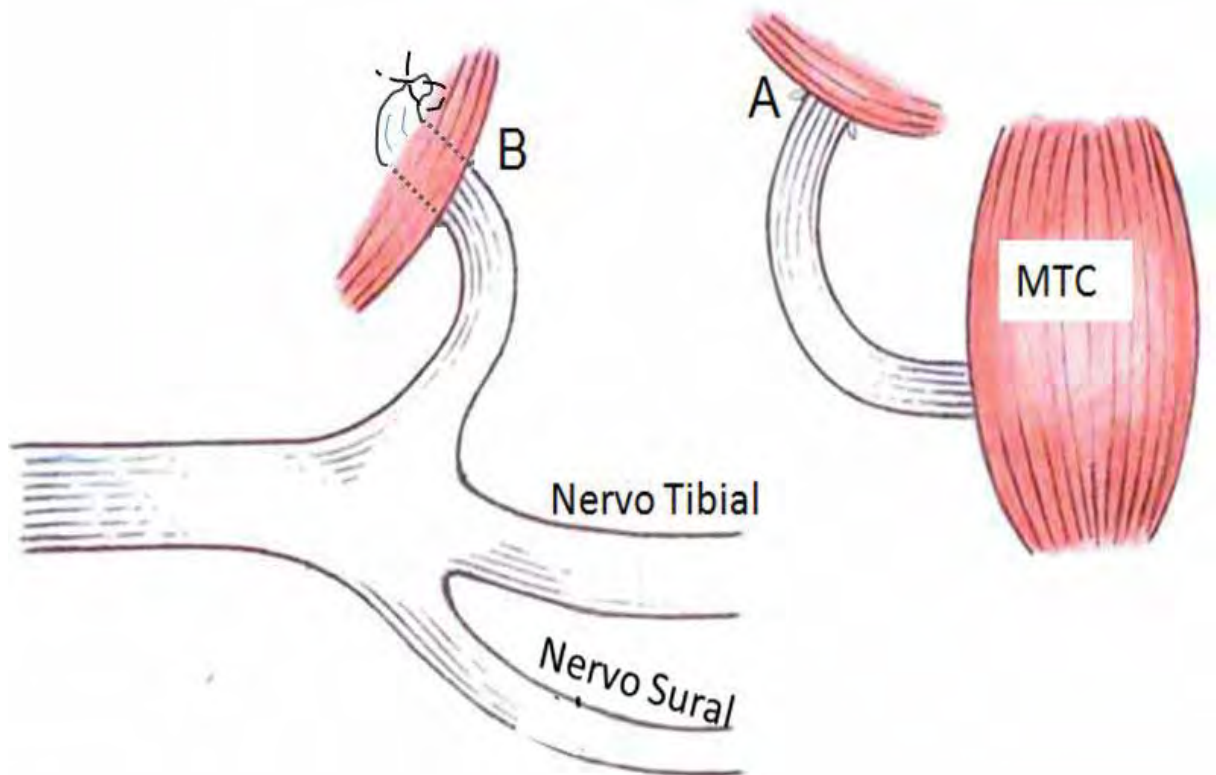


Figura 2 – Indica o procedimento cirúrgico do grupo Desnervado. **A:** Coto distal do nervo fibular. **B:** Coto proximal do nervo fibular. **MTC:** Músculo Tibial Cranial.

No Grupo Neurorrafia Látero-terminal (NLT) com 20 animais, o nervo fibular foi seccionado e seu coto proximal encurvado medialmente 100°, transfixou a musculatura adjacente e foi suturado na face superficial dessa musculatura, impedindo a regeneração espontânea. O coto distal do nervo fibular foi encurvado, aproximadamente 80°, e suturado lateralmente ao nervo tibial (Fig. 3)

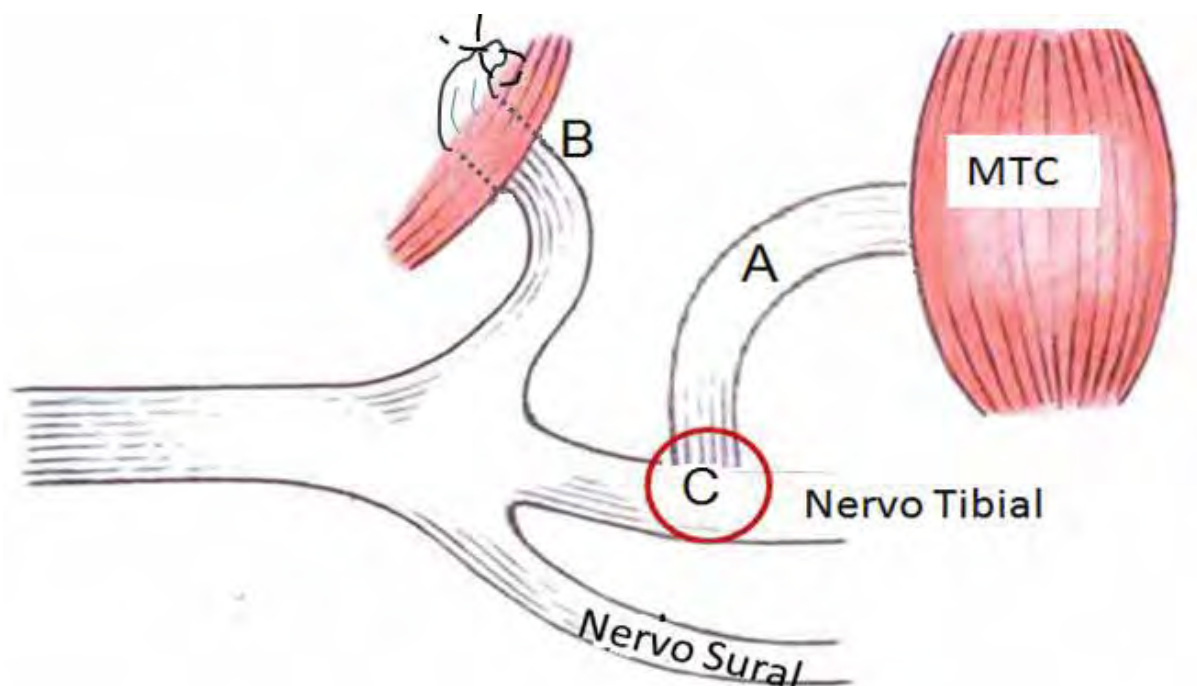


Figura 3 – Indica o procedimento cirúrgico do grupo NLT. **A:** Coto distal do nervo fibular. **B:** Coto proximal do nervo fibular. **C:** Neurorrafia Látero-terminal. **MTC:** Músculo Tibial Cranial.

No Grupo Neurorrafia Látero-terminal e Estimulação elétrica (NLT+EE), com 20 animais, o procedimento realizado foi o mesmo que no grupo NLT, porém, após a cirurgia, os animais receberam estimulação elétrica no músculo tibial cranial como tratamento (Fig. 4).

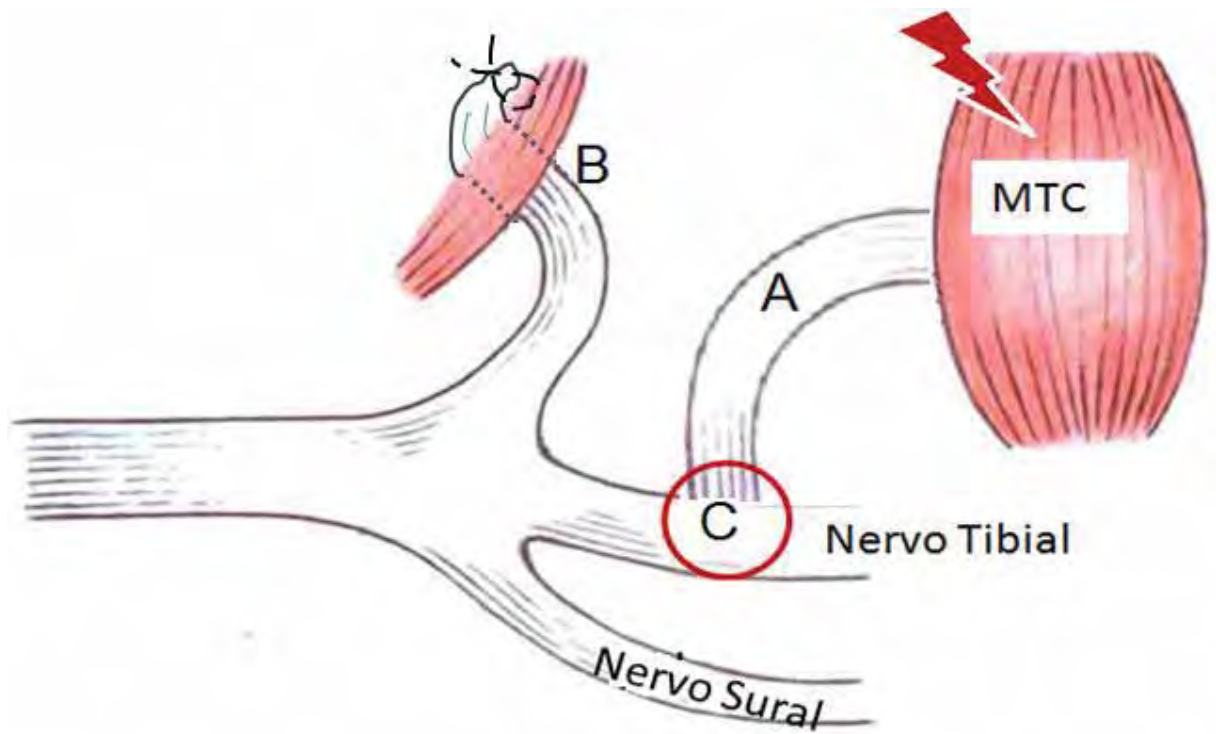


Figura 4 – Indica o procedimento cirúrgico do grupo NLT+EE. **A:** Coto distal do nervo fibular. **B:** Coto proximal do nervo fibular. **C:** Neurorrafia Látero-terminal. **MTC:** Músculo Tibial Cranial. **Raio:** Indica tratamento com EE do MTC.

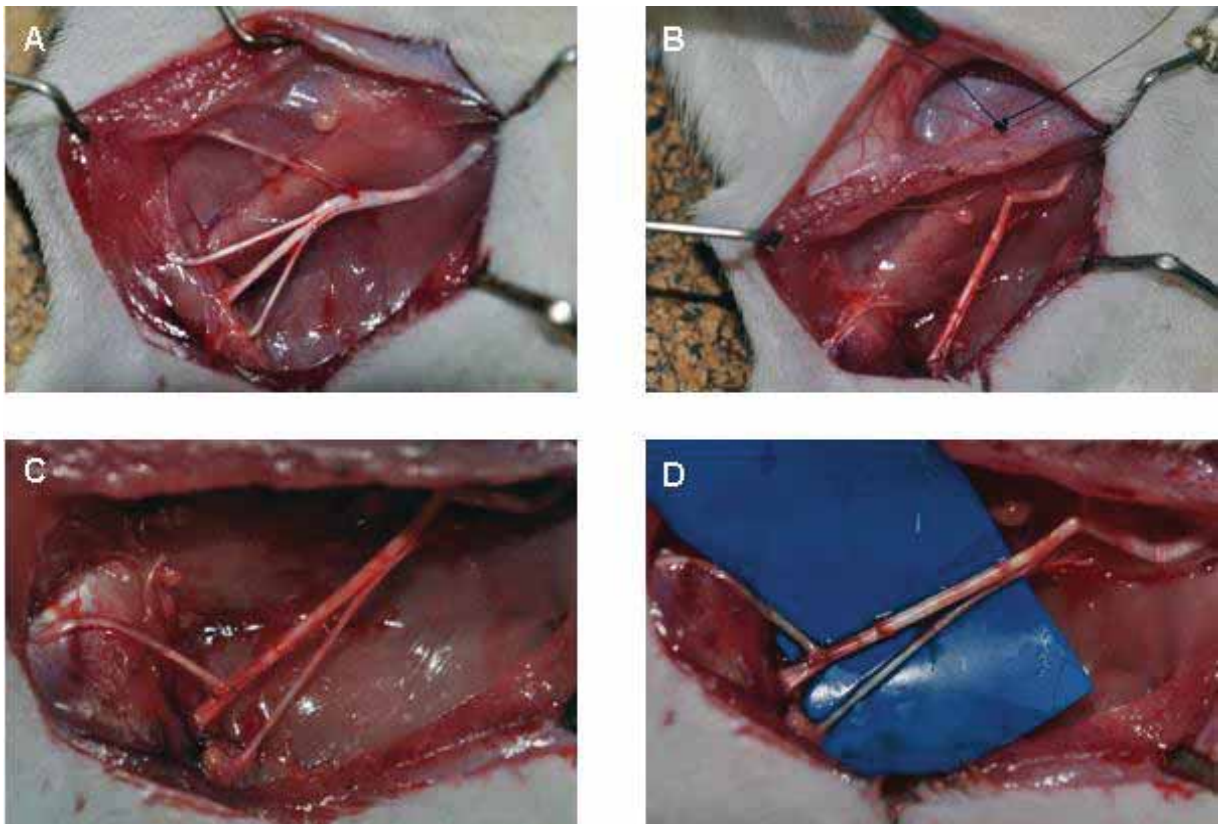


Figura 5 – Indica o procedimento cirúrgico em membro pélvico esquerdo do animal. **A:** Exposição do nervo isquiático e seus ramos, nervo fibular, nervo tibial e nervo sural. **B:** Coto proximal do nervo fibular transfixando a musculatura adjacente e sendo suturado na face superficial dessa. **C:** Neurorrafia Látero-terminal do nervo fibular na lateral do nervo tibial. **D:** Outra visão da NLT.

3.3. Cirurgia

Todos os procedimentos cirúrgicos e de coleta foram realizados pelo pesquisador, padronizando-se o método.

Precedendo cada procedimento cirúrgico, os animais foram anestesiados com ketamina (70 mg/Kg) e xilasina (30 mg/Kg) intramuscular, e após realizou-se a tricotomia.

A face dorso-lateral de um dos membros pélvicos, direito ou esquerdo, escolhidos por sorteio e marcados adequadamente, sofreu incisão de 2 a 3 cm longitudinalmente ao maior eixo do membro, comprometendo pele e subcutâneo com posterior divulsão da musculatura. Os nervos isquiático, fibular comum, tibial e sural foram dissecados.

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 náilon 4-0 na musculatura e pele.

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

3.4. Estimulação Elétrica

A estimulação elétrica foi iniciada com cinco dias de pós-operatório. Os animais do grupo NLT+EE passaram por três sessões semanais durante os 180 dias. Receberam aplicações de estimulação elétrica para o músculo tibial cranial com Corrente Alternada Sincronizada, com frequência de base de 1Khz, modulação em 10 Hz, com duração de 2 ms (da modulação), tempo de contração de 10 segundos por 20 segundos de relaxamento, durante 10 minutos. A corrente inicial foi de 8 mA sendo aumentada para 12 mA após cinco minutos para evitar o efeito de

acomodação do tecido muscular. Foi utilizado estimulador elétrico Neurodyn 10 Canais da empresa Ibramed (Fig. 6).



Figura 6 – Estimulador Elétrico Neurodyn 10 Canais (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 eram fixados sobre o ventre do MTC com fita crepe. (Figs. 7 e 8).

Foram utilizadas 10 cápsulas, ao mesmo tempo, para otimizar o tempo de estimulação.



Figura 7 – Animais recebendo estimulação elétrica.

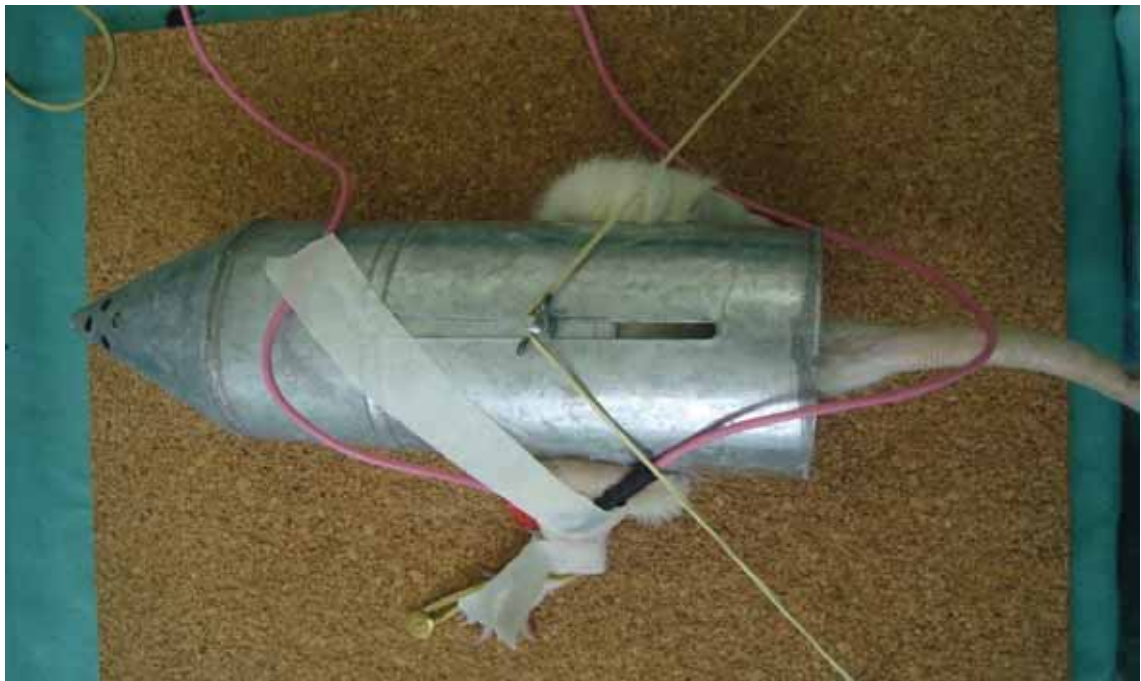


Figura 8 – Posicionamento dos animais na cápsula de estimulação.

3.5. Testes realizados

Todos os testes foram realizados e os resultados analisados pelo pesquisador.

Teste de avaliação da marcha

A cada 30 dias os animais foram submetidos ao teste de avaliação da marcha.

Os animais previamente treinados andaram em uma canaleta de 9 cm de largura por 78 cm de comprimento tendo seu assoalho coberto com uma tira de papel branco de tamanho apropriado, após terem seus pés posteriores pintadas com tinta nanquim preta para marcar a pegada no papel (Fig. 9).

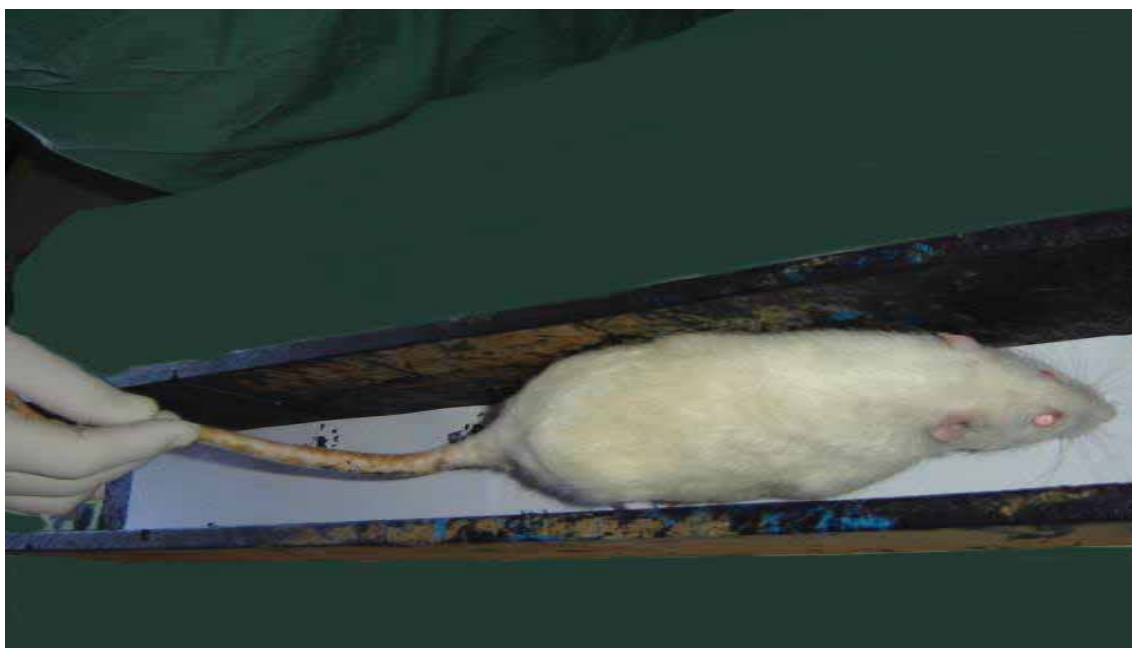


Figura 9 – Teste de avaliação da marcha.

As pegadas deixadas na folha de papel foram analisadas através das medidas descritas a seguir:

CPN (Comprimento da pegada do pé normal);

CPE (Comprimento da pegada do pé experimental);

APN (Abertura total do pé normal);

APE (Abertura total do pé experimental).

A partir destas medidas foram realizados os cálculos do índice funcional do nervo fibular (IFF), segundo Bain *et al.* (1989) (Fig. 10).

$$\text{IFF} = 174,9 \times \frac{\text{CPE} - \text{CPN}}{\text{CPE} + 80,3} + \frac{\text{APE} - \text{APN}}{\text{APN} - 13,4}$$



Figura 10 – Medidas realizadas para cálculo do índice funcional do nervo fibular (IFF).

Em alguns casos, os animais caminharam sobre o dorso do pé e, portanto, nenhuma medida pôde ser feita no lado experimental. Nestes casos, atribuíram-se os seguintes valores arbitrários: CPE = 80 mm; APE = 6 mm, recomendado por De Medinacelli *et al.* (1982) (Fig. 11).

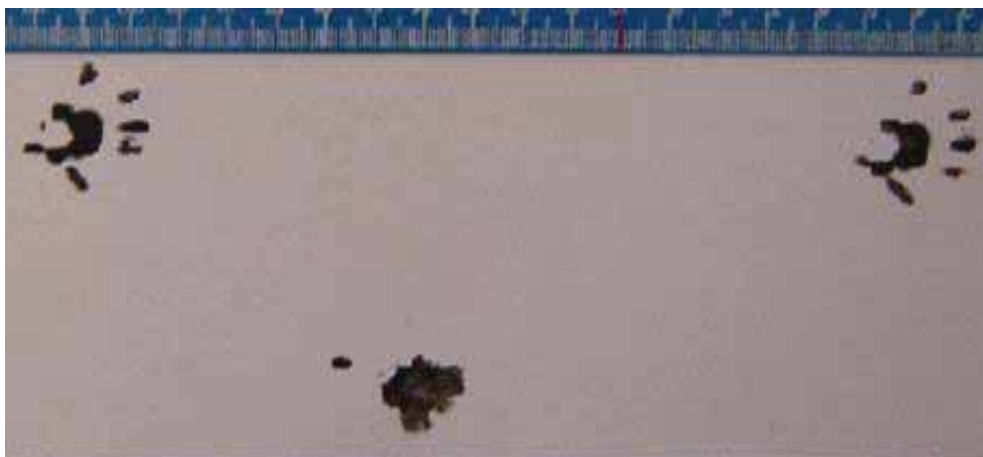


Figura 11 – Exemplo de teste para os quais foram atribuídos os valores arbitrários de CPE e APE.

Perimetria

A cada 45 dias os animais foram submetidos à perimetria do músculo tibial cranial para controle do trofismo muscular em comparação com o músculo contralateral.

A perimetria do membro pélvico dos animais foi obtida com os animais anestesiados, posicionados em decúbito ventral, com seus membros posteriores devidamente tricotomizados. Para este procedimento foi usado fio de algodão e paquímetro. O fio de algodão foi envolto no terço médio da perna do animal, tendo suas extremidades cortadas na região onde se cruzavam, sobrando, assim, exatamente o segmento de fio que envolveu a região de interesse. Esse fio foi embebido em gel neutro e, posteriormente, medido com o paquímetro.

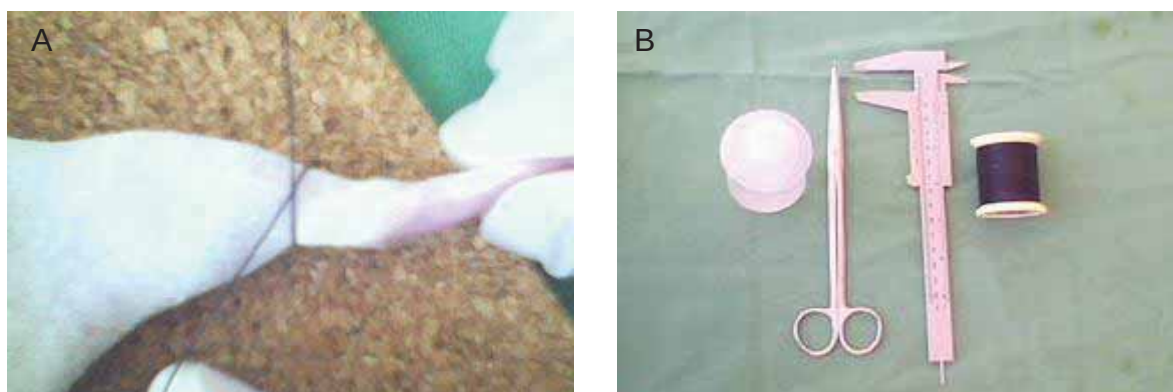


Figura 12 – Perimetria. **A:** Posicionamento do fio na perna do animal. **B:** Materiais utilizados para realização da perimetria: gel, tesoura, paquímetro e fio de algodão.

Teste eletrofisiológico

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

O teste eletrofisiológico foi realizado antes do sacrifício dos animais.

Após anestesia com ketamina (70 mg/Kg) e xilasina (30 mg/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 área, a duração, a amplitude e a latência do potencial de ação muscular. Foram realizados três conjuntos de medidas para cada animal com o nervo tibial intacto e mais três com a porção do nervo tibial seccionado distalmente à NLT, sendo escolhido um conjunto com o nervo tibial intacto e um conjunto com o nervo tibial seccionado, aquele que apresentava a maior amplitude registrada.

A avaliação das propriedades funcionais do músculo foi feita através de estímulos elétricos deflagrados por um eletrodo bipolar, especialmente desenvolvido para este propósito, cujo cátodo e ânodo estavam distantes 2 mm. O eletrodo de estimulação bipolar foi posicionado diretamente sobre o nervo isquiático ou tibial, proximalmente à neurorrafia, possibilitando a propagação dos impulsos elétricos através dela. A frequência do estímulo foi fixada em 1 pps e a duração em 100 μ s. A intensidade de estímulo utilizada, constante em todos os animais, foi de 5,1 volts. Os dados de amplitude e latência foram comparados entre os quatro grupos. Foi utilizado eletromiógrafo da marca Sapphire II 4ME (Fig. 13).



Figura 13 – Teste eletrofisiológico. **A:** Estimulação bipolar proximalmente à neurorrafia e os eletrodos de captação em agulha localizados no MTC. **B:** Eletromiógrafo. **C:** Traçado eletrofisiológico.

Força de contração do MTC

Após a realização do teste eletrofisiológico, o tendão distal do músculo tibial cranial foi seccionado e acoplado a um transdutor de força FT03 da empresa Grass Technologies, usando sutura com fio de náilon 4-0. O músculo foi tracionado pelo fio de náilon aumentando seu comprimento até que esta tração determinasse uma tensão com carga de 0,18 N. Este valor de pré-tensionamento foi determinado durante a calibração do dispositivo e foi reajustado entre os testes.

Os eletrodos do estimulador elétrico Neurodyn 10 foram posicionados diretamente no MTC exposto. O ensaio de contração muscular consistiu em três aplicações sequenciais de 1s com corrente nas mesmas especificações da corrente

utilizada para o tratamento dos animais do grupo NLT+EE. Um computador registrou os picos de força. A tensão muscular foi reajustada entre as medições. O teste de contração tetânica foi realizado com 100 mA e variação de frequência de 10 Hz e 100 Hz (Fig. 14).

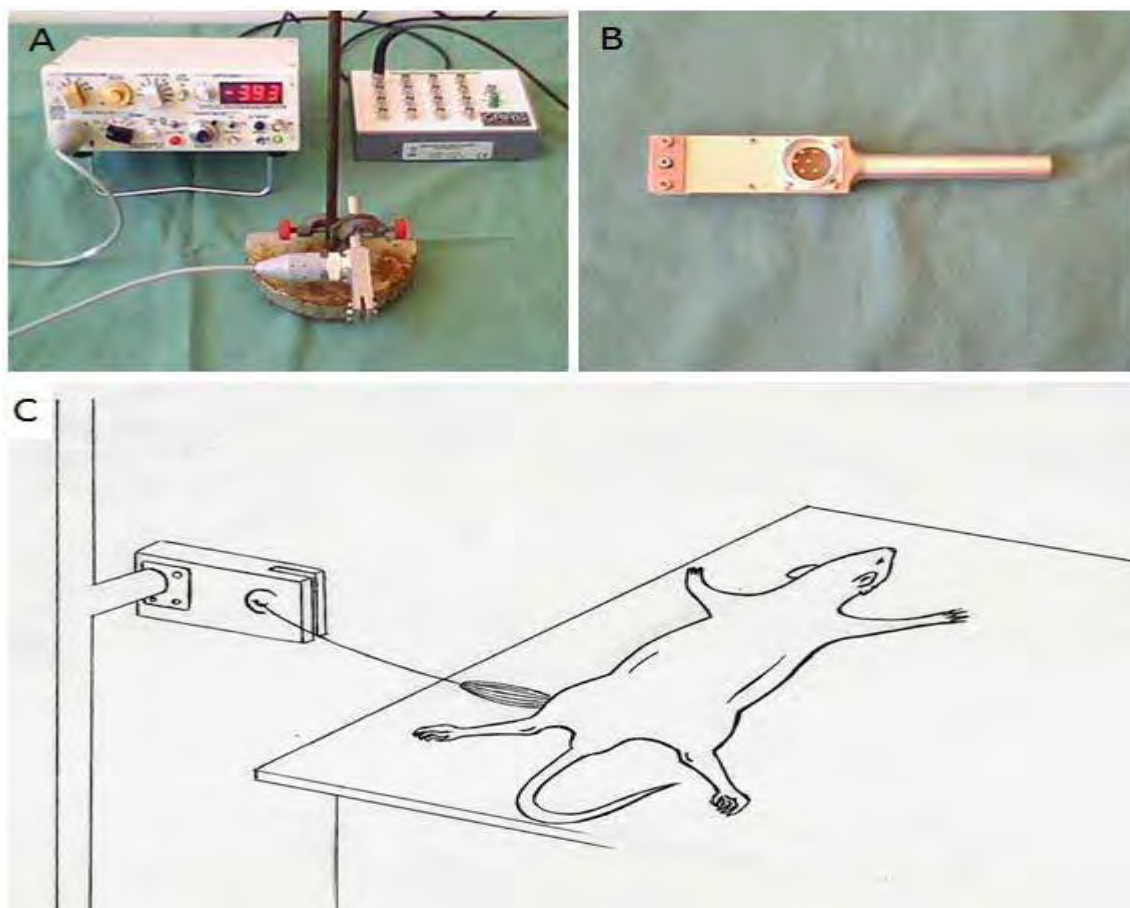


Figura 14 – Teste de força de contração muscular. **A:** Componentes do transdutor de força. **B:** Transdutor de força FT03. **C:** Esquema de conexão do MTC com o transdutor de força.

3.6. Coleta das peças histológicas e sacrifício

Após a realização do teste de força muscular os animais receberam dose letal de pentobarbital sódico, administrado intraperitonealmente, e procedeu-se à coleta de segmentos do nervo fibular, das neuorrafias, assim como à coleta do músculo tibial cranial direito e esquerdo (Figs. 15-17).

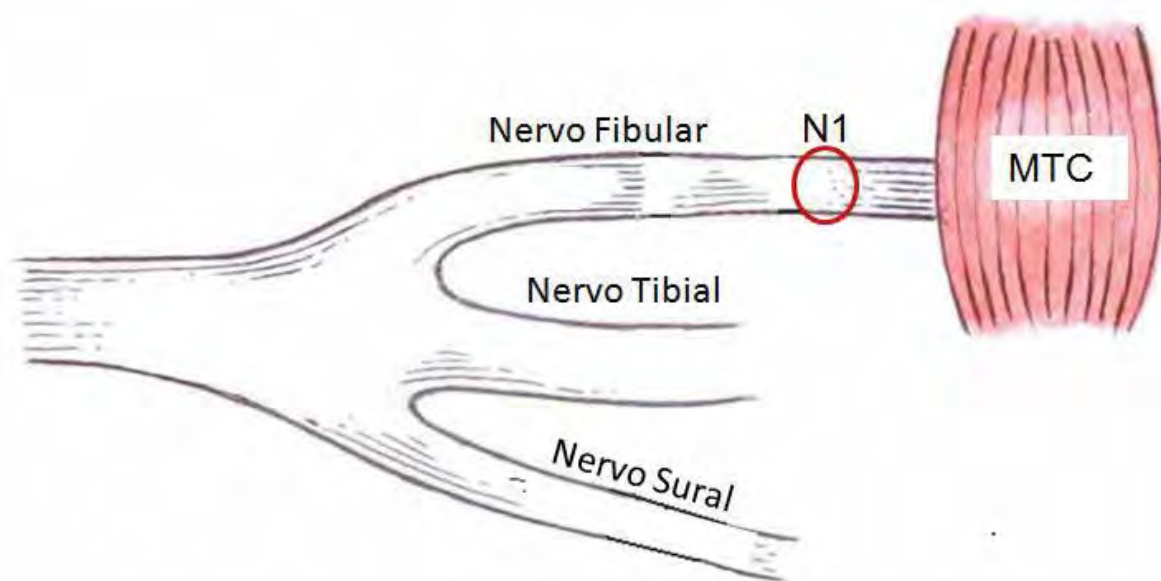


Figura 15 – Indica os fragmentos que serão coletados para realização da histologia no grupo Controle. **N1**: Corte transversal do coto distal do nervo fibular. **MTC**: Músculo tibial cranial.

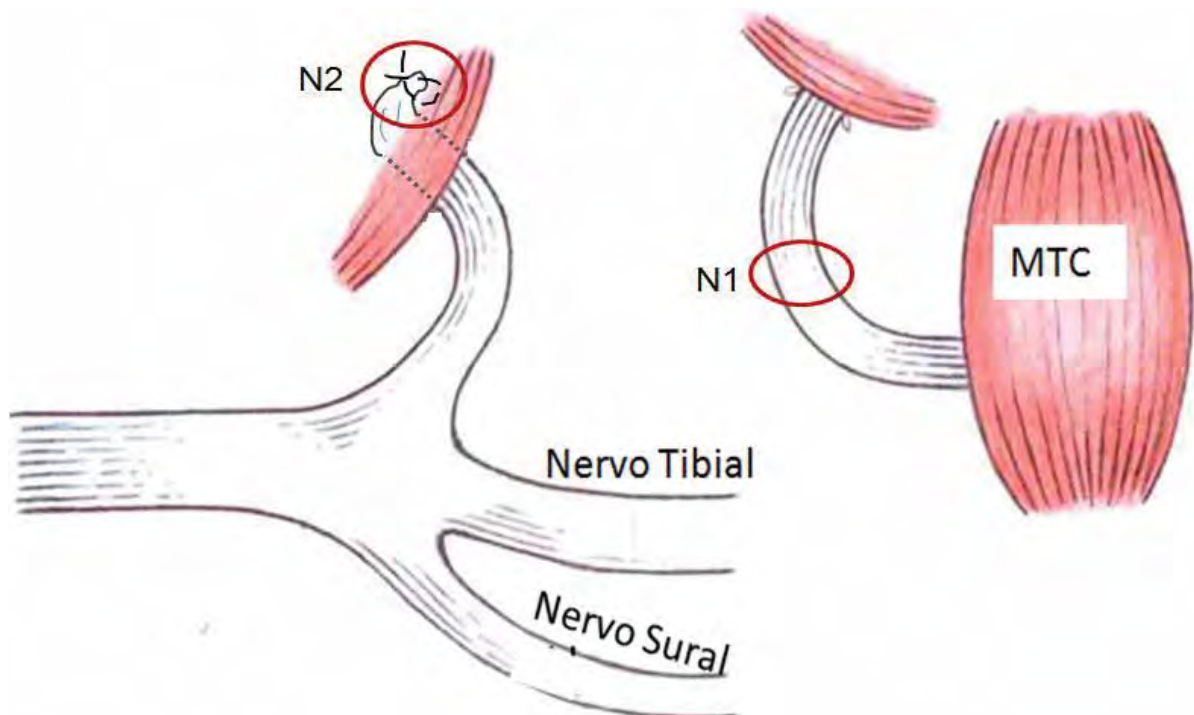


Figura 16 – Indica os fragmentos que serão coletados para realização da histologia no grupo Desnervado. **N1**: Corte transversal do coto distal do nervo fibular. **N2**: Corte longitudinal da extremidade do coto proximal do nervo fibular. **MTC**: Músculo tibial cranial.

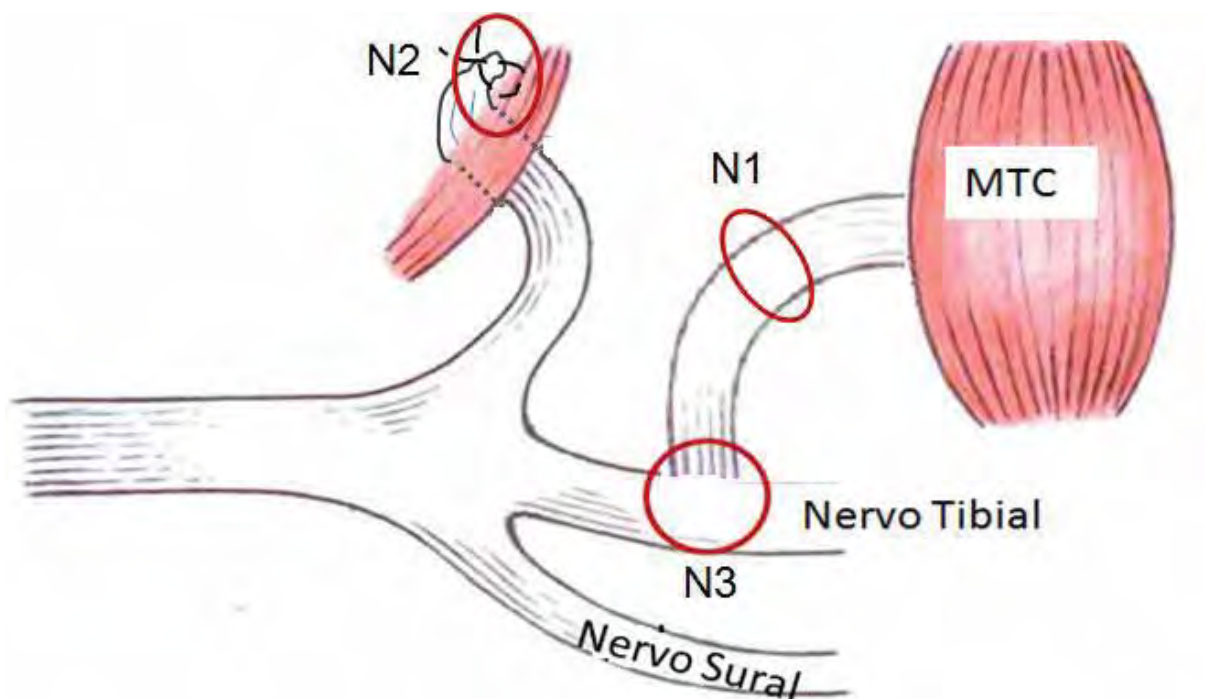


Figura 17 – Indica os fragmentos que serão coletados para realização da histologia nos grupos NLT e NLT+EE. **N1**: Corte transversal do coto distal do nervo fibular. **N2**: Corte longitudinal da extremidade do coto proximal do nervo fibular. **N3**: Corte longitudinal da extremidade do coto distal do nervo fibular e NLT. **MTC**: Músculo tibial cranial.

Os músculos tibiais craniais foram retirados, tiveram suas massas aferidas e foram mantidos imersos em nitrogênio líquido (-196°C) até o momento do processamento histológico.

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

3.7. Processamento histológico do músculo tibial cranial

Os músculos tibiais craniais, congelados em nitrogênio líquido, foram submetidos a secções transversais de 7 µm em criostato *Leica* CM1850. As secções foram realizadas na região central, transversalmente ao maior eixo do músculo. Foram realizados de 4 a 6 cortes de um mesmo músculo possibilitando a escolha, durante a análise, de um corte com menos artefatos histológicos. Os cortes histológicos foram corados pela técnica de Hematoxilina – Eosina (HE).

As lâminas foram identificadas com o número de registro no laboratório para que o pesquisador não soubesse a que animal ou grupo pertencia. A numeração real foi revelada apenas no momento da análise estatística.

Digitalização das imagens da lâmina histológica do músculo tibial cranial.

As imagens foram capturadas por uma *Scanner de Imagens ScanScope (Aperio)* e salvas em notebook LG, 3 GB DDR, HD 360 GB.

Foram selecionadas, aleatoriamente, 5 imagens de diferentes campos de um mesmo corte histológico (uma de cada quadrante mais o centro) de cada lâmina.

Foi utilizado aumento de 100 vezes para a análise das fibras musculares.

Medidas de área, diâmetro menor das fibras musculares e dos músculos inteiros.

As imagens digitalizadas e salvas foram analisadas através de medidas de área, diâmetro mínimo e perímetro das fibras musculares e do músculo como um todo.

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

As fibras foram medidas, tomando-se 20 fibras por imagem salva (quatro por quadrante e mais quatro ao centro da imagem), ou seja, 100 fibras por lâmina, o que representou 100 fibras por músculo e uma média de 1.226 fibras por grupo.

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, permanecendo em estufa a 37°C por uma hora. O emblocamento foi realizado posicionando-se o segmento de nervo em resina Araldite® e mantido em estufa a 60°C por 48 horas para polimerização.

Antes do corte histológico os blocos foram preparados para o corte através da eliminação do excesso de resina ao redor do segmento de nervo com auxílio de uma lupa Carl Zeiss Jema adaptada, em aumento de 1,6 x, e lâmina Gillette®.

Com os blocos de N1 preparados, foram realizados cortes transversais semifinos (0,5 µm) em micrótomo *Leica* MZ6. 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 submetidos a cortes longitudinais (N2 e N3) 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 látero-terminal.

Digitalização das imagens das lâminas histológicas de nervos

As imagens foram capturadas por um *Scanner de Imagens ScanScope (Aperio)* e salvas em notebook LG, 3 GB DDR, HD 360 GB.

Foi utilizado aumento de 200 vezes para a análise das fibras nervosas.

Foram salvas duas imagens de cada corte histológico para que fosse obtida, com isso, a totalidade do nervo.

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

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

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

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

Os resultados obtidos de área e diâmetro mínimo axonal foram organizados em uma tabela e, então, calculada a média das medidas obtidas para cada animal. A partir destas médias, foi realizada a análise estatística para comparação entre os grupos (Fig. 18).

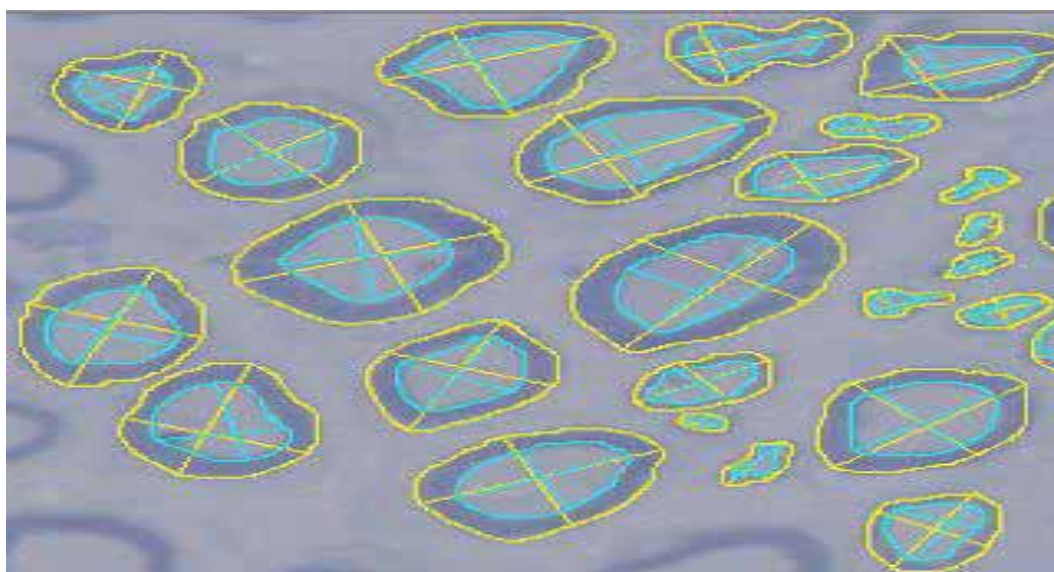


Figura 18 – Seleção das fibras nervosas para medidas de área, diâmetro mínimo e área, e espessura da bainha de mielina. Fibras nervosas em amarelo e axônios em azul.

3.9. Análise Estatística

Quando comparados os grupos, foi utilizado o teste de análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste de TUKEY, quando detectada diferença significativa. Quando a distribuição dos dados apresentava-se fora da normalidade, foi utilizada análise de variância em ranques de Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn, quando detectada diferença. Para comparação entre o MTC experimental e normal foi utilizado Teste t pareado. Em todas as análises, foi utilizado nível de significância $p < 0,05$.

4. Resultados

4.1 – Massa corporal

As tabelas 1 e 2 representam a massa corporal dos ratos no início e no final do experimento, respectivamente. As massas foram comparadas entre os grupos. No início do experimento, os grupos eram homogêneos em massa corporal, porém, ao final, houve uma diferença estatística entre os grupos.

Tabela 1 – Mediana e extremos, média e desvio padrão da massa inicial dos ratos (g).

	Procedimento				p ⁽¹⁾
	Controle	Desnervado	NLT	NLT + EE	
Mediana	251 (231 / 287)	244 (222 / 275)	267 (222 / 305)	256 (218 / 328)	0,440
Média	254,5 (+/- 21,6)	256,6 (+/- 34,4)	270,5 (+/- 26,3)	259,5 (+/- 30)	

(1) Kruskal-Wallis para amostras independentes.

Controle = Desnervado = NLT = NLT+EE (p = 0,440)

Tabela 2 – Mediana e extremos, média e desvio padrão da massa final dos ratos (g).

	Procedimento				p ⁽¹⁾
	Controle (a,b)	Desnervado (a,b)	NLT (a)	NLT + EE (b)	
Mediana	500 (414,5/536,5)	483 (467 / 493)	527 (467 / 557)	450 (419,5 / 492)	0,011
Média	486,5 (+/- 77,4)	479 (+/- 27,5)	517,4 (+/- 48,2)	455,3 (+/- 44,4)	

(1) Kruskal-Wallis para amostras independentes.

Controle = Desnervado = NLT; Controle = Desnervado = NLT+EE; NLT > NLT+EE (p = 0,011)

4.2 – Índice da Massa do Músculo Tibial Cranial (IMM)

A tabela 3 representa o índice da massa do MTC experimental. O cálculo foi realizado dividindo-se a massa do MTC experimental pela massa corporal final dos animais e multiplicado por 100. Os resultados demonstraram que os grupos NLT e NLT+EE são equivalentes, porém, o grupo NLT também se equivale ao grupo Desnervado enquanto o grupo NLT+EE se equivale ao grupo Controle.

Tabela 3 – Mediana e extremos; média e desvio padrão do Índice da Massa do MTC experimental (IMM) (g).

	Procedimento				p ⁽¹⁾
	Controle (a)	Desnervado (c)	NLT (b,c)	NLT + EE (a,b)	
Mediana	0,189 (0,17 / 0,2)	0,033 (0,03 / 0,04)	0,097 (0,068 / 0,13)	0,145 (0,09 / 0,16)	<0,001
Média	0,188 (+/- 0,017)	0,036 (+/- 0,009)	0,098 (+/- 0,041)	0,131 (+/- 0,035)	

(1) Kruskal-Wallis para amostras independentes.

Controle = NLT+EE > Desnervado; NLT = NLT+EE; Controle > NLT = Desnervado (p < 0,001).

4.3 – Massa do MTC experimental x Massa do MTC normal.

A tabela 4 e a figura 19 representam a massa do MTC experimental em comparação com a massa do MTC normal em cada grupo. No grupo controle, não houve diferença entre os lados experimental e normal. Nos demais grupos, o lado normal sempre foi maior que o lado experimental, porém, a perda de massa muscular do grupo NLT+EE (26,12 %) foi menor que a perda da massa muscular do grupo NLT (37,23 %).

Tabela 4 – Média e desvio padrão do MTC e porcentagem de perda de massa do MTC experimental em relação ao normal (g).

	Controle		Desnervado		NLT		NLT+EE	
	Normal	Experimental	Normal	Experimental	Normal	Experimental	Normal	Experimental
Média	0,828	0,914	0,859	0,172	0,803	0,504	0,804	0,594
DP	0,147	0,177	0,135	0,0499	0,165	0,211	0,148	0,152
Perda %	-10,39		79,98		37,23		26,12	

Teste t pareado para amostras dependentes.

Controle: Normal = Experimental ($p = 0,114$); **Desnervado:** Normal > Experimental ($p = 0,001$); **NLT:** Normal > Experimental ($p = 0,001$); **NLT+EE:** Normal > Experimental ($p = 0,001$).

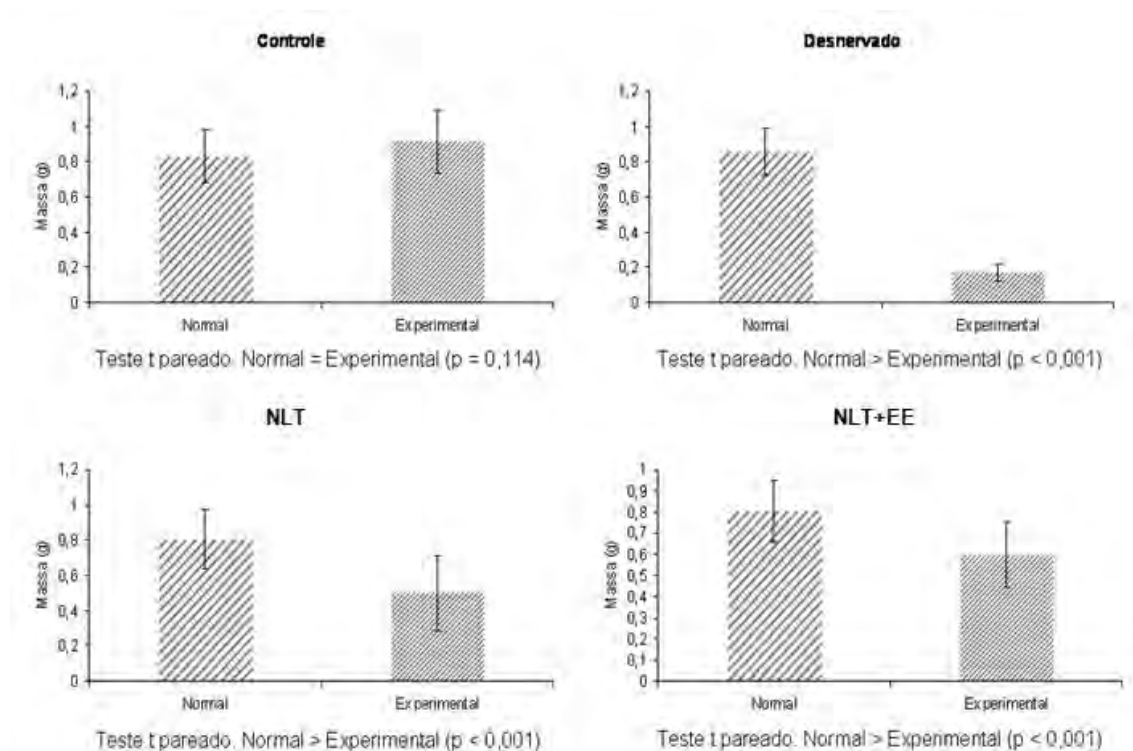


Figura 19 - Massa do MTC experimental em comparação com o MTC normal em cada grupo. Teste t pareado. **Controle:** Normal = Experimental ($p = 0,114$). **Desnervado:** Normal > Experimental ($p = 0,001$). **NLT:** Normal > Experimental ($p = 0,001$). **NLT+EE:** Normal > Experimental ($p = 0,001$).

4.4 - Teste de Avaliação da Marcha com Índice Funcional do Fibular (IFF)

As tabelas 5 e 6 representam o índice funcional do fibular para 30 e 180 dias, respectivamente. Com 30 dias de pós-operatório o grupo controle foi superior aos demais grupos, que se igualaram entre eles. Com 180 dias de pós-operatório, o grupo NLT+EE foi o único a se igualar ao grupo Controle.

Tabela 5 – Mediana e extremos; média e desvio padrão do índice funcional do fibular (IFF) 30 dias.

	Procedimento			
	Controle	Desnervado	NLT	NLT+EE
Mediana	-14,8 (-42,5 / -0,7)	-108,1 (-157,3 / -39,9)	-82,3 (-164,8 / 26,8)	-75,8 (-184,9 / -32,8)
Média	-19,1 (+/- 14,5)	-99,9 (+/- 37,7)	-79,7 (+/- 46,5)	-83,7 (+/- 42,6)

Kruskal-Wallis para amostras independentes.

Controle > Desnervado = NLT = NLT+EE (P = 0,001)

Tabela 6 – Mediana e extremos; média e desvio padrão do índice funcional do fibular (IFF) 180 dias.

	Procedimento			
	Controle	Desnervado	NLT	NLT+EE
Mediana	-20,3 (-37,4 / -1,3)	-127,0 (-169,3 / -110,4)	-74,5 (-180,3 / -0,3)	-29,9 (-147,9 / -11,3)
Média	-20,5 (+/- 10,8)	-130,2 (+/- 18,4)	-82,1 (+/- 49,3)	-55,2 (+/- 43,6)

Kruskal-Wallis para amostras independentes.

Controle = NLT+EE > Desnervado; Controle > NLT = Desnervado; NLT+EE = NLT (P < 0,001)

A tabela 7 e a figura 20 representam a variação do índice funcional do fibular entre 30 e 180 dias de pós-operatório. O grupo NLT+EE foi o grupo que mais evoluiu com melhora de 60,5% do IFF enquanto o grupo NLT obteve melhora de 9,5% do IFF.

Tabela 7 – Variação do índice funcional do fibular entre 30 e 180 dias (%).

Variação do IFF (%)	Procedimento			
	Controle	Desnervado	NLT	NLT+EE
		-36,5	-17,5	9,5
				60,5

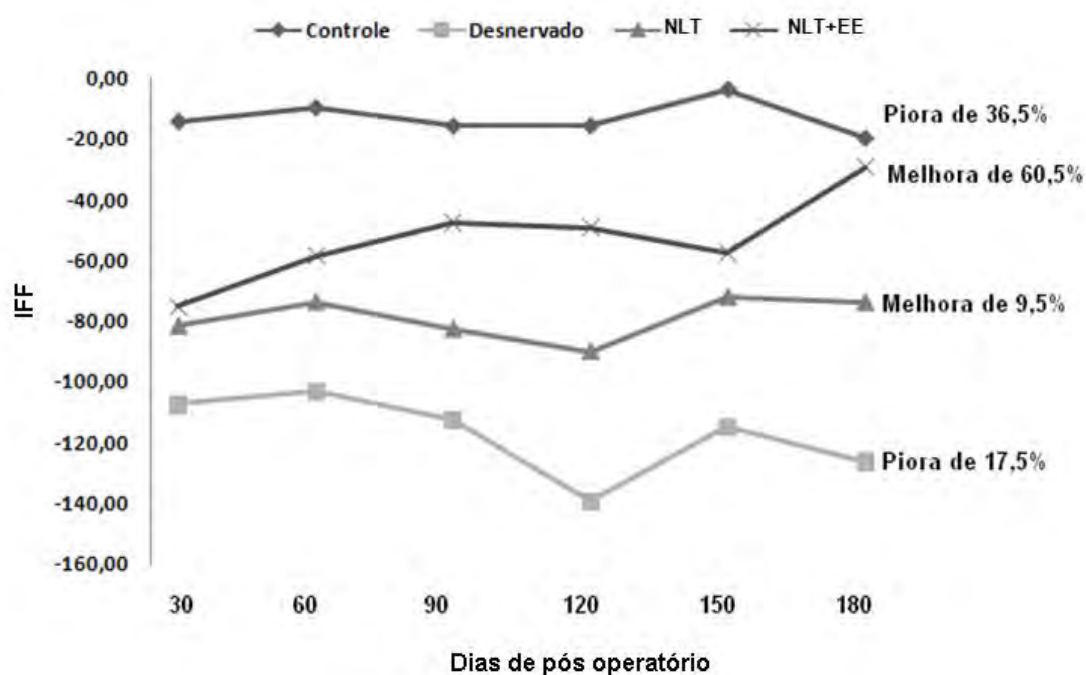


Figura 20 - Evolução do índice funcional do fibular entre 30 e 180 dias de pós-operatório.

4.5 - Perimetria

As tabelas 8 e 9 representam a perimetria do MTC experimental com 45 e 180 dias de pós-operatório. O grupo Controle demonstrou valores superiores aos demais grupos nos dois momentos e os grupos NLT e NLT+EE foram equivalentes.

Tabela 8 – Mediana e intervalos interquartílicos, média e desvio padrão da perimetria do MTC com 45 dias de pós-operatório (mm).

	Procedimento				p ⁽¹⁾
	Controle (a)	Desnervado (b)	NLT (a)	NLT + EE (a,b)	
Mediana	34,5 (33 / 36)	30,5 (30 / 31)	34 (31 / 35,5)	33 (30,5 / 37)	0,012
Média	34,5 (+/- 2,9)	30,6 (+/- 0,9)	33,8 (+/- 2,9)	33,6 (+/- 3,4)	

Kruskal-Wallis para amostras independentes.

Controle = NLT = NLT+EE; Controle = NLT > Desnervado; NLT+EE = Desnervado (p = 0,012).

Tabela 9 – Mediana e intervalos interquartílicos, média e desvio padrão do perimetria do MTC com 180 dias de pós-operatório (mm).

	Procedimento				p ⁽¹⁾
	Controle (a)	Desnervado (b)	NLT (b)	NLT + EE (b)	
Mediana	36 (34,9 / 37,9)	30,3 (29,1 / 32,9)	32,7 (31,2 / 33,4)	32 (29,4 / 34,5)	0,004
Média	36,5 (+/- 2,4)	30,6 (+/- 3,1)	32,3 (+/- 3,1)	32,8 (+/- 6,6)	

Kruskal-Wallis para amostras independentes.

Controle > Desnervado = NLT = NLT+EE (p = 0,004).

4.6 - Teste Eletrofisiológico

As tabelas 10 e 11 representam os testes eletrofisiológicos para latência e amplitude antes e depois da secção do nervo tibial, respectivamente. Os grupos foram equivalentes durante os dois testes.

Tabela 10 – Mediana e extremos, média e desvio padrão da latência (ms) e amplitude (mV) antes da secção do nervo tibial.

	Procedimento				p ⁽¹⁾
	Controle (a)	Desnervado	NLT (a)	NLT + EE (a)	
Mediana Latência	1,84 (1,62 / 1,98)	+∞	1,6 (1,5 / 2,6)	1,9 (1,6 / 2,3)	0,803
Média Latência	2,0 (+/- 0,69)	-	2,2 (+/- 0,93)	2,1 (+/- 0,67)	-
Mediana Amplitude	13,1 (8,1 / 27,6)	-∞	6,45 (4,2 / 12,9)	11,03 (3,1 / 17,9)	0,150
Média Amplitude	17,2 (+/- 12,5)	-	7,8 (+/- 5,72)	11,2 (+/- 8,6)	-

Kruskal-Wallis para amostras independentes.

Latência: Controle = NLT = NLT+EE (p = 0,803).

Amplitude: Controle = NLT = NLT+EE (p = 0,150).

Tabela 11 – Mediana e extremos, média e desvio padrão da latência (ms) e amplitude (mV) após secção do nervo tibial.

	Procedimento		p ⁽¹⁾
	NLT	NLT + EE	
Mediana Latência	2,16 (1,52 / 6,02)	2,59 (1,54 / 7,50)	0,489
Média Latência	2,86 (+/- 1,42)	3,18 (+/- 1,7)	-
Mediana Amplitude	4,74 (0,12 / 21,20)	8,30 (0,17 / 17,20)	0,353
Média Amplitude	5,93 (+/- 5,61)	8,52 (+/- 6,84)	-

Mann-Whitney para amostras independentes.

Latência: NLT = NLT+EE (p = 0,489)

Amplitude: NLT = NLT+EE (p = 0,353)

4.7 – Teste de Força Máxima

A tabela 12 e a figura 21 representam a força máxima do MTC experimental entre os grupos quando estimulado com frequência de 10 Hz. O grupo Desnervado foi inferior aos demais, que se equivaleram.

Tabela 12 – Mediana e intervalos interquartílicos; média e desvio padrão da força máxima de contração do MTC com 10 Hz (N).

	Procedimento			
	Controle	Desnervado	NLT	NLT+EE
Mediana	0,44 (0,398 / 0,522)	0,28 (0,268 / 0,323)	0,49 (0,47 / 0,53)	0,52 (0,47 / 0,558)
Média	0,461 (+/- 0,087)	0,295 (+/- 0,046)	0,493 (+/- 0,079)	0,513 (+/- 0,08)

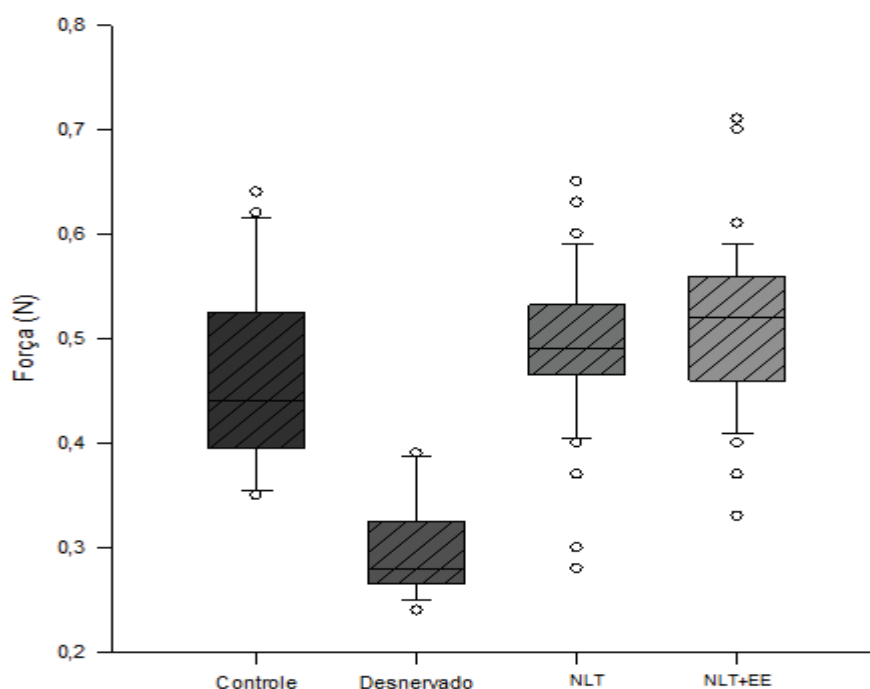


Figura 21 – *Box plot* da força máxima de contração do MTC experimental com 10Hz (N). Kruskal-Wallis seguido pelo Método de Dunn.

Controle = NLT = NLT+EE > Desnervado ($p=0,001$).

O gráfico tipo *Box Plot* mostra: a linha central da caixa marca a mediana do conjunto de dados; a parte inferior da caixa é delimitada pelo quartil inferior (25%) e a parte superior pelo quartil superior (75%); as hastes inferiores e superiores se estendem, respectivamente, do quartil inferior até o menor valor e do quartil superior até o maior valor; os valores fora desta área são representados individualmente no gráfico sendo estes valores caracterizados como *outliers*.

A tabela 13 e a figura 22 representam a força máxima do MTC, quando estimulado com frequência de 100 Hz. Os resultados mostraram o grupo NLT+EE superior ao grupo NLT.

Tabela 13 – Mediana e intervalos interquartílicos; média e desvio padrão da força máxima de contração do MTC com 100 Hz (N).

	Procedimento			
	Controle	Desnervado	NLT	NLT+EE
Mediana	0,870 (0,705 / 0,970)	0,290 (0,268 / 0,328)	0,765 (0,620 / 0,890)	0,890 (0,810 / 0,990)
Média	0,850 (+/- 0,174)	0,307 (+/- 0,059)	0,777 (+/- 0,238)	0,939 (+/- 0,202)

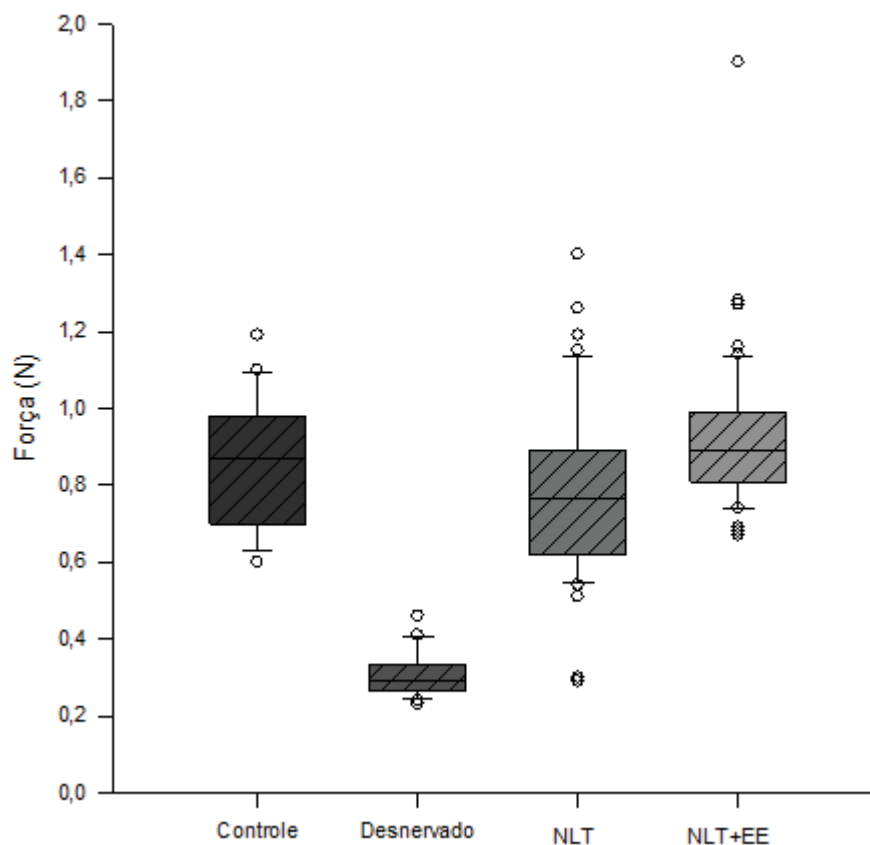


Figura 22 – Box plot da forças máximas de contração do MTC experimental a 10Hz (N). Kruskal-Wallis seguido pelo Método de Dunn. NLT+EE = Controle > Desnervado; NLT+EE > NLT > Desnervado; Controle = NLT ($p < 0,001$).

4.8 – Análise Morfométrica

4.8.1 - Análise morfométrica do músculo tibial cranial experimental (MTCE).

A tabela 14 e a figura 23 representam o perímetro do músculo tibial cranial experimental do animal. Observamos uma equivalência entre os grupos NLT e NLT+EE para este parâmetro.

Tabela 14 – Mediana e intervalos interquartílicos; média e desvio padrão do perímetro do corte transversal do MTC experimental (mm).

	Procedimento			
	Controle	Desnervado	NLT	NLT+EE
Mediana	233,56 (171,54 / 250,51)	89,78 (74,1 / 153,23)	106,69 (88,53 / 179,1)	100,49 (86,34 / 142,2)
Média	212,31 (+/-61,59)	115,4 (+/- 58,03)	135,7 (+/-79,6)	141,76 (+/-110,46)

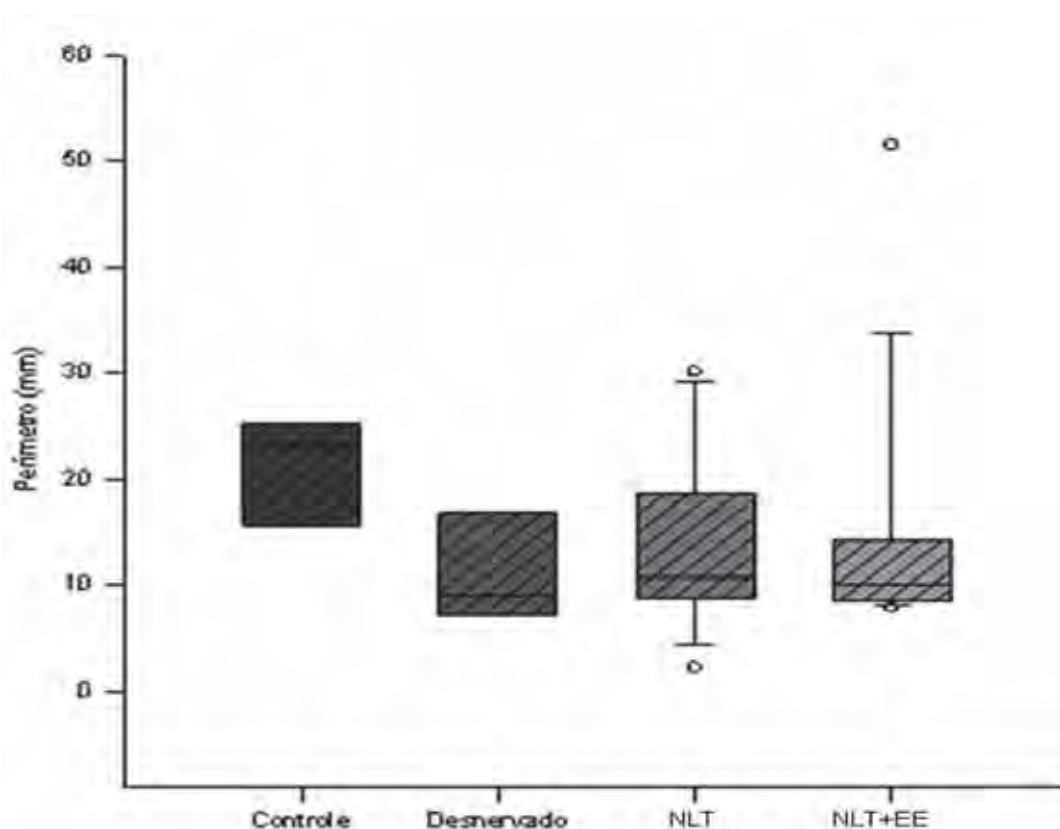


Figura 23 – Box plot para perímetro do corte transversal do MTC experimental (mm). Kruskal-Wallis seguido pelo Método de Dunn. Controle > Desnervado; Controle = NLT+EE = NLT; Desnervado = NLT = NLT+EE (p=0,032).

A tabela 15 e a figura 24 representam a área do músculo tibial cranial experimental do animal. O grupo Desnervado demonstrou resultados inferiores aos demais grupos, os grupos NLT e NLT+EE foram equivalentes para este parâmetro.

Tabela 15 – Mediana e intervalos interquartílicos; média e desvio padrão da área do corte transversal do MTC experimental (mm²).

	Procedimento			
	Controle	Desnervado	NLT	NLT+EE
Mediana	30,88 (20,75 / 38,33)	8,32 (2,97 / 6,63)	22,16 (11,36 / 32,56)	23,52 (17,68 / 31,43)
Média	28,93 (+/-10,1)	4,77 (+/- 2,33)	28,74 (+/-32,32)	24,16 (+/-8,67)

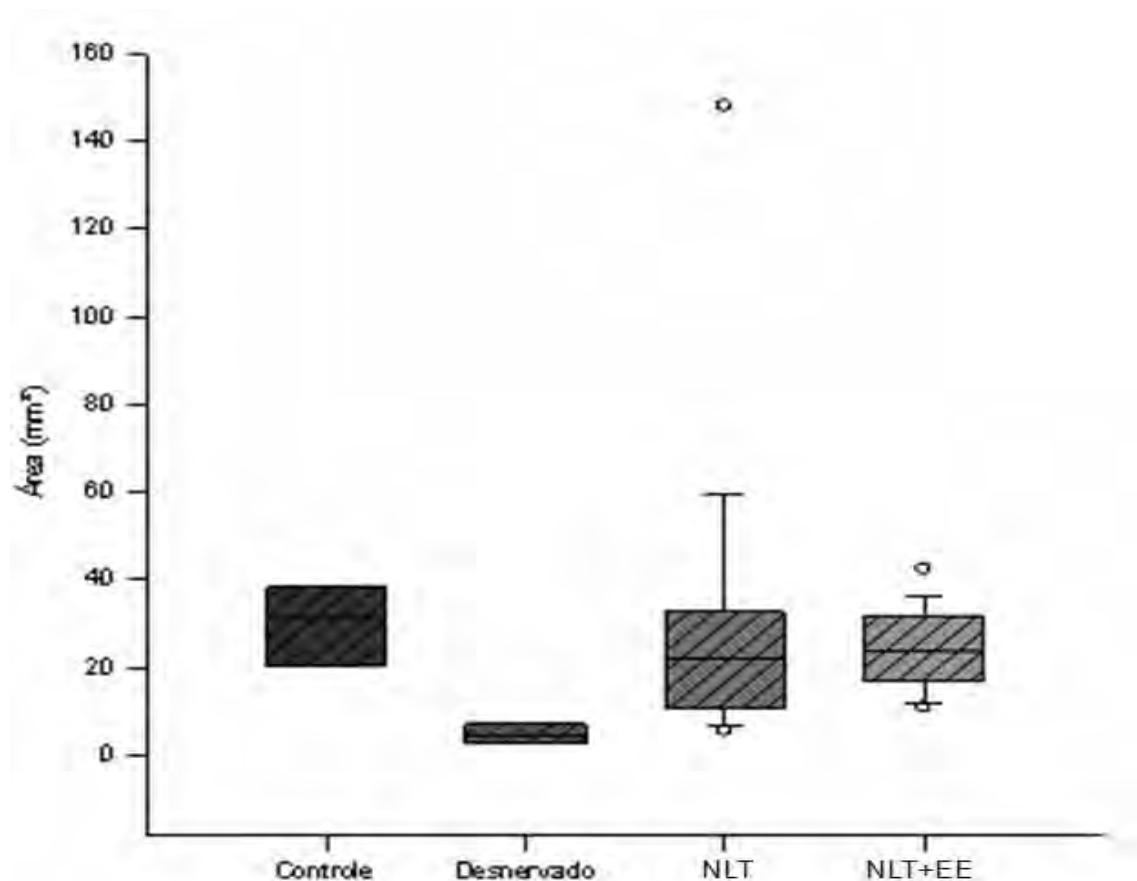


Figura 24 – Área do corte transversal do MTC experimental (mm²). Kruskal-Wallis seguido pelo Método de Dunn. Desnervado < Controle = NLT = NLT+EE (p<0,001).

A tabela 16 e a figura 25 representam o diâmetro mínimo do músculo tibial cranial experimental do animal. O grupo Desnervado demonstrou resultados inferiores aos demais grupos, os grupos NLT e NLT+EE foram equivalentes para este parâmetro.

Tabela 16 – Mediana e intervalos interquartílicos; média e desvio padrão do diâmetro mínimo do corte transversal do MTC experimental (mm).

	Procedimento			
	Controle	Desnervado	NLT	NLT+EE
Mediana	7,61 (5,68 / 7,92)	2,53 (1,84 / 2,9)	5,88 (4,06 / 6,65)	6,23 (4,72 / 6,93)
Média	6,91 (+/-1,87)	2,44 (+/- 0,63)	5,75 (+/-3,03)	6,24 (+/-1,95)

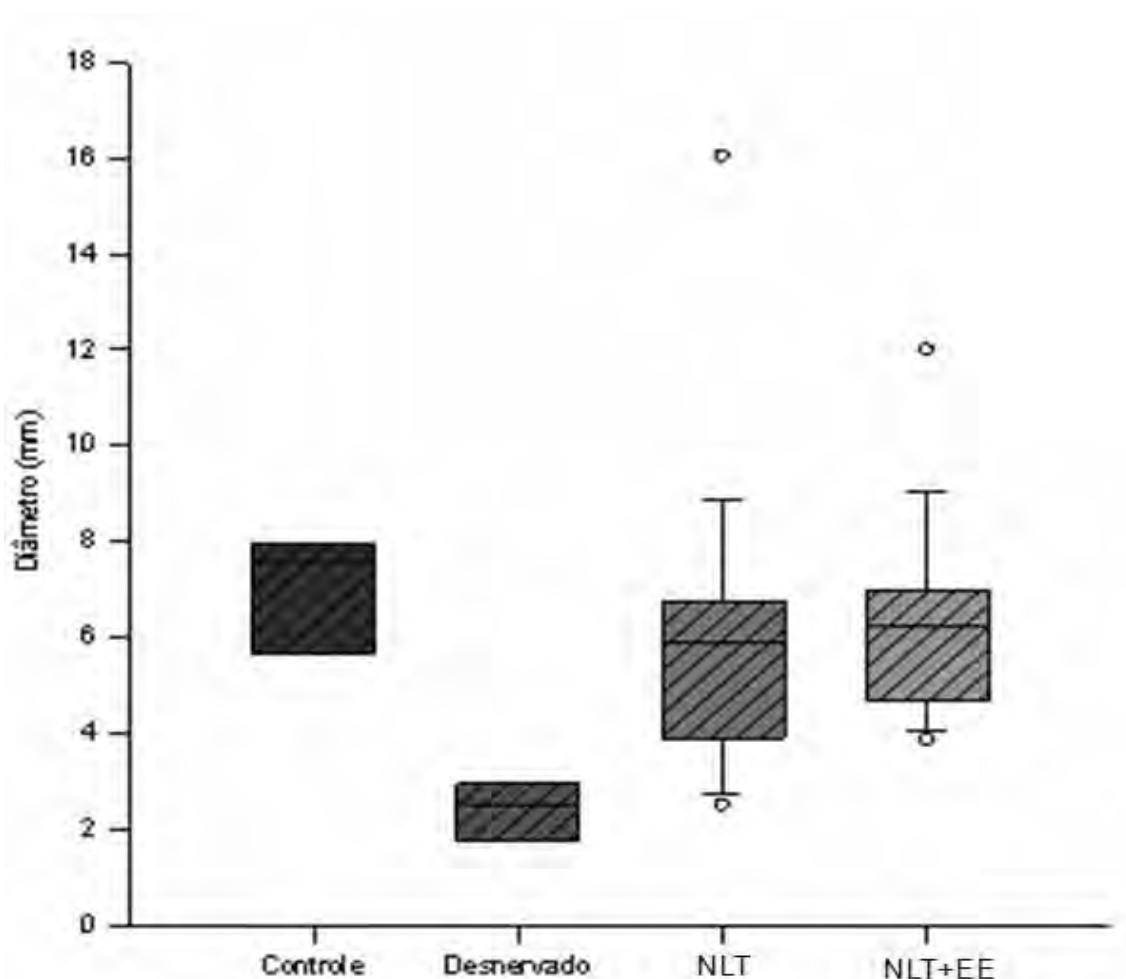


Figura 25 – Box plot para diâmetro mínimo do corte transversal do MTC experimental (mm). Kruskal-Wallis seguido pelo Método de Dunn. Desnervado < Controle = NLT = NLT+EE ($p < 0,001$).

A tabela 17 e a figura 26 representam o perímetro da fibra do músculo tibial cranial experimental. Os resultados mostraram o grupo Controle melhor que os demais grupos e o grupo NLT+EE melhor que o grupo NLT.

Tabela 17 – Mediana e intervalos interquartílicos; média e desvio padrão do perímetro da fibra do MTC experimental (μm).

	Procedimento			
	Controle	Desnervado	NLT	NLT+EE
Mediana	273,32 (228,3 / 321,7)	96,25 (76,6 / 126,6)	189,38 (144,3 / 217,8)	224,88 (201,9 / 242,3)
Média	287,99 (+/- 110,40)	103,59 (+/- 29,95)	183,28 (52,10)	221,50 (+/- 32,08)

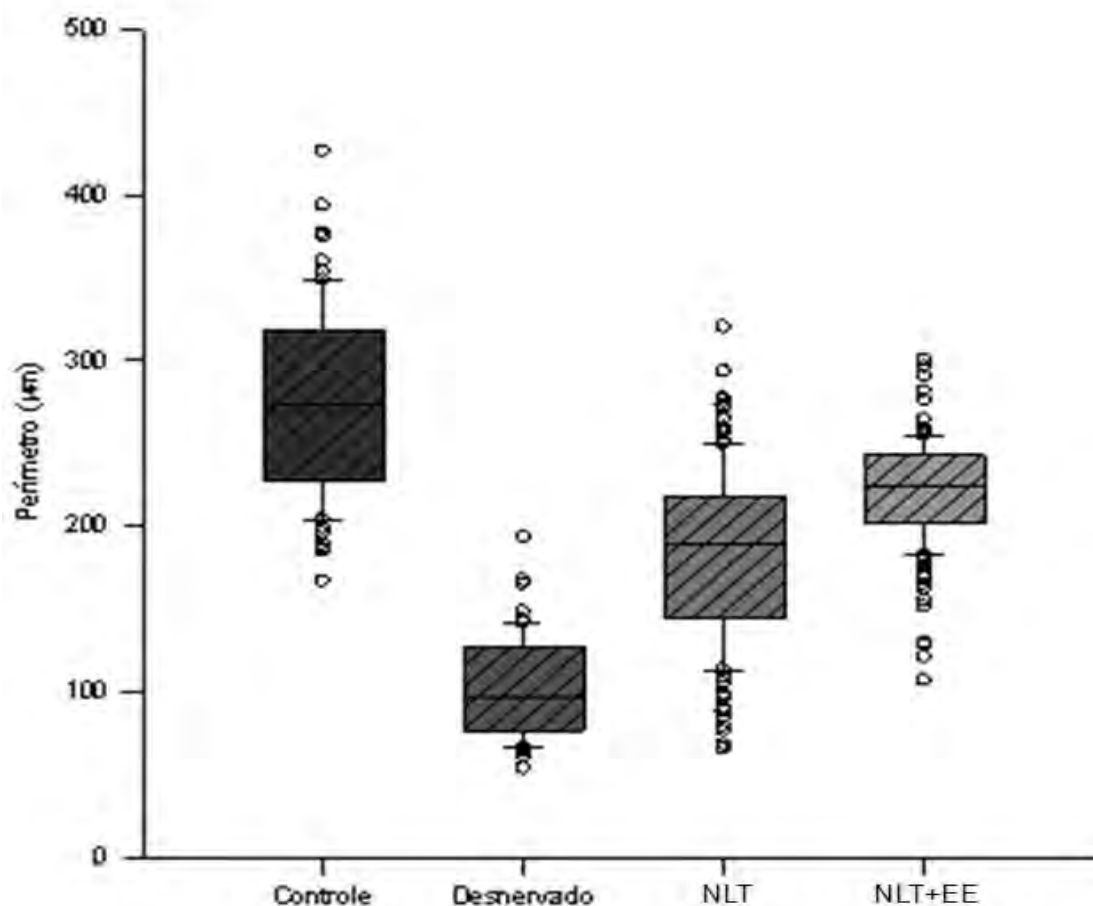


Figura 26 – *Box plot* para o perímetro da fibra do MTC experimental (μm). Kruskal-Wallis seguido pelo Método de Dunn. Controle > NLT+EE > NLT > Desnervado ($p < 0,001$).

A tabela 18 e a figura 27 representam o perímetro da fibra muscular do músculo tibial cranial experimental. Para este parâmetro, o grupo NLT+EE encontra-se superior ao grupo NLT, porém inferior ao grupo Controle.

Tabela 18 – Mediana e intervalos interquartílicos; média e desvio padrão da área da fibra do MTC experimental (μm^2).

	Procedimento			
	Controle	Desnervado	NLT	NLT+EE
Mediana	4280,27 (2894,8 / 5463,9)	562,16 (352,1 / 910)	2104,34 (1299,8 / 2748,9)	2882,81 (2437,9/3361,5)
Média	5191,33 (+/- 7601,4)	672,99 (+/- 381,8)	2129,28 (+/- 1056,6)	2901,2 (+/- 748,8)

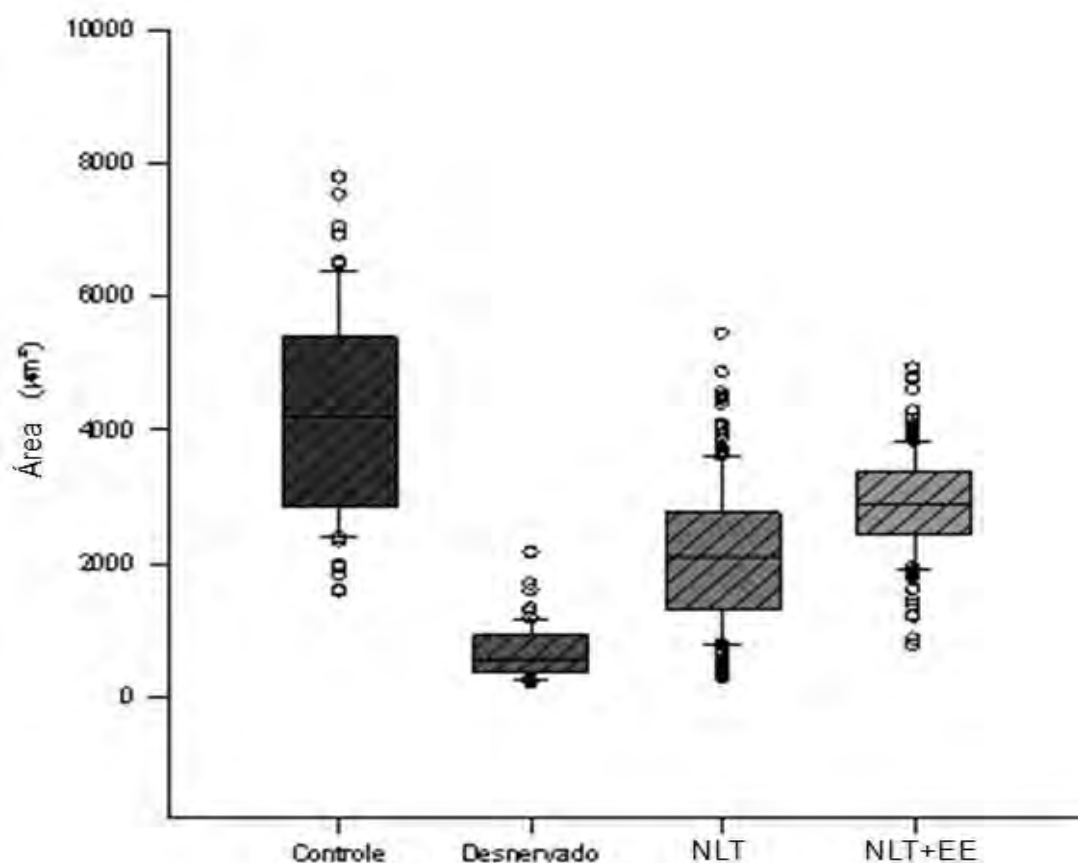


Figura 27 – *Box plot* para área da fibra do MTC experimental (μm^2). Kruskal-Wallis seguido pelo Método de Dunn. Controle > NLT+EE > NLT > Desnervado ($p < 0,001$).

A tabela 19 e a figura 28 representam o perímetro da fibra muscular do músculo tibial cranial experimental. O grupo NLT+EE foi superior ao grupo NLT, mas ainda inferior ao grupo Controle.

Tabela 19 – Mediana e intervalos interquartílicos; média e desvio padrão do diâmetro mínimo da fibra do MTC experimental (μm).

	Procedimento			
	Controle	Desnervado	NLT	NLT+EE
Mediana	58,05 (48,6 / 68,2)	21,7 (17,2 / 26,6)	41,92 (33,5 / 48,5)	49,35 (46,2 / 54,9)
Média	60,54 (+/- 23,2)	22,67 (+/- 6,3)	40,88 (+/- 11,5)	49,57 (+/- 7,6)

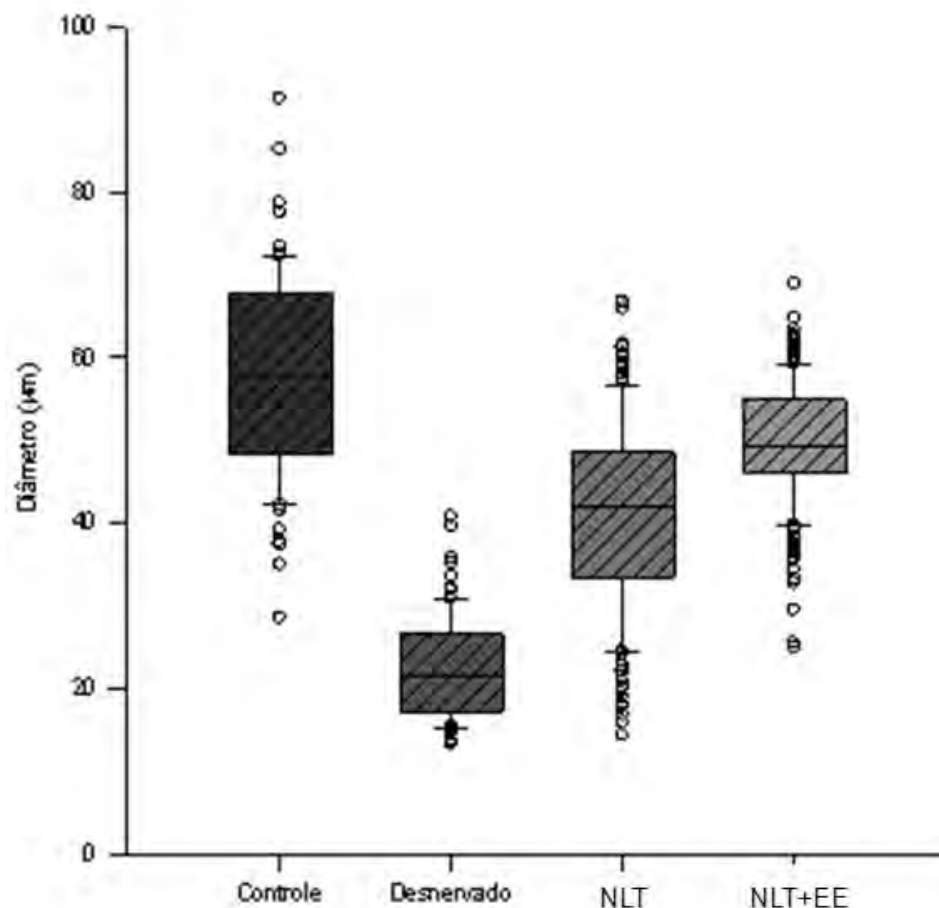


Figura 28 – Box plot para diâmetro mínimo da fibra do MTC experimental (μm). Kruskal-Wallis seguido pelo Método de Dunn. Controle > NLT+EE > NLT > Desnervado ($p < 0,001$).

4.8.2 - Análise morfométrica dos segmentos nervosos

A tabela 20 e a figura 29 representam o número de fibras nervosas do segmento N1 em cada grupo. O grupo Controle está superior aos demais e o grupo NLT+EE está apresentando um bom resultado, sendo superior ao grupo NLT.

Tabela 20 – Mediana e intervalos interquartílicos; média e desvio padrão do número de fibras nervosas do segmento N1.

	Procedimento			
	Controle	Desnervado	NLT	NLT+EE
Mediana	1469,65 (1073,9 / 1716,6)	0,0 (0,0 / 0,0)	571,1 (277,9 / 809,3)	1023,02 (820,5 / 1102,7)
Média	1397,06 (+/- 331)	0,0 (+/- 0,0)	577,67 (+/- 332,6)	952,8 (+/- 229,5)

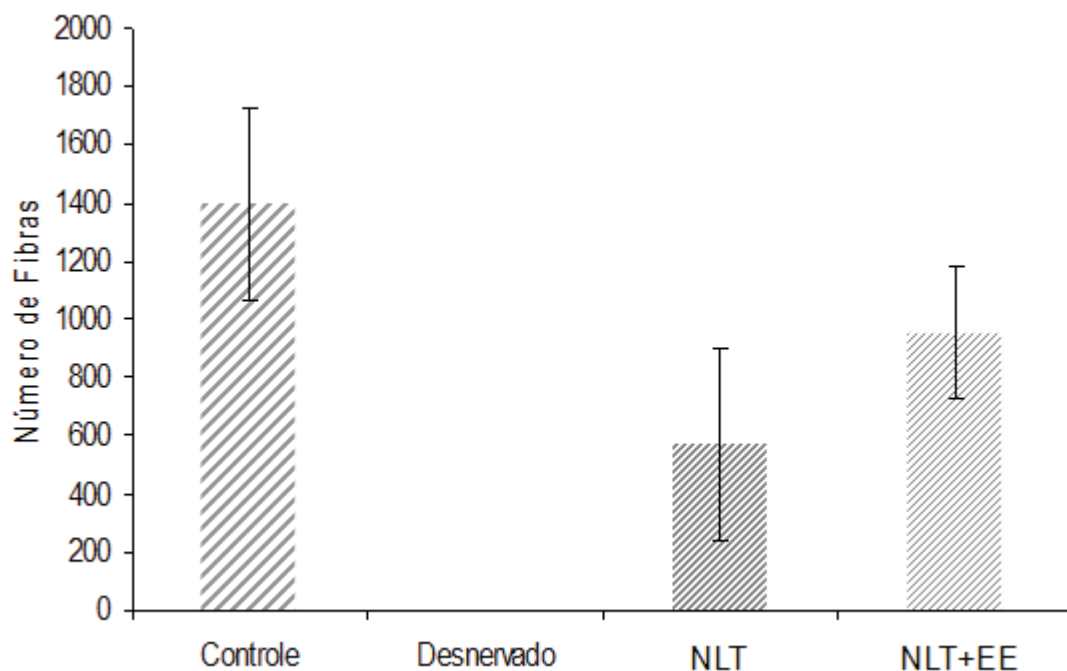


Figura 29 – Número de fibras por nervo no segmento N1. ANOVA seguido pelo Teste de Tukey. Controle > NLT+EE > NLT > Desnervado ($p < 0,001$).

A tabela 21 e a figura 30 representam a área das fibras nervosas do segmento N1 em cada grupo. O grupo Controle está superior aos demais e o grupo NLT+EE está superior ao grupo NLT, também para este parâmetro do nervo.

Tabela 21 – Mediana e intervalos interquartílicos; média e desvio padrão da área das fibras nervosas do segmento N1 (μm^2).

	Procedimento			
	Controle	Desnervado	NLT	NLT+EE
Mediana	134,46 (109,4 / 148,8)	0,0 (0,0 / 0,0)	51,59 (41,3 / 63,3)	72,36 (51,4 / 90,1)
Média	128,95 (+/- 34,8)	0,0 (+/- 0,0)	58,05 (+/- 25,1)	72,87 (+/- 26,7)

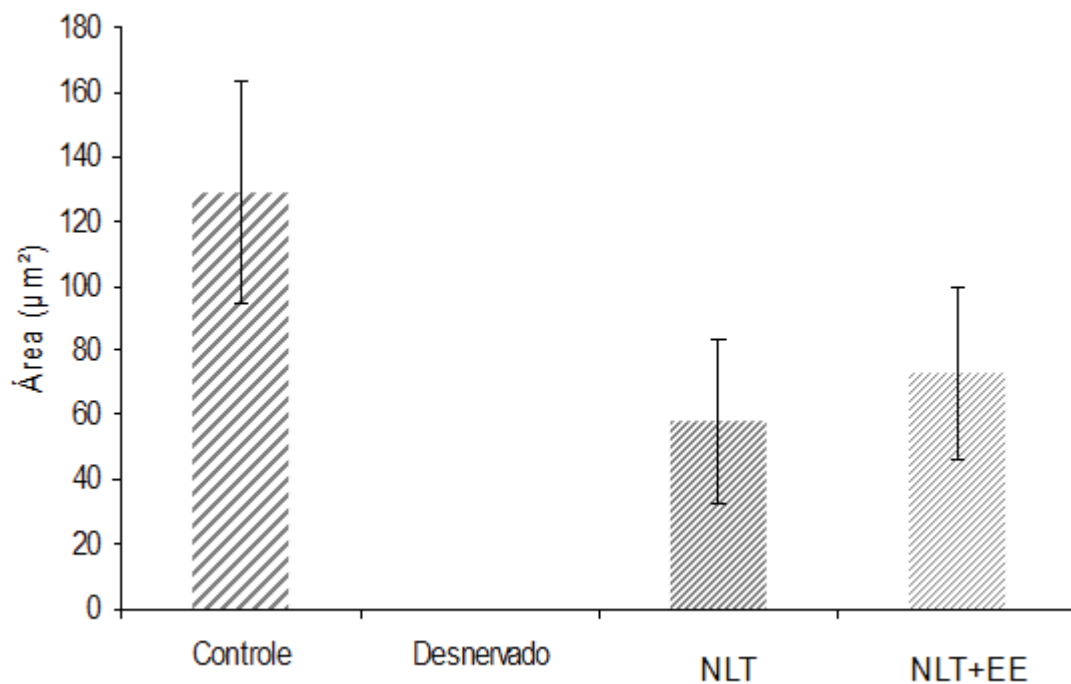


Figura 30 – Área das fibras nervosas do segmento N1 (μm^2). ANOVA seguido pelo Teste de Tukey. Controle > NLT+EE = NLT > Desnervado ($p < 0,001$).

A tabela 22 e a figura 31 representam o diâmetro mínimo das fibras nervosas do segmento N1 em cada grupo. Manteve-se o mesmo padrão de resultados apresentados nos parâmetros anteriores com grupo Controle superior aos demais e o grupo NLT+EE superior ao grupo NLT.

Tabela 22 – Mediana e intervalos interquartílicos; média e desvio padrão do diâmetro mínimo das fibras nervosas do segmento N1 (μm).

	Procedimento			
	Controle	Desnervado	NLT	NLT+EE
Mediana	10,76 (9,4 / 11,8)	0,0 (0,0 / 0,0)	6,9 (6,3 / 7,7)	8,57 (7,0 / 9,7)
Média	10,57 (+/- 1,8)	0,0 (+/- 0,0)	7,19 (+/- 1,4)	8,42 (+/- 1,6)

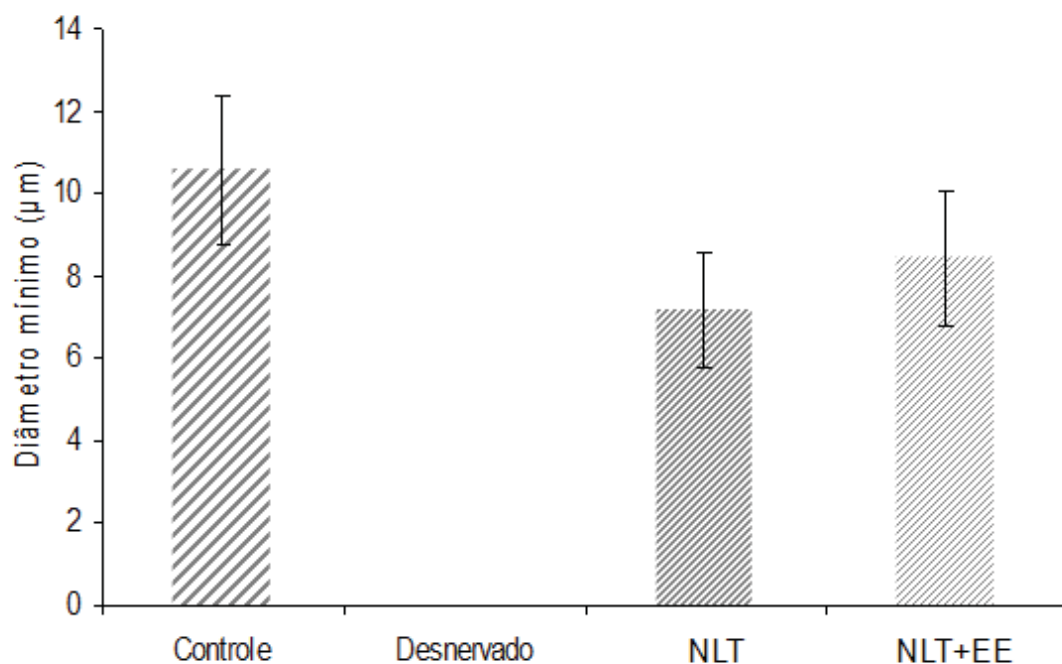


Figura 31 – Diâmetro mínimo das fibras nervosas do segmento N1 (μm). ANOVA seguido pelo Teste de Tukey. Controle > NLT+EE > NLT > Desnervado ($p < 0,001$).

A tabela 23 e a figura 32 representam a área da bainha de mielina das fibras nervosas no segmento N1 em cada grupo. O grupo NLT+EE foi superior ao grupo NLT.

Tabela 23 – Mediana e intervalos interquartílicos; média e desvio padrão da área da bainha de mielina das fibras nervosas do segmento N1 (μm^2).

	Procedimento			
	Controle	Desnervado	NLT	NLT+EE
Mediana	91,82 (78,8 / 104,8)	0,0 (0,0 / 0,0)	40,86 (32 / 45,2)	58,39 (35,5 / 67,6)
Média	91,58 (+/- 20,4)	0,0 (+/- 0,0)	41,48 (+/- 15,1)	55,48 (+/- 19,8)

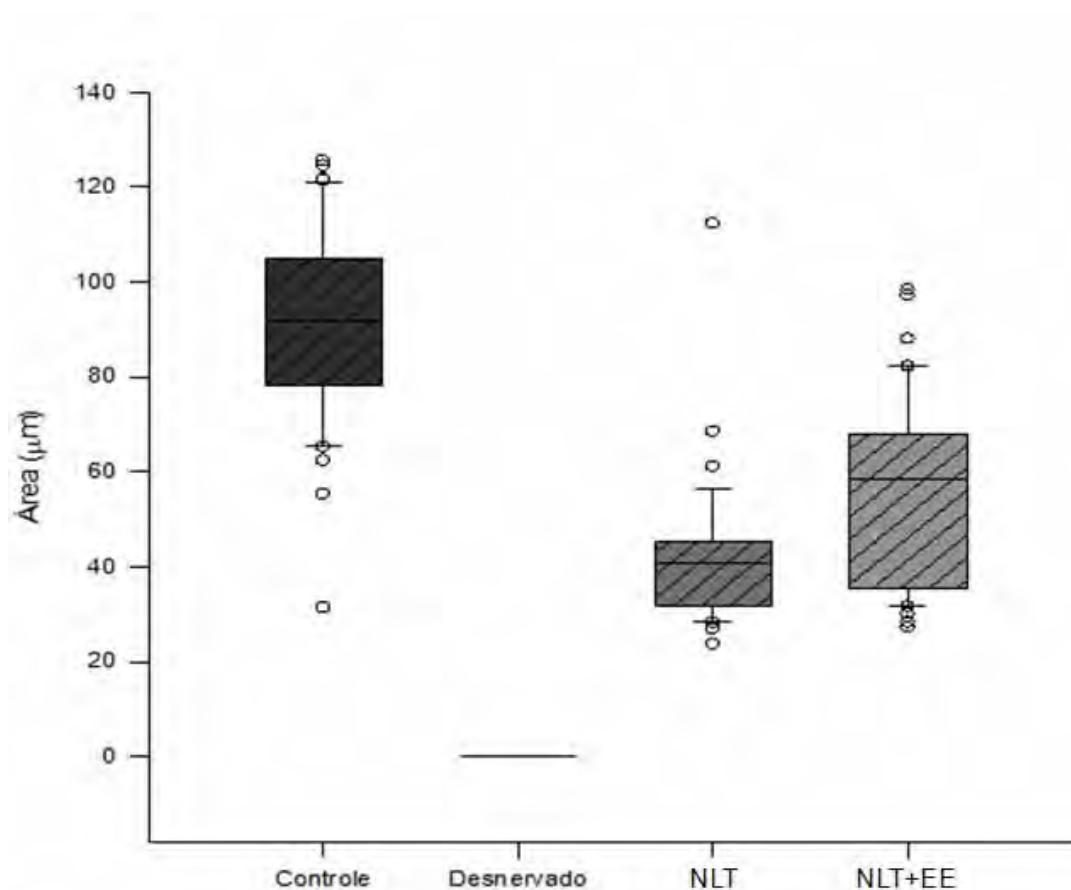


Figura 32 – Área da bainha de mielina das fibras nervosa no segmento N1 (μm^2). Kruskal-Wallis seguido pelo Método de Dunn. Controle > NLT+EE > NLT > Desnervado ($p < 0,001$).

A tabela 24 e a figura 33 representam a espessura da bainha de mielina das fibras nervosas no segmento N1 em cada grupo. Os resultados mostram o grupo NLT+EE superior ao grupo NLT.

Tabela 24 – Mediana e intervalos interquartílicos; média e desvio padrão da espessura da bainha de mielina das fibras nervosas do segmento N1 (μm).

	Procedimento			
	Controle	Desnervado	NLT	NLT+EE
Mediana	2,83 (2,5 / 3,1)	0,0 (0,0 / 0,0)	1,92 (1,8 / 2,0)	2,48 (2,1 / 2,8)
Média	2,82 (+/- 0,4)	0,0 (+/- 0,0)	1,97 (+/- 0,2)	2,52 (+/- 0,5)

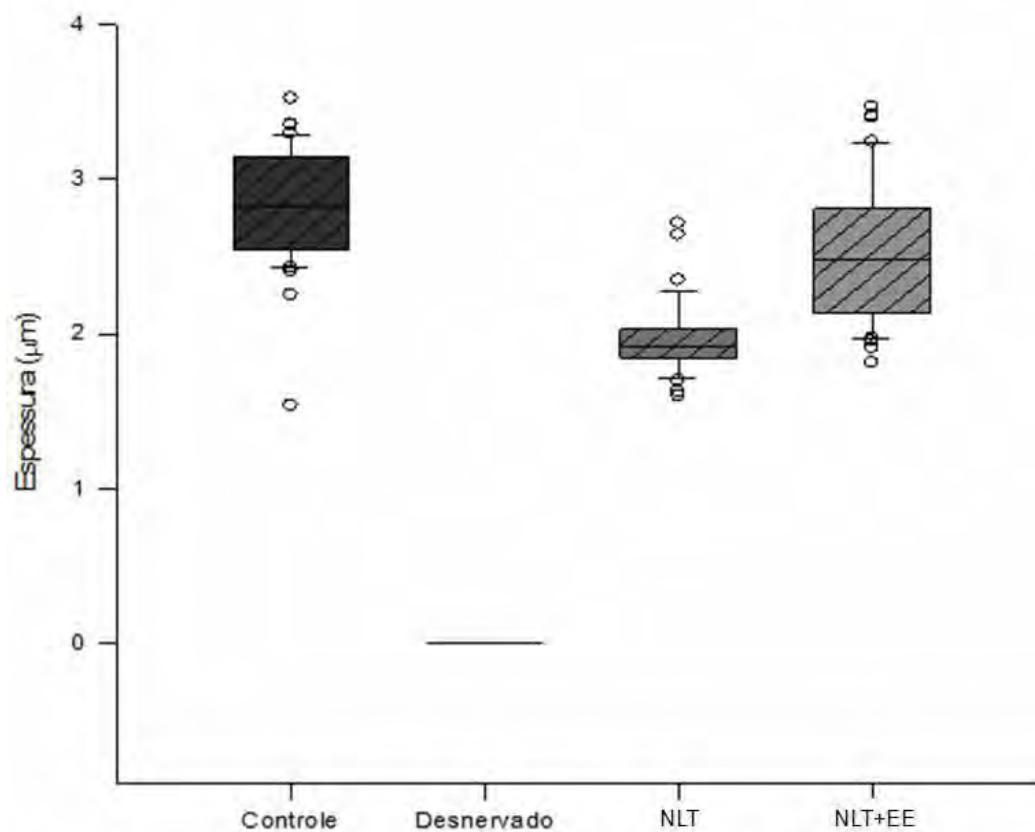


Figura 33 – Espessura da bainha de mielina das fibras nervosas do segmento N1 (μm). Kruskal-Wallis seguido pelo Método de Dunn. Controle > NLT+EE > NLT > Desnervado ($p < 0,001$).

4.9 – Morfologia dos músculos e nervos

Os músculos tibiais craniais do grupo controle apresentaram características de músculo normal com fibras poligonais, núcleos, na maioria das fibras, em posição periférica e pouco tecido conjuntivo. Os músculos tibiais craniais dos grupos NLT e NLT+EE apresentaram características semelhantes ao grupo Controle, porém algumas lâminas mostravam quantidade maior de tecido conjuntivo. Os músculos tibiais craniais do grupo Desnervado apresentaram fibras musculares com menor diâmetro e um aumento na quantidade de tecido conjuntivo, polimorfismo e desorganização, núcleos, na maioria das fibras, centralizados, demonstrando atrofia muscular (Fig. 34).

Quanto ao segmento de nervo estudado, denominado N1, observamos no grupo Controle grande quantidade de axônios, bainha de mielina espessa e bem definida. Nos grupos NLT e NLT+EE observamos menor quantidade de fibras, com bainha de mielina menos espessas e área das fibras nervosas menor em relação ao grupo Controle. Observamos também um padrão heterogêneo quanto ao tamanho das fibras nervosas nos dois grupos experimentais NLT e NLT+EE. No grupo Desnervado observamos uma grande quantidade de tecido conjuntivo sem a presença de fibras nervosas (Fig. 35).

Quanto ao segmento N2, ou seja, porção distal do coto proximal do nervo fibular, observou-se a presença de neuroma de amputação e descontinuidade da formação de brotos terminais e colaterais (Figs. 36A e 36B). No segmento N3, ou seja, corte longitudinal do ponto da neurografia, observamos brotamento nervoso ocorrendo da lateral do nervo tibial, que é o doador, para o coto distal do nervo fibular que é o receptor. O tecido nervoso observado apresenta a mesma densidade do nervo tibial no nervo fibular (Figs. 36C e 36 D).

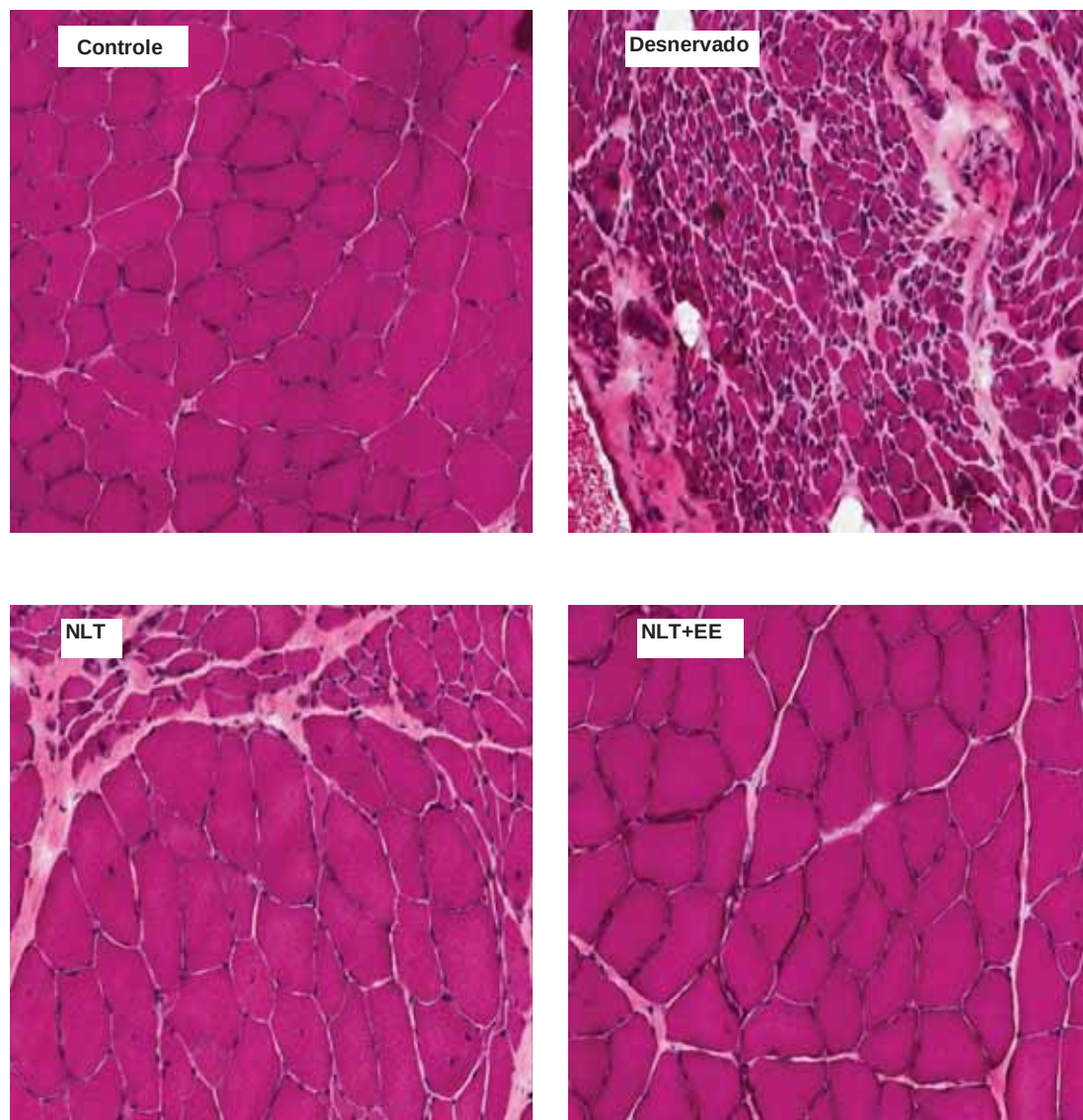


Figura 34 - Cortes transversais do MTC nos diversos grupos, mostrando a semelhança entre os grupos Controle, NLT e NLT+EE enquanto o grupo Desnervado apresenta um desarranjo das fibras com núcleos centralizados e grande quantidade de tecido conjuntivo.

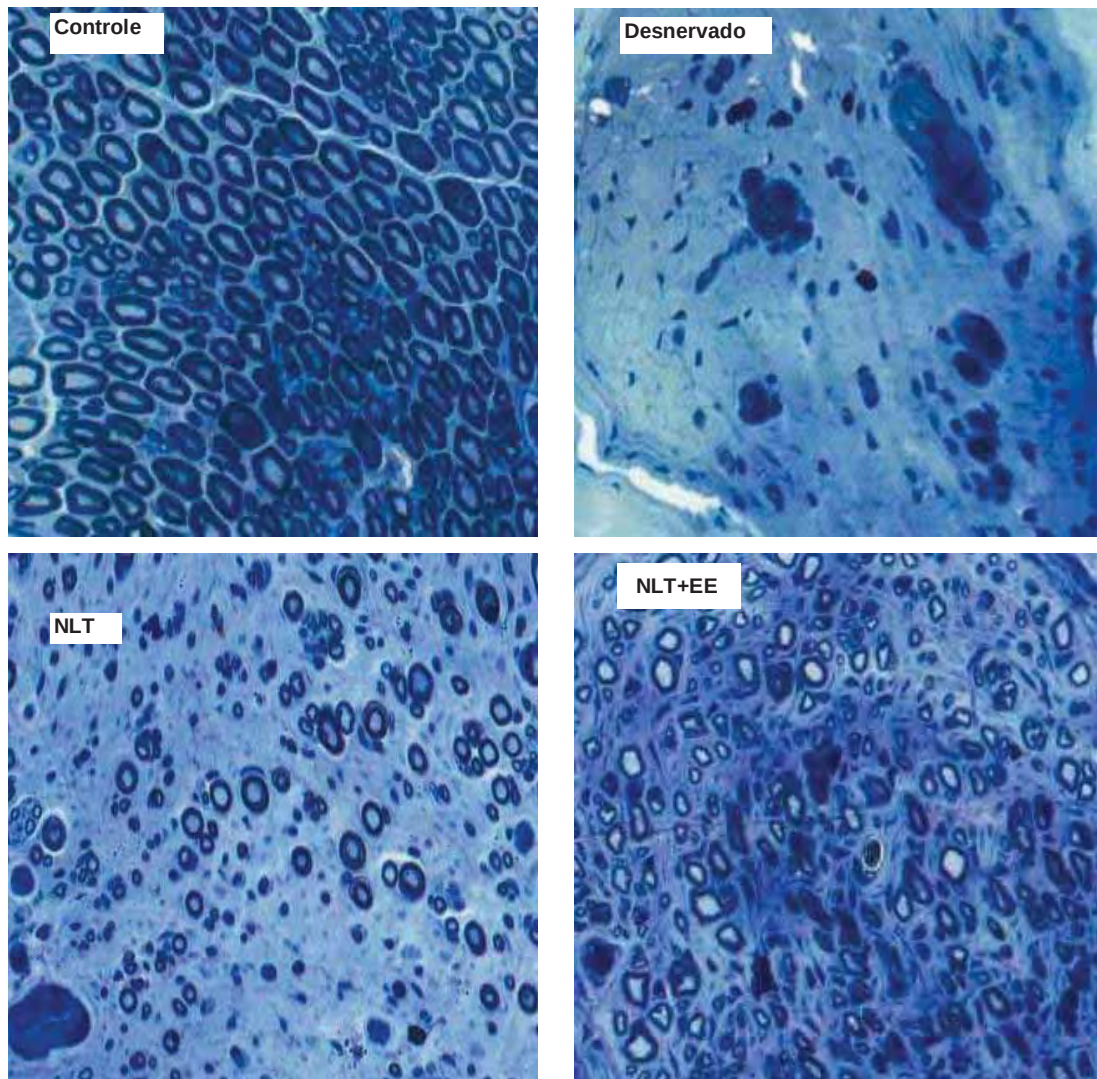


Figura 35 - Corte transversal do coto distal do nervo fibular (N1), mostrando o grupo Controle fibras nervosas bem definidas com presença de bainha de mielina, os grupos NLT e NLT+EE apresentam aparências semelhantes e o grupo Desnervado sem presença de fibras nervosas e grande quantidade de tecido conjuntivo.

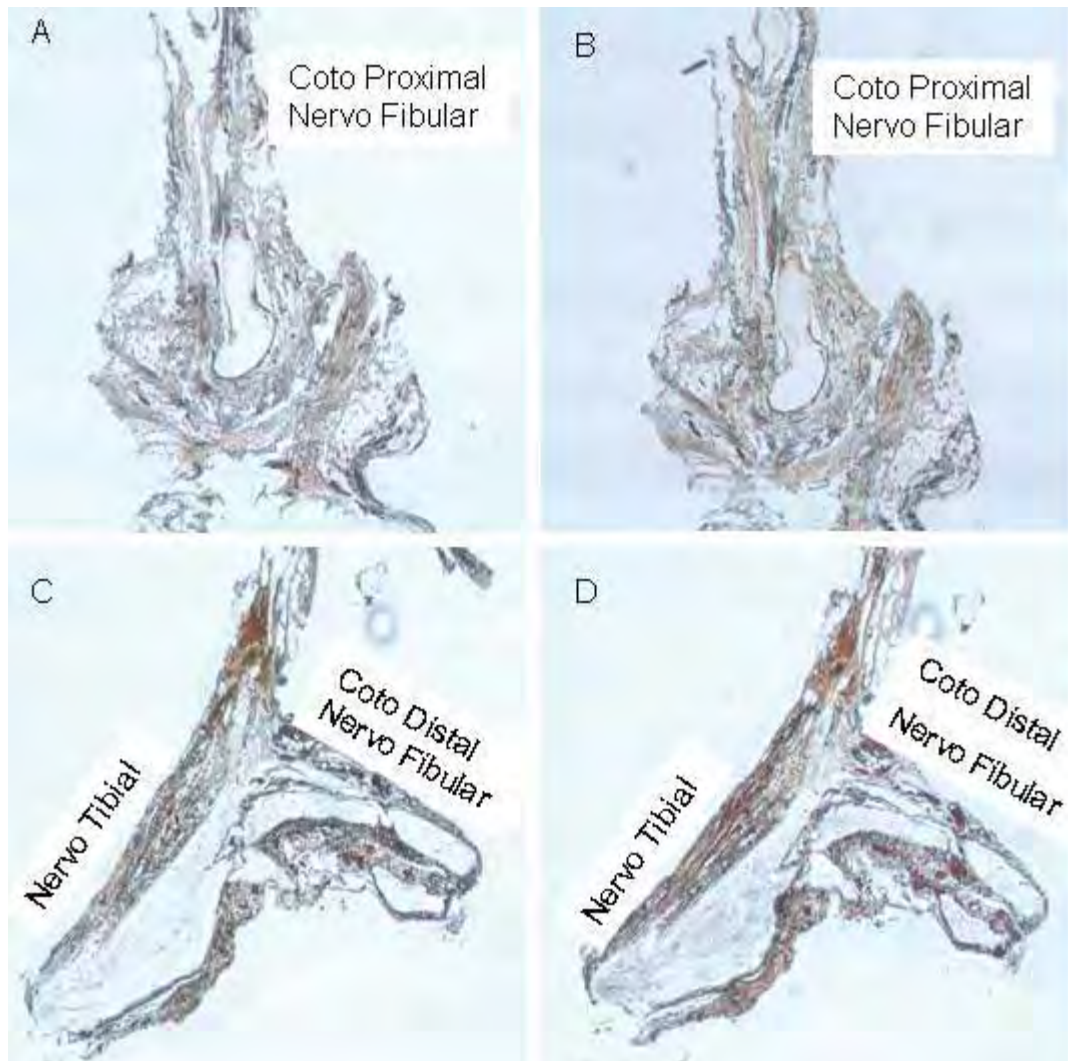


Figura 36 – **A e B:** Corte longitudinal do coto proximal do nervo fibular (N2) mostrando o neuroma de amputação. **C e D:** Corte longitudinal da neurorrafia látero-terminal entre o coto distal do nervo fibular com a face lateral do nervo tibial (N3) mostrando o brotamento nervoso do nervo tibial para o nervo fibular.

Durante o experimento tivemos perda de alguns animais por falência respiratória durante a anestesia para realizar a perimetria. No quadro 1 observa-se quais animais e com quantos dias de pós-operatório eles morreram.

Quadro 1: Indicação dos animais e dia em que morreram.

<i>Animal</i>	<i>Grupo</i>	<i>Dia da morte</i>
1	Controle	135
2	Controle	90
12	Desnervado	135
16	Desnervado	90
26	NLT	180
40	NLT	135
45	NLT+EE	45
47	NLT+EE	90
48	NLT+EE	90

Tabela 25 – Visão geral das médias e desvios padrões dos resultados obtidos. IMM = Índice de Massa Muscular; IFF 180 = Índice Funcional do Fibular aos 180 dias; P 180 = Perimetria aos 180 dias; LAT = Latência; AMP = Amplitude; FM 100 = Força Muscular 100 Hz; AFM = Área da Fibra Muscular; DMFM = Diâmetro Mínimo da Fibra Muscular; NFN = Número de Fibras Nervosas; AFN = Área da Fibra Nervosa; DMFN = Diâmetro Mínimo da Fibra Nervosa; ABM = Área da Bainha de Mielina; EBM = Espessura da Bainha de Mielina.

	IMM	IFF 180	LAT	AMP	FM 100	PFM	AFM	DMFM	NFN	AFN	DMFN	ABM	EBM
Controle	0,188 ± 0,017	-20,5 ± 10,8	2,03 ± 0,69	17,23 ± 12,49	0,850 ± 0,17	287,99 ± 110,4	5191,33 ± 7601,4	60,54 ± 23,2	1397,06 ± 331	128,95 ± 34,8	10,57 ± 1,8	91,58 ± 20,4	2,82 ± 0,4
Desnervado	0,036 ± 0,009	-130,2 ± 18,4	-----	-----	0,307 ± 0,06	103,59 ± 29,95	672,99 ± 381,8	22,67 ± 6,3	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
NLT	0,098 ± 0,041	-82,1 ± 49,3	2,16 ± 0,93	7,85 ± 5,72	0,777 ± 0,24	183,28 ± 52,1	2129,28 ± 1056,6	40,88 ± 11,5	577,67 ± 332,6	58,05 ± 25,1	7,19 ± 1,4	41,48 ± 15,1	1,97 ± 0,2
NLT+EE	0,131 ± 0,035	-55,2 ± 43,6	2,08 ± 0,67	11,24 ± 8,6	0,939 ± 0,2	221,50 ± 32,08	2901,2 ± 748,8	49,57 ± 7,6	952,8 ± 229,5	72,87 ± 26,7	8,42 ± 1,6	55,48 ± 19,8	2,52 ± 0,5

5. Discussão

Toda a parte experimental e de coleta deste estudo foi realizada no Laboratório de Cirurgia Experimental do Departamento de Cirurgia e Ortopedia, e a parte de preparo histológico foi realizada no Laboratório de Urologia, ambos da Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP. Estes dois laboratórios juntos apresentam todas as condições estruturais e técnicas para a realização de pesquisas experimentais na nossa linha de estudo.

Neste trabalho, foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Wistar do sexo masculino por serem de fácil obtenção, manipulação e manutenção. Estes animais ocupam pouco espaço, facilitando estudos de longa duração (Ellis & McCaffrey, 1984), além de representarem a espécie mais utilizada na literatura (Pereira *et al.*, 1998).

Ratos do sexo masculino estão menos suscetíveis à ação dos hormônios adenohipofisários e hormônios gonadais, como o estrógeno e a progesterona (Lincoln, 1980; Carandente *et al.*, 1989). Estes hormônios podem exercer efeitos neurotróficos e influenciar no brotamento de axônios sensoriais mielínicos, além de serem mais fáceis de adquirir, pois não servem como matriz de reprodução.

O modelo experimental utilizado foi o “nervos tibial-fibular e músculo tibial cranial” do nervo isquiático introduzido por Viterbo *et al.* (1992). Segundo estes autores este modelo apresenta duas vantagens: músculo tibial cranial é innervado exclusivamente pelo nervo fibular e sua localização superficial possibilita o acompanhamento clínico da reinervação.

Alguns autores usam um modelo experimental envolvendo o membro torácico de ratos no estudo da NLT. Estes modelos envolvem, principalmente, os nervos mediano, ulnar e musculocutâneo (Bertelli *et al.*, 1996; Lutz *et al.*, 2000a; Lutz *et al.* 2000b; Papalia *et al.*, 2003; Liao *et al.*, 2009).

Também existem modelos experimentais com outros animais. Myckatyn *et al.* (2004) utilizaram camundongos transgênicos. Jaber *et al.* (2003) utilizaram coelhos, seguindo o mesmo modelo do tibial e fibular utilizado em ratos. Sundine *et al.* (2003) avaliaram a reinervação do músculo orbicular dos olhos em cães. Mennen (1998) utilizou a NLT em primatas, assim como Schmidhammer *et al.* (2007).

Os animais foram sacrificados após 180 dias de tratamento. Acreditamos ser esse prazo suficiente para ocorrer brotamento e amadurecimento axonal, assim

como a chegada dos axônios à placa motora, provocando a reinervação das fibras musculares e consequente recuperação funcional do músculo.

Gigo-Benato *et al.* (2010), observaram durante 14 dias a recuperação funcional de ratos após lesão por esmagamento do nervo ciático e concluíram que a EE foi prejudicial à recuperação do músculo e nervo após a lesão, porém devemos indagar se 14 dias de recuperação seriam suficientes para que a reinervação muscular ocorra, mesmo em modelo de esmagamento nervoso e não secção total do nervo. Acreditamos que seja necessário um tempo maior para que possamos chegar a conclusões mais concretas quanto à reinervação do músculo.

Russo *et al.* (2008) observaram regulação da expressão gênica MMP-2 em músculos esqueléticos desnervados e concluíram que a EE pode ser útil na elaboração de novas estratégias terapêuticas para a reabilitação em pacientes com denervação do músculo. Porém estes autores observaram 28 dias após desnervação muscular e não realizaram testes funcionais.

Muitos estudos que utilizam estimulação elétrica no músculo desnervado não observaram evolução funcional dos animais com observação entre 7 e 52 dias, e as avaliações foram apenas histológicas (Durigan *et al.*, 2006; Caierão *et al.*, 2008; Carvalho *et al.*, 2009; Polônio, 2010; Teodori *et al.*, 2011). Esses trabalhos, por serem de curto tempo de observação, realizaram a estimulação elétrica com os animais anestesiados. Como nosso tempo de estimulação foi longo e, por este motivo, os ratos passariam por muitas sessões de EE, achamos arriscado anestesiá-los os animais para isto todas às vezes. Optamos por estimular os animais acordados. Para tal, desenvolvemos um método de estimulação que envolve a imobilização dos animais em uma cápsula metálica (Figs. 6 e 7). Esta cápsula prende o membro pélvico do animal na região inguinal de forma anatômica sem provocar lesão ou sofrimento.

A estimulação elétrica utilizada durante este estudo não provocou dor ou sofrimento, pois os níveis de estimulação foram ajustados para que permanecessem dentro do limiar motor e não alcançassem o limiar doloroso (Robinson & Snyder-Mackler, 2001; Low & Reed, 2001; Nelson *et al.*, 2003). Previamente foram realizados dois estudos pilotos para determinar estes parâmetros (Anexos 2 e 3).

A corrente de estimulação foi determinada baseada em parâmetros criteriosamente pré-estabelecidos. Conforme Ward (2009), a corrente de média frequência com curta duração, entre 2 a 4 ms, são ideais para produzir fortalecimento muscular. A frequência foi determinada de acordo com o tipo de fibra muscular predominante no músculo tibial cranial. Como este músculo apresenta mistura homogênea de fibras tônicas e fásicas, realizamos projeto piloto (anexo 3) comparando frequências adequadas para músculos tônicos e correntes adequadas para músculos fásicos e, com isso, determinamos a utilização de 10 Hz de modulação da frequência.

A intensidade da corrente também foi determinada por projeto piloto (anexo 2), pois encontramos trabalhos que utilizam de 1 mA a 5 mA de intensidade, porém, estes trabalhos estimulam os ratos anestesiados ou com eletrodos implantados. Estes fatores podem causar alteração na condutibilidade da corrente no corpo do animal. (Dow *et al.*, 2004; Durigan *et al.*, 2006; Carvalho *et al.*, 2009; Polônio *et al.*, 2010; Teodori *et al.*, 2011). Realizamos estudo prévio onde investigamos o nível de corrente elétrica necessária para provocar contração do MTC do rato sem anestesia. Os ratos receberam corrente elétrica no MTC após passarem por NLT. A dose da corrente foi aumentada até que a primeira contração muscular fosse observada. Após a coleta dos dados e tratamento estatístico pudemos determinar que 8 mA fossem suficientes para a EE do MTC de ratos após NLT sem anestesia. Por este motivo optamos por utilizar esta intensidade no presente trabalho.

A NLT foi realizada sem retirada de epineuro, pois as fibras regeneradas após a NLT têm a capacidade de absorver e transpor o endoneuro, perineuro e epineuro em nervos finos, com diâmetro inferior a 1,5 mm (Viterbo *et al.*, 1992; Viterbo *et al.*, 1994 a, b; Lundborg *et al.*, 1994; Zhao *et al.*, 1997; Viterbo *et al.*, 1998). Em nervos mais espessos, é recomendado que a janela epiperineural seja realizada. (Viterbo *et al.*, 1998).

O número de 20 ratos em cada grupo com NLT nos pareceu adequado quando delineamos o trabalho. Já o número de 10 ratos nos grupos controles e desnervado também nos pareceu adequado, uma vez que estes dois grupos apresentam resultados mais homogêneos (Viterbo *et al.*, 1992; Franco, 2010). Na literatura, esse número é muito variável, de 5 a 40 animais (McCallister *et al.*, 1999; Caierão *et al.*, 2008; Goheen-Robillard *et al.*, 2002; De Sá *et al.*, 2004).

Para análise estatística, na maioria dos parâmetros foi utilizada mediana e seus intervalos, porém para facilitar o entendimento daqueles que estão mais habituados com média e desvio padrão, resolveu-se colocar ambas as medidas.

5.1. Massa corporal e massa do MTC

A massa inicial dos animais estudados não demonstrou diferença entre os grupos, mostrando que houve homogeneidade na amostra ao iniciarmos o experimento. Contudo, a massa final não apresentou o mesmo resultado. Por esse motivo, ao invés de analisarmos a massa do MTC diretamente, utilizamos o índice da Massa Muscular (IMM), que foi calculada dividindo a massa do MTC pela massa corporal final de cada animal e multiplicada por 100. É esperado que um animal de maior massa corporal também apresente maior massa muscular, por isso utilizando este índice, equivalemos os grupos (Vieira & Hossne, 2001).

O IMM mostrou que, apesar dos grupos NLT e NLT+EE serem estatisticamente iguais, o grupo NLT+EE ficou igual ao Controle, enquanto o grupo NLT se igualou ao grupo Desnervado.

A tabela 4 e a figura 19 mostraram que a massa muscular no grupo controle, como era esperado, não apresentou diferença quando comparados os lados experimental e normal. Nos demais grupos, o lado normal sempre foi maior que o lado experimental, porém a diminuição da massa muscular no grupo NLT+EE (26,12 %) foi menor que no grupo NLT (37,23 %). Esses dados se tornam importante quando salientamos que um músculo com 10% a mais de massa muscular, em termos práticos, apresenta maior capacidade de produzir força (Neto, 2007).

5.2. Teste de Avaliação da Marcha com Índice Funcional do Fibular (IFF)

O teste da marcha analisa o modo de andar do animal através do cálculo da expressão, como porcentagem, de perda da função do membro tratado em relação ao contralateral. O teste de marcha foi desenvolvido por De Medinaceli *et al.* (1982) através do Índice Funcional do Isquiático (IFI) que avalia a função relacionada ao

nervo isquiático, porém foi aperfeiçoado por Bain *et al.* (1989), que desenvolveu métodos específicos para o nervo tibial (Índice Funcional do Tibial – IFT) e para o nervo fibular (Índice Funcional do Fibular - IFF). Como nosso modelo experimental envolve especificamente o nervo fibular, usamos o IFF de Bain *et al.* (1989). Nosso grupo desenvolveu um trabalho, ainda não publicado, que demonstra maior precisão do IFF, para nosso modelo experimental, em relação ao IFI. Estes testes funcionais da caminhada são de baixo custo e fácil aplicação, permitindo acompanhar a evolução clínica dos ratos. Além disto, revelam a função muscular e plasticidade cerebral, resultado final desejado em qualquer reconstrução de nervo periférico. Por isto estes testes vêm sendo utilizados por inúmeros autores (Carlton & Goldeberg, 1986; Dellon & Mackinnon, 1989; Dellon & Dellon, 1991; Bervar, 2000; Monte-Raso *et al.*, 2008; Andraus *et al.*, 2010;).

Aos 30 dias, os ratos do grupo Controle se diferenciavam de todos os ratos dos demais grupos, apresentando os melhores índices de caminhada. Após 150 dias, somente os ratos submetidos à neurorrafia com estimulação elétrica atingiram índices semelhantes aos índices dos ratos do grupo Controle.

Além disso, os ratos submetidos à neurorrafia com estimulação elétrica foram os que mais evoluíram em relação à marcha, com melhora de 60,5%.

A mediana do IFF em ratos submetidos à neurorrafia melhorou após 6 meses. Porém, a melhora do IFF, em ratos que receberam eletroestimulação, foi maior.

Observamos que, no grupo NLT+EE, o IFF manteve-se em bom nível até os últimos 30 dias de tratamento, quando obteve a melhora significativa. Este fato pode ter ocorrido porque, após a ocorrência da reinervação muscular, a estimulação elétrica deixa de ser um agente preventivo de atrofia e passa a ser um treinamento muscular, podendo agir diretamente na melhora funcional deste músculo, pois está comprovado que a EE em músculos sadios é benéfica à sua atividade (Ward & Shukuratova, 2002).

Com 180 dias de pós-operatório, observou-se piora em relação aos 150 dias do grupo Controle e também do grupo NLT e o contrário foi observado no grupo NLT+EE, ou seja, melhora aos 180 dias em relação aos 150 dias de pós-operatório. Uma possível explicação para este fato seria a atrofia causada pela senilidade. A EE talvez estivesse determinando hipertrofia muscular. Esta observação corrobora os achados de Takano *et al.* (2010) sobre aumento da força e da massa muscular em idosos após EE combinada com contração voluntária.

5.3. Perimetria

A perimetria é um método de baixo custo que nos permite o acompanhamento da evolução do músculo operado sem a necessidade de sacrificar o animal. Este método de avaliação muscular é amplamente utilizado em humanos e nos fornece informações indiretas sobre o trofismo e a força do músculo. Porém não é utilizada em trabalhos experimentais. No presente estudo este atributo não foi muito sensível, talvez por inexperiência já que foi a primeira vez a ser utilizada em nosso grupo. Nos próximos trabalhos continuaremos a realizar esta medida e certamente chegaremos a resultados mais sensíveis.

5.4. Teste Eletrofisiológico

Os animais do grupo desnervado não apresentaram resposta muscular ao estímulo elétrico, justamente por não apresentarem a conexão entre o nervo e o músculo, por este motivo, os valores de latência tenderam ao infinito e os valores de amplitude, ao infinito negativo, sendo retirados da análise estatística.

O teste eletrofisiológico nos fornece dados de latência e amplitude. A latência traduz-se na condução nervosa, ou seja, o número de fibras mielinizadas. Já a amplitude nos informa o número de fibras musculares que respondem ao estímulo elétrico e, conseqüentemente, ao número de axônios excitáveis (Robinson & Snyder-Mackler, 2001).

O teste foi realizado, no primeiro momento, com o nervo tibial intacto e, no segundo momento, seccionamos o nervo tibial distalmente à NLT e repetimos o teste com a finalidade de eliminarmos possível interferência deste nervo na condução do impulso ao músculo. A frequência, duração e intensidade do estímulo foram constantes para que a única variável fosse relativa ao grupo experimental.

O teste eletrofisiológico não demonstrou diferença entre os grupos Controle, NLT e NLT+EE em nenhum momento em relação à latência ou amplitude. Isto pode significar que os grupos que passaram pela NLT conseguiram resultados positivos e se equivar ao grupo Controle, ou que este teste não foi suficientemente sensível.

5.5. Teste de Força Máxima do MTC

O teste de força máxima foi elaborado seguindo os padrões de Isaacs *et al.* (2005), com as adaptações necessárias para cumprir o objetivo do nosso modelo experimental. Isaacs *et al.* (2005), realizaram o estímulo elétrico, durante o teste de força, no nervo e não no músculo, como foi realizado em nosso estudo, porque queriam comprovar a passagem do estímulo pela NTL, pois não realizaram estudos eletrofisiológicos específicos da condução nervosa. Além disso, a força muscular medida por Isaacs *et al.* (2005) não foi a força máxima e sim uma porcentagem do lado operado em relação ao lado controle do animal.

Marcos (2002) e Hala (2003) também realizaram o estímulo elétrico no nervo e não no músculo do animal, porém seus objetivos também eram diferentes do nosso. Estes autores estimularam o nervo fibular intacto para provocar contração do MTC de ratos e verificar o processo de fadiga muscular.

Optamos por estimular o músculo diretamente porque assim poderíamos alcançar a força de contração máxima do MTC dos animais. Também é importante ressaltar que se tentássemos realizar o estímulo elétrico, durante o teste de força máxima de contração do MTC, no nervo, não seria possível captar as contrações dos músculos dos ratos do grupo Desnervado e isso impediria uma comparação na qualidade da contração entre todos os grupos. Em trabalhos futuros pretendemos realizar as duas opções de estimulação, ou seja, no nervo e no músculo.

Utilizando uma frequência de 10 Hz, o teste de força mostrou uma inferioridade do grupo Desnervado em relação aos demais grupos que se igualaram, porém, quando estes músculos foram exigidos com 100 Hz, frequência que provoca contração tetânica, o grupo NLT+EE se destacou apresentando força maior que os demais e sendo estatisticamente superior ao grupo NLT. Este achado corrobora com Rutherford & Jones (1986) que sugerem que parte do efeito do treinamento realizado por EE pode estar na facilitação neural em função de um número maior de unidades motoras ativas e aumento na taxa de impulsos ou um padrão mais eficiente de recrutamento, provavelmente devido a uma modificação do mecanismo de gradação de força, propiciando melhora da somação de estímulos nervosos. Em termos práticos, o músculo treinado com EE aprende a contrair com mais eficiência.

5.6 Análise do músculo tibial cranial

O MTC foi corado por HE, pois esta coloração evidencia bem a fibra muscular, permitindo as análises morfométricas desejadas. Além disso, é um método de baixo custo.

É importante destacar que a medida de diâmetro mínimo é mais confiável que a medida de área ou de diâmetro máximo, pois esse não sofre alteração da inclinação da navalha durante o corte histológico, conforme ressaltado por Romão *et al.* (2007) e descrito por De Sá *et al.* (2004).

Ao analisarmos os parâmetros de área, perímetro e diâmetro mínimo do corte transversal do músculo, observamos uma equivalência entre os grupos Controle, NLT e NLT+EE, e uma superioridade de todos em relação ao grupo Desnervado.

Porém, quando observamos perímetro da fibra muscular, área da fibra muscular e diâmetro mínimo da fibra muscular, observamos uma constante que mostra o grupo Controle superior aos demais, e o grupo NLT+EE sempre superior aos grupos NLT e Desnervado.

Este fato demonstra que o treinamento por EE foi positivo para o MTC após a NTL, pois existe uma relação direta entre a secção transversal da fibra muscular com a força que esse músculo pode produzir (Neto, 2007).

5.7 Análise dos nervos

Em relação à área das fibras nervosas, este foi o único parâmetro em que o grupo NLT se igualou ao grupo NLT+EE. Nos demais atributos relativos ao segmento distal do nervo fibular, o grupo NLT+EE sempre foi superior ao grupo NLT.

Os resultados encontrados nesta pesquisa em relação ao segmento nervoso N1 sugerem que houve uma aceleração da regeneração do nervo. Este fato também foi observado por Teodori *et al.* (2011) e Tagami *et al.* (2009).

Ahlborn *et al.* (2007) observaram, além da melhora funcional, os efeitos positivos sobre os motoneurônios e axônios regenerados indicando a EE

como potencial abordagem clinicamente viável para a melhoria do reparo de nervos periféricos.

O possível efeito da EE sobre o nervo em o muito controvertido, por este motivo este trabalho foi muito interessante, pois demonstrou que a EE pode afetar o de maneira positiva o nervo periférico durante sua regeneração(Al-Majed *et al.*, 2004).

Analisando de modo geral a todos os atributos e principalmente os mais sensíveis como diâmetro mínimo das fibras musculares e nervosas, teste funcional da marcha, força de contração e perimetria do músculo. Observamos que o grupo NLT+EE foi realmente melhor que o grupo NLT e por este motivo, a EE, a partir deste trabalho, poderia ser sugerida como tratamento associado após todos os reparos de nervos periféricos. Mantendo sempre o cuidado de desenvolver e selecionar os parâmetros de EE mais adequados para cada tipo de músculo.

Com isso seria necessário o desenvolvimento de aparelhos de EE mais específicos e sempre simplificando sua utilização para que o próprio paciente possa manejar corretamente e em qualquer lugar. Possibilitando que um paciente com paralisia facial tenha um aparelho com a corrente elétrica correta de forma portátil da mesma maneira que possibilitaria a um paciente com lesão de plexo braquial a utilizar sua corrente sem a necessidade de ter os conhecimentos de um profissional da área toda vez que ligar seu estimulador.

Este estudo nos permitiu verificar o efeito positivo que a EE apresentou durante a regeneração do nervo periférico após NLT. Também mostrou que a EE foi eficiente na manutenção da função do MTC de ratos até que uma nova inervação ocorresse.

6. Conclusão

Com base em nosso modelo experimental, pudemos concluir que a estimulação elétrica foi eficiente na recuperação funcional do músculo e do nervo, pós-neurorrafia látero-terminal.

7. Referências Bibliográficas

- Ahlborn P, Schachner M, Irintchev A. One hour electrical stimulation accelerates functional recovery after femoral nerve repair. *Exp Neurol*. 2007; 208(1):137-44. Epub 2007 Aug 23.
- Al-Majed AA, Tam SL, Gordon T. Electrical stimulation accelerates and enhances expression of regeneration-associated genes in regenerating rat femoral motoneurons. *Cell Mol Neurobiol*. 2004 Jun;24(3):379-402.
- Al-Qattan MM, Al-Thunyan A. Variables affecting axonal regeneration following end-to-side neurorrhaphy. *Br J Plast Surg*. 1998; 51(3):238-42.
- Andraus RAC, Barbieri CH, Mazzer N. A irradiação local com laser de baixa potência acelera a regeneração do nervo fibular de ratos. *Acta Ortop Bras*. 2010; 18(3):152-7.
- Babcock WW. A standard technique for operations on peripheral nerves with especial reference to the closure of large gaps. *Surg Gynecol Obstet*. 1927; 45:364-78.
- Bain JR, Mackinnon SE, Hunter DA. Functional evaluation of complete sciatic, peroneal, and posterior tibial nerve lesions in the rat. *Plast Reconstr Surg*. 1989; 83(1):129-36.
- Baker MM, Juhn MS. Patellofemoral pain syndrome in the female athlete. *Clin Sports Med*. 2000; 19:315-29.
- Ballance CA, Ballance HA, Stewart P. Remarks on the operative treatment of chronic facial palsy of peripheral origin. *Br Med J*. 1903; 2:1009-13.
- Ballance CA. Some results of nerve anastomosis. *Br J Surg*. 1923; 11:327-46.
- Basmajian JV. *Electro-fisiologia de la acción muscular*. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana S.A., 1976.
- Beris A, Lykissas M, Korompilias A, Mitsionis G. End-to-side nerve repair in peripheral nerve injury. *J Neurotrauma*. 2007; 24(5):909-16.

- Beris AE, Lykissas MG. Experimental results in end-to-side neurorrhaphy. *Int Rev Neurobiol.* 2009; 87:269-79.
- Bertelli JA, Santos ARS, Calixto JB. 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. *J Reconstr Microsurg.* 1996; 12(8):559-63.
- Bervar M. Video analysis of standing — an alternative footprint analysis to assess functional loss following injury to the rat sciatic nerve. *J Neurosci Methods.* 2000; 102: 109–116.
- Bickel CS, Slade JM, Warren GL, Dudley GA. Fatigability and variable-frequency train stimulation of human skeletal muscle. *Phys Ther.* 2003; 83:366-73.
- Bora FW Jr, Pleasure DE, Didizian NA. A study of nerve regeneration and neuroma formation after nerve suture by various techniques. *J Hand Surg Am.* 1976; 1:138-43.
- Bora FW Jr. A comparison of epineural, perineural and epineural methods of nerve suture. *Clin Orthop Relat Res.* 1978; 133:91-4.
- Bora W. Peripheral nerve repair in cats: the fascicular stitch. *J Bone Joint Surg Am.* 1967; 49:659-66.
- Bratton BR, Kline DG, Hudson AR, Coleman WT. Use of monofilament polyglycolic acid suture for experimental peripheral nerve repair. *J Surg Res.* 1981; 31:482-9.
- Braun RM. Epineurial nerve suture. *Clin Orthop Relat Res.* 1982; 163:50-6.
- Brenner MJ, Dvali L, Hunter DA, Myckatyn TM, Mackinnon SE. Motor neuron regeneration through end-to-side repairs is a function of donor nerve axotomy. *Plast Reconstr Surg.* 2007; 120(1):215-23.

- Brushart TME & Seiler WA. Selective reinnervation of distal motor stumps by peripheral motor axons. *Exp Neurol*. 1987; 97:289-300.
- Bunnell S. Surgery of the nerves of hand. *Surg Gynecol Obstet*. 1927; 44:145-52.
- Burt AV. *Neuroanatomia*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1995, p412.
- Cabral CMN, Monteiro-Pedro V. Recuperação funcional de indivíduos com disfunção femoropatelar por meio de exercícios em cadeia cinética fechada: revisão da literatura. *Rev Bras Fisioter*. 2003; 7:1-8.
- Caierão QM, Betini J, Teodori RM, Minamoto VB. O efeito do intervalo da estimulação elétrica no músculo desnervado de rato. *Rev Bras Fisioter*. 2008; 12(2):143-8.
- Carandente F, Angeli A, Candiani GB, Crosignani PG, Dammascco F, De-Cecco L, Marrama P, Massobrio M, Martini L. Rhythms in the ovulatory cycle. 2nd: LH, FSH, estradiol and progesterone. *Chronobiologia*. 1989; 16(4):353-63.
- Carlton JM, Goldberg NH. Quantitating integrated muscle function following reinnervation. *Surg Forum*. 1986; 37: 611–614.
- Carvalho DCI, Rosim GC, Gama LOR, Tavares MR, Tribioli RA, Santos IR, Cliquet Júnior A. Tratamentos não farmacológicos na estimulação da osteogênese. *Rev Saúde Pública*. 2002; 36(5):647-54.
- Carvalho LC, Polizello JC, Padula N, Freitas FC, Shimano AC, Mattiello-Sverzut AC. Propriedades mecânicas do gastrocnêmio eletroestimulado pós-imobilização. *Acta Ortop Bras*. [online]. 2009; 17(5):269-72.
- Chem RC. Cirurgia sobre nervos periféricos. *Rev Amrigs*. 1978; 22:20-37.
- Coleman CC. Surgical treatment of peripheral nerve injuries. *Surg Gynecol Obstet*. 1944; 78:113-24.

- Colin W, Donoff RB. Nerve regeneration through collagen tubes. *J Dent Res*. 1984; 63:987.
- Colomé LM, Gomes C, Crosignani N, Paz AH, Lugo AA, Guimarães KM, Foerstrow LP, Tessari JP, Colomé LM, Graça DL, Meurer L, Passos EP, Pippi NL, Cotesini EA, Lima EOC. Utilização de células tronco autólogas de medula óssea na regeneração do nervo tibial de coelhos mediante técnica de tubulização com prótese de silicone. *Ciência Rural*. 2008; 38(9):2529-34.
- Cowan SM, Bennell KL, Hodges PW, Crossley KA, McConnell J. Delayed onset of electromyographic activity of vastus medialis obliquus relative to vastus lateralis in subjects with patellofemoral pain syndrome. *Arch Phys Med Rehabil*. 2001; 82:183-9.
- Da-Silva C. Biologia Celular e Molecular da regeneração do sistema nervoso periférico. *Atual Neurociênc*. 1995; 19:1-16.
- Dellon AL, Ferreira MC, Williams EH, Rosson GD. Which End is Up? Terminology for Terminolateral (End-to-Side) Nerve Repair: A Review. *J Reconstr Microsurg*. 2010; 26(5):295-301
- Dellon AL, Mackinnon SE. Selection of the appropriate parameter to measure neural regeneration. *Ann Plast Surg*. 1989; 23:197–202.
- Dellon ES, Dellon AL. Functional assessment of neurologic impairment: track analysis in diabetic and compression neuropathies. *Plast Reconstr Surg*. 1991; 88:686–694.
- De Medinaceli L, Freed W, Wyatt RJ. An index of the functional condition of rat sciatic nerve based an measurements made from walking tracks. *Exp Neurol*. 1982; 77:634-43.

- De Sá JMR, Mazzer N, Barbieri CH, Barreira AA. The end-to-side peripheral nerve repair functional and morphometric study using the peroneal nerve of rats. *J Neurosci Methods*. 2004; 136(1):45-53.
- Dogliotti AM. Etudes expérimentales et première application clinique d'une nouvelle opération destinée à augmenter et à équilibrer la fonction neuromusculaire dans la paralysie partielle des nerfs. *J Chir*. 1935; 45:30-48.
- Doucette SA, Child DD. The effect of open and closed exercise and knee joint position on patellar tracking in lateral patellar compression syndrome. *J Orthop Sports Phys Ther*. 1996; 23:104-10.
- Durigan JLQ, Cancelliero KM, Dias CKN, Silva CA, Guirro RRJ, Polacow MLO. Efeitos da estimulação elétrica neuromuscular sobre o membro posterior imobilizado de ratos durante 15 dias: análises metabólicas e morfométricas. *Rev Bras Fisioter*. 2006; 10(3):297-302.
- Dow DE, Cederna PS, Hassett CA, Kostrominova TY, Faulkner JA, Dennis RG. Number of contractions to maintain mass and force of denervated rat muscle. *Muscle Nerve*. 2004; 30:77–86.
- Ellis JC, McCaffrey TV. Animal model for peripheral nerve grafting. *Otolaryngol Head Neck Sur*. 1984; 92(5):546-50.
- Elsberg CA. Experiments on motor nerve regeneration and the direct neurotization of paralyzed muscles by their own and by foreign nerves. *Science*. 1917; 45:318-20.
- Enoka RM. Bases neuromecânicas da cinesiologia. 2ed. São Paulo: Manole, 2000.
- Evans PJ, Bain JR, Mackinnon SE, Makino AP, Hunter DA. Selective reinnervation: a comparison of recovery following microsuture and conduit nerve repair. *Brain Res*. 1991; 559(2):315-21.

- Fansa H, Keilhoff G, Altmann S, Plogmeier K, Wolf G, Chneider W. The effect of the immunosuppressant FK506 on peripheral nerve regeneration following nerve grafting. *J Hand Surg Br.* 1999; 24(1):38-42.
- Fonseca ST, Cruz ABC, Lima SS, Seixas AFAM. Análise eletromiográfica dos músculos vasto medial oblíquo e vasto lateral em exercícios usados no tratamento da síndrome da dor patelofemoral. *Rev Fisiot Univers São Paulo.* 2001; 8(1):1-10.
- Fox TA. Dysplasia of the quadriceps mechanism: hypoplasia of the vastus medialis muscle as related to the hypermobile patella syndrome. *Surg Clin North Am.* 1975; 55:199-206.
- Franco RG. Estudo Comparativo com diferentes números de pontes na neurorrafia término-lateral em ratos. [Dissertação de Mestrado]. Botucatu: Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina, 2010.
- Fu SY, Gordon T. The cellular and molecular basis of peripheral nerve regeneration. *Mol Neurobiol.* 1997; 14:67-116.
- Galli SK, Valauri F, Komisar A. Facial reanimation by cross-facial nerve grafting: report of five cases. *Ear Nose Throat J.* 2002; 81(1):25-9.
- Gaster M, Handberg A, Beck-Nielsen H, Schroder HD. Glucose transporter expression in human skeletal muscle fibers. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2000; 279(3):E529-38.
- Gatta R. Sulla anastomosi latero-terminale dei tronchi nervosi. *Arch Ital Chir.* 1938; 48:155-71.
- Gigo-Benato D, Russo TL, Geuna S, Domingues NR, Salvini TF, Parizzoto NA. Electrical stimulation impairs early functional recovery and accentuates skeletal

- muscle atrophy after sciatic nerve crush injury in rats. *Muscle Nerve*. 2010; 41(5):685-93.
- Giovanoli P, Koller R, Meuli-Simmen C, Rab M, Haslik W, Mittlbo M, Meyer VE, Frey M. Functional and Morphometric Evaluation of End-to-Side Neurorrhaphy for Muscle Reinnervation. *Plast Reconstr Surg*. 2000; 106(2):388-92.
- Girolami U, Anthony DC, Frosch MP. Nervo periférico e músculo esquelético. In: Cotran RS, Kuman V, Collins T. *Robbins Patologia Estrutural e Funcional*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p.1135-54.
- Goheen-Robillard B, Myckatyn TM, Mackinnon SE, Hunter DA. End-to-side neurorrhaphy and lateral axonal sprouting in a long graft rat model. *Laryngoscope*. 2002; 112(5):899-905.
- Grabb WC, Bement SL, Koepke GH, Green RA. Comparison of methods of peripheral nerve suturing in monkeys. *Plast Reconstr Surg*. 1970; 46:31-8.
- Gregory CM, Bickel CS. Recruitment patterns in human skeletal muscle during electrical stimulation. *Phys Ther*. 2005; 85:358-64.
- Guirro RRJ, Silva CA, Forti F, Cancelliero KM. Análise do músculo esquelético desnervado tratado com metformina e/ou estimulação elétrica de baixa frequência. *Rev Bras Fisioter*. 2004; 8(1):21-7.
- Guyton AC, *Tratado de fisiologia médica*. 6a.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1986.
- Haninec P, Ámal FS, Tomas R, Houstava L, Dubovy P. Direct repair (nerve grafting), neurotization, end-to-side neurorrhaphy in the treatment of brachial plexus injury. *J Neurosurg*. 2007; 106:391-99.
- Hakstian RW. Funicular orientation by direct stimulation. An aid to peripheral nerve repair. *J Bone Joint Surg Am*. 1968; 50:1178-86.

- Hakstian RW. Perineural neurorrhaphy. *Orthop Clin North Am.* 1973; 4:945-56.
- Hala AZA. Efeito da irradiação laser e da irradiação infra vermelha em músculo tibial anterior de ratos submetido ao processo de fadiga muscular. [Dissertação de Mestrado]. São José dos Campos: Universidade do Vale do Paraíba, Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, 2003.
- Harris ME, Tindall SC. Techniques of peripheral nerve repair. *Neurosurg Clin N Am.* 1991; 2:93-104.
- Hayashi A, Yanai A, Komuro Y, Nishida M, Inoue M, Seki T. Collateral sprouting occurs following end-to-side neurorrhaphy. *Plast Reconstr Surg.* 2004; 114(1):129-137.
- Henneman E, Olson CB. Relations between structure and function in the design of skeletal muscles. *J Neurophysiol.* 1965; 28:581-598.
- Hentz VR, Rosen JM, Xiao SJ et al. A comparison of suture and tubulization nerve repair techniques in a primate. *J Hand Surg Am.* 1991; 16:251-61.
- Iñigo PR. Estimulación con corrientes de alta frecuencia para la cicatrización de la ruptura de meniscos en las lesiones en zona vacular y avascular, reporte preliminar de un nuevo abordaje terapéutico. *Rev Mex Ortop Traumatol.* 1998; 12(5):421-4.
- Isaacs J, Allen D, Chen LE, Nunley J. Reverse End-to-Side Neurotization. *J Reconstr Microsurg.* 2005; 21(1):43-48.
- Ito T, Hirotani H, Yamamoto K. Peripheral nerve repairs by the funicular suture technique. *Acta Orthop Scand.* 1976; 47:283-9.
- Jaberi FM, Abbas BP, Nezhad ST, Tanideh N. End-to-side neurorrhaphy: an experimental study in rabbits. *Microsurgery.* 2003; 23(4):359-62.

- James DE, Strube M, Mucckler M. Molecular cloning and characterization of an insulin-regulatable glucose transporter. *Nature*; 1989; 338:83-7.
- Junqueira LC, Carneiro C. *Histologia básica*. 9 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999, p427.
- Kanaya F, Tajima T. Effect of electrostimulation on denervated muscle. *Clin Orthop Relat Res*. 1992; (283):296-301.
- Kisner C, Colby LA. *Exercícios Terapêuticos: Fundamentos e Técnicas*. 4 ed. Barueri: Manole, 2005.
- Kleinert HE, Griffin JM. Technique of nerve anastomosis. *Orthop Clin North Am*. 1973; 4:907-15.
- Koh KS, Kim JK, Kim CJ, Kwun BD, Kim SY. Hypoglossal-facial crossover in facial-nerve palsy: pure end-to-side anastomosis technique. *Br J Plast Surg*. 2002; 55(1):25-31.
- Kotwal A, Schmidt CE. Electrical stimulation alters absorption and nerve cell interactions with electrically conducting biomaterials. *Biomaterials*. 2001; 22(10):1055-64.
- Kumar PA, Hassan KM. Cross-face nerve graft with free-muscle transfer for reanimation of the paralysed face: a comparative study of the single stage and two-stage procedures. *Plast Reconstr Surg*. 2002; 109(2):451-62.
- Kurze T. Microtechniques in neurological surgery. *Clin Neurosurg*. 1964; 11:128.
- Langley NN, Hashimoto M. On the suture of separate nerve bundles in a nerve trunk and on internal plaxuses. *J Physiol*. 1917; 51:318.
- Liao WC, Chen JR, Wang YJ, Tseng GF. The efficacy of end-to-end and end-to-side nerve repair (neurorrhaphy) in the rat brachial plexus. *J Anat*. 2009; 215(5):506-21.

- Lincoln GA, Short RV. Seasonal breeding nature's contraceptive. *Recent Prog Horm Res.* 1980; 36:1-52.
- Liu K, Chen LE, Seaber AV, Goldner RV, Urbaniak JR. Motor functional and morphological findings following end-to-side neurorrhaphy in the rat model. *J Orthop Res.* 1999; 17(2):293-300.
- Lohman R, Bullock F, McNaughton T, Siemionow M. End-to-end vs. end-to-side neurorrhaphy. *J Reconstr Microsurg.* 1997; 13:135-6.
- Low J, Reed A. *Eletroterapia explicada: princípios e prática.* 3 ed. Barueri: Manole, 2001.
- Lundborg G. A 25-year perspective of peripheral nerve surgery: involving neuroscientific concepts and clinical significance. *J Hand Surg Am.* 2000; 25A:391-414.
- Lundborg G, Dhalin LB, Danielsen N, Nachemson AK. Tissue specificity in nerve regeneration. *Scand J Plast Reconstr Surg.* 1986; 20:279-83.
- Lundborg G. Nerve regeneration and repair, a review. *Acta Orthop Scand.* 1987; 58:145-69.
- Lundborg G, Zhao Q, Kanje M, Danielsen N, Kerns JM. Can sensory and motor collateral sprouting be induced from intact peripheral nerve by end-to-side anastomosis? *J Hand Surg Br.* 1994; 19B:277-82.
- Lutz BS, Chuang DCC, Hsu JC, Ma SF, Wei FC. Selection of donor nerve an important factor in end-to-side neurorrhaphy. *Br J Plast Surg.* 2000a; 53:149-54.
- Lutz BS, Ma SF, Chuang DC, Wei FC. Role of the target in end-to-side neurorrhaphy: reinnervation of a single muscle vs. multiple muscles. *J Reconstr Microsurg.* 2000b; 16(6):443-8.

- Maciel FO. Efeitos da corrente russa no ganho de força muscular. *Fisioterapia Ser.* 2010; 5(4):226-9.
- Majno G. *The healing hand man and wound in the ancient world.* Cambridge: Harvard University Press, 1975.
- MacGregor K, Gerlach S, Mellor R, Hodges PW. Cutaneous stimulation from patella tape causes a differential increase in vasti muscle activity in people with patellofemoral pain. *J Orthop Res.* 2004; 23:351–8.
- Manasse P. Über doppelte nervenpfropfung. *Arch Klin Chir.* 1922; 120:665-85.
- Marcos RL. Avaliação do efeito da irradiação laser AsGaAl (630-680 nm) no modelo experimental de fadiga muscular induzida por estimulação elétrica em ratos. [Dissertação de Mestrado]. São José dos Campos: Universidade do Vale do Paraíba, Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, 2002.
- Matsuda K, Kakibuchi M, Kubo T, Tomita K, Fujiwara T, Hattori R, Yano K, Hosokawa K. A new model of end-to-side nerve graft for multiple branch reconstruction: end-to-side cross-face nerve graft in rats. *J Plast Reconstr Aesthet Surg.* 61(11):1357-67. 2008.
- McCallister WV, Tang P, Trumble TE. Is end-to-side neurorrhaphy effective? A study of axonal sprouting stimulated from intact nerves. *J Reconstr Microsurg.* 1999; 15(8):597-604.
- McIntyre DL, Robertson GE. Quadriceps muscle activity in women runners with and without patellofemoral pain syndrome. *Arch Phys Med Rehabil.* 1992; 7(10):14.
- Mcquarrie IG. *Peripheral Nerve Surgery.* Neurol Clin. 1985; 3:453-66.
- Mennen U. End-to-side nerve suture in primate (Chacma Baboon). *J Hand Surg.* 1998; 3:1-6.

- Millesi H, Meissl G, Berger A. The interfascicular nerve-grafting of the median and ulnar nerves. *J Bone Joint Surg Am*. 1972; 54:727-50.
- Millesi H. Peripheral nerve injuries. Nerve sutures and nerve injuries. *Scand J Plast Reconstr Surg Suppl*. 1982; 19:25-37.
- Millesi H. Peripheral nerve repair: terminology, questions, and facts. *J Reconstr Microsurg*. 1985; 2(1):21-31.
- Millesi H, Zöch G, Reihnsner R. Mechanical properties of peripheral nerves. *Clin Orthop Relat Res*. 1995; 314:76-83.
- Millesi H, Hausner T, Schmidhammer R, Trattinig S, Tschabitscher M. Anatomical structures to provide passive motility of peripheral nerve trunks and fascicles. *Acta Neurochir Suppl*. 2007; 100:133-5.
- Millesi H. Bridging defects: autologous nerve grafts. *Acta Neurochir Suppl*. 2007; 100:37-8.
- Monte-Raso VV, Barbieri CH, Mazzer N, Yamasita AC, Barbieri G. Is the sciatic functional index always reliable and reproducible? *J Neurosc Methods*. 2008; 170:255-61.
- Müller SF. Estudo Morfológico da regeneração axonal na síntese término-lateral de nervo periférico de ratos com adesivo de fibrina e micro-sutura. [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo, Faculdade de Medicina, 2001.
- Murray JA, Willins M, Mountain RE. A comparison of epineurial and perineurial sutures for the repair of a divided rat sciatic nerve. *Clin Otolaryngol Allied Sci*. 1994;19(2):95-7.

- Myckatyn TM, Mackinnon SE, Hunter DA, Brakefield D, Parsadonian A. A novel model for the study of peripheral-nerve regeneration following common nerve injury paradigms. *J Reconstr Microsurg*. 2004; 20(7):533-44.
- Narakas A. Les greffes nerveuses, expérience clinique. *Ann Chir Main*. 1989; 8:302-11.
- Nelson RM, Hayes KW, Currier DP. *Eletroterapia Clínica*. 3 ed. Barueri: Manole, 2003.
- Nemeth PM. Electrical stimulation of denervated muscle prevents decreases in oxidative enzymes. *Muscle Nerve*. 1982; 5(2):134-9.
- Neto AG. Comparação entre estimulação elétrica funcional e contração voluntária máxima no treinamento de força muscular da preensão palmar. [Dissertação de Mestrado]. Brasília: Universidade Católica de Brasília, Programa de Pós Graduação em Educação Física, 2007.
- Ögün TC, Özdemir M, Senaran H, Üstün ME. End-to-side neurorrhaphy as a salvage procedure for irreparable nerve injuries. *J Neurosurg*. 2003; 99(1):180-5.
- Orgel MG, Terzis JK. Epineural vs. perineurial repair. An ultrastructural and electrophysiological study of nerve regeneration. *Plast Reconstr Surg*. 1977; 60:80-91.
- Papalia I, Geuna S, Tos PL, Boux E, Battiston B, Stagno D'Alcontres F. Morphologic and functional study of rat median nerve repair by terminolateral neurorrhaphy of the ulnar nerve. *J Reconstr Microsurg*. 2003; 19(4):257-64.
- Papalia I, Lacrois C, Brunelli F, D'Alcontres FS. Direct neurotization after end-to-side neurorrhaphy. *J Reconstr Microsurg*. 2001; 17(4):237-46.

- Pardini Jr AG, Freitas AD, Plentz EG. Avaliação da sensibilidade após neurorrafia término-lateral de nervos digitais: nota prévia. *Rev Bras Ortop.* 2005; 40(9):543-54.
- Pereira CEM, Silva JDM, Romeiro VR. Aspectos éticos da experimentação animal. *Acta Cir Bras.* 1998; 13(2):123-128.
- Pette D, Staron RS. Mammalian skeletal muscle fiber type transitions. *Int Rev Cytol.* 1997; 170:143-223.
- Politis MJ, Ederle K, Spencer PS. Tropism in nerve regeneration in vivo. Attraction of regenerating axons by diffusible factors derived from cells in distal nerve stumps of transected peripheral nerves. *Brain Res.* 1982; 253:1-12.
- Polônio JT, Mazzer M, Barbieri CH, Mattiello-Sverzut AC. Eletroestimulação seletiva mantém estrutura e função do tibial anterior desnervado de ratos. *Acta Ortop Bras.* 2010; 18(2):85-9.
- Qin L, Appell HJ, Chan KM, Maffulli N. Electrical stimulation prevents immobilization atrophy in skeletal muscle of rabbits. *Arch Phys Med Rehabil.* 1997; 78:512-7.
- Robinson AJ, Snyder-Mackler L. *Eletrofisiologia clínica.* 2 ed. Porto Alegre: Artmed, 2001.
- Rodrigues AC, Silva MD. Inside-out versus standard artery graft to repair a sensory nerve in rats. *Microsurgery.* 2001; 21:102-7.
- Romão AM, Viterbo F, Stipp E, Garbino JA, Rodrigues JA. Eletroestimulação do músculo tibial cranial após esmagamento do nervo fibular comum: estudo neurofisiológico e morfométrico no rato. *Rev Bras Ortop.* 2007; 42(3):41-6.
- Rouleau M, Crepeau J, Tetreault L, Lamarche J. Facial nerve sutures: epineural versus perineural sutures. *J Otolaryngol.* 1981; 10:338-42.

- Rovak JM, Cederna PS, Kuzon WM. Terminolateral neurorrhaphy: a review of the literature. *J Reconstr Microsurg*. 2001; 17(8):615-24.
- Ruffin MT, Kningham RB. Anterior knee pain: the challenge of patellofemoral syndrome. *Am Fam Physician*. 1993; 47(1):185-94.
- Russo TL, Peviani SM, Durigan JLQ, Salvini TF. Electrical stimulation increases matrix metalloproteinase-2 gene expression but does not change its activity in denervated rat muscle. *Muscle Nerve*. 2008; 37:593–600.
- Rutherford OM, Jones DA. The role of learning and coordination in strength training. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*. 1986; 55(1):100-5.
- Sato KM. 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.
- Schmidhammer R, Redl H, Hopf R, Van der Nest DG, Millesi H. Synergistic terminal motor end-to-side nerve graft repair: investigation in a non-human primate model. *Acta Neurochir Suppl*. 2007; 100:97-101.
- Seddon HJ. Three types of nerve injury. *Brain*. 1943; 66:237-88.
- Seddon HJ. Nerve grafting. *J Bone Joint Surg Br*. 1963; 45:447-61.
- Shaller O. Nomenclatura anatômica veterinária ilustrada. Barueri: Manole, 1999. 614p.
- Souza TD, Del Carlo RJ, Vilorio MIV. Eletroterapia no processo de reparação da superfície articular de coelhos. *Ciência Rural*. 2001; 31(5):819-24.
- Smith JW. Microsurgery of peripheral nerves. *Plast Reconstr Surg*. 1964; 33:317.

- Snyder-Mackler L, Delitto A, Stralka SW, Bailey SL. Use of electrical stimulation to enhance recovery of quadriceps femoris muscle force production in patients following anterior cruciate ligament reconstruction. *Phys Ther.* 1994; 74:901-7.
- Soo CL, Currier DP, Therelked AJ. Augmenting Voluntary Torque of Healthy Muscle by Optimization of Electrical Stimulation. *Phys Ther.* 1988; 68:333-7.
- Sperandei S. The myth of the selective activation of the vastus medialis. *R bras Ci e Mov.* 2005; 13(1):109-16.
- Starkey C. Recursos terapêuticos em fisioterapia. Barueri: Manole, 2001.
- Stiene HA, Brosky T, Reiking MF, Nyland J, Mason MB. A comparison of closed kinetic chain and isokinetic joint isolation exercise in patients with patellofemoral dysfunction. *J Orthop Sports Phys Ther.* 1996; 24:136-41.
- Stookey B. Artificial nerve branches for innervation of paralyzed muscles. *Arch Surg.* 1923; 6:731-8.
- Sunderland, S. Nerves and nerves injuries. Baltimore: Williams and Wilins Co., 1968. p.5, 26, 58,200-202.
- Sunderland S. Nerve injuries and their repair: a critical appraisal. NY:Churchill Livingstone, 1991.
- Sunderland S. Nervios perifericos y sus lesiones. 2a ed. Barcelona: Salvat, 1985.
- Sunderland S. The intraneural topography of the radial, median and ulnar nerves. *Brain.* 1945; 68:243.
- Sundine MJ, Quan EE, Saglam O, Dhawan V, Quesada PM, Ogden L, Harralson TG, Gossman MD, Maldonado CJ, Barker JH. The use of end-to-side nerve grafts to reinervate the paralyzed orbicularis oculi muscle. *Plast Reconstr Surg.* 2003; 111(7):2255-64.

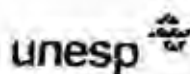
- Tagami Y, Kurimoto T, Miyoshi T, Morimoto T, Sawai H, Mimura O. Axonal Regeneration Induced by Repetitive Electrical Stimulation of Crushed Optic Nerve in Adult Rats. *Jpn J Ophthalmol*. 2009; 53:257-66.
- Takano Y, Haneda Y, Maeda T, Sakai Y, Matsuse H, Kawaguchi T, Tagawa Y, Shiba N. Increasing muscle strength and mass of thigh in elderly people with the hybrid-training method of electrical stimulation and volitional contraction. *Tohoku J Exp Med*. 2010; 221(1):77-85.
- Tang JB. Vein conduits with interposition of nerve tissue for peripheral nerve defects. *J Reconstr Microsurg* 11:21-26, 1995.
- Teodori RM, Silva AM, Silva MT, Oliveira LS, Polacow MLO, Guirro ECO. High-voltage electrical stimulation improves nerve regeneration after sciatic crush injury. *Rev Bras Fisioter*. 2011; 15(4):325-31.
- Terzis JK, Sun DD, Thanos PK. Histological and basic science review; past, present, and future of nerve repairs. *J Reconstr Microsurg*. 1997; 13:215-25.
- Tessitore A, Pflsticker LN, Paschoal JR. Aspectos neurofisiológicos da musculatura facial visando a reabilitação na paralisia facial. *Rev CEFAC*. 2008; 10(1):68-75.
- Thomeé R, Restrom P, Karlsson J, Grimby G. Patellofemoral pain syndrome in young women. Part II – Muscle function in patients and healthy controls. *Scand J Med Sci Sports*. 1995; 5:245-51.
- Van Dulken H, Thomeer TWM. Recent developments in peripheral nerve surgery. Management of open traumatic peripheral nerve lesions. *Arch Chir Neerl*. 1978; 30:91-9.
- Vieira S, Hossne WS. Metodologia científica para a área de saúde. Rio de Janeiro: Campus, 2001. 192p.

- Viterbo F. A new method for treatment of facial palsy: the cross-face nerve transplantation with end-to-side neurorrhaphy. *Rev Soc Bras Cir Plast Reconst Est.* 1993; 8:29-35.
- Viterbo F. *Neurorrafia Látero-Terminal, estudo experimental no rato.* [Tese de Doutorado]. Botucatu: Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina, 1992.
- Viterbo F, Teixeira E, Hoshino K, Padovani CR. End-to-side neurorrhaphy with and without perineurium. *Revista Paulista de Medicina.* 1998; 116:1808-14.
- Viterbo F, Trindade JC, Hoshino K, Mazzoni Neto A. Latero-terminal neurorrhaphy without removal of the epineural sheath: experimental study in rats. *Rev Paul Med.* 1992; 110:267-75.
- Viterbo F, Trindade JC, Hoshino K, Mazzoni Neto A. End-to-side neurorrhaphy with removal of the epineurial sheath: an experimental study in rats. *Plast Reconstr Surg.* 1994a; 94:1038-47.
- Viterbo F, Trindade JC, Hoshino K, Mazzoni Neto A. Two end-to side neurorrhaphies and nerve graft with removal of the epineural sheath: experimental study in rats. *Br J Plast Surg.* 1994b; 47:75-80.
- Ward AR, Shkuratova N. Russian Electrical Stimulation: the early experiments. *Phys Ther.* 2002; 82:1019-30.
- Ward AR. Electrical stimulation using kilohertz-frequency alternating current. *Phys Ther.* 2009; 89:181-190.
- Wilk KE, Reinold MM. Principles of patellofemoral rehabilitation. *Sports Med Arthrosc.* 2001; 9:325-36.
- Williams HB. 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*. 1996; 17(11):589-96.
- Wong AYC, Scott JJA. Functional recovery following direct or graft repair of nerve gaps in the rat. *Exp Neurol*. 1991; 114:364-6.
- Yamamoto Y, Sasaki S, Sekido M, Yokoyama T, Tsutsumida A, Furukawa H, Sawamura Y, Sugihara T. Alternative approach using the combined technique of nerve crossover and cross-nerve grafting for reanimation of facial palsy. *Microsurgery*. 2003; 23:251-6.
- Yoleri L, Songur E, Yoleri O, Vural T, Cagdas A. Reanimation of early facial paralysis with hypoglossal/facial end-to-side neurorrhaphy: a new approach. *J Reconstr Microsurg*. 2000; 16(5):347-55.
- Zhao Q, Dahlin LB, Kanje M, Lundborg G, Lu SB. Axonal projections and functional recovery following fascicular repair of the rat sciatic nerve with Y-tunneled silicone chambers. *Restor Neurol Neurosci*. 1992; 4(1):13-19.
- Zhao J, Chen Z, Chen T. Nerve regeneration after termino-lateral neurorrhaphy: experimental study in rats. *J Reconstr Microsurg*. 1997; 13:31-7.

Anexa

Anexo 1 – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa Animal.



Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Medicina de Botucatu

Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu - S.P.
CEP: 18.618-970

Fone/Fax: (0xx14) 3811-6143

e-mail secretaria: capellup@fmb.unesp.br

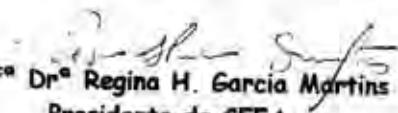
Instalada na Faculdade de Medicina através da Portaria do Diretor nº 30 de 26/04/99



CERTIFICADO

CERTIFICAMOS que o Protocolo n.º 746 sobre o projeto de pesquisa "Efeito da estimulação elétrica do músculo tibial cranial após neurraxia término-lateral do nervo fibular em ratos", a ser conduzido por Fábio Oliveira Maciel, orientado 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 mesmo.

Projeto de Pesquisa aprovado em reunião da CEEA em 27/08/2009.


Prof.ª Dr.ª Regina H. Garcia Martins
Presidente da CEEA


Alberto Santos Capelluppi
Secretário da CEEA

Anexo 2 – Projeto piloto 1

EFEITO DA ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA DO MÚSCULO TIBIAL CRANIAL APÓS NEURORRAFIA TÉRMINO-LATERAL DO NERVO FIBULAR EM RATOS. PROJETO PILOTO 1

Maciel, Fábio Oliveira¹; Viterbo Fausto²; Souza, Bárbara Moraes³; Chinaque, Laís de Fátima Chuvukian⁴

Introdução: Lesões de nervos periféricos podem ser extremamente incapacitantes. A microcirurgia vem apresentando um papel fundamental no prognóstico dos pacientes vítimas desse mal. A recuperação completa da função motora depende da regeneração dos axônios e durante o tempo de regeneração dos axônios ocorre o processo de hipotrofia ou mesmo atrofia da musculatura inervada por este nervo, fato que promove prejuízo funcional para o músculo. A estimulação elétrica com finalidade regenerativa poderia ser aplicada como um método de prevenção da atrofia muscular.

Problema: A quantidade de corrente necessária para provocar estímulo motor em ratos sem anestesia é desconhecida.

Objetivo: Determinar a quantidade corrente elétrica necessária para provocar contração do músculo tibial cranial normal e pós neurorrafia látero-terminal em ratos sem anestesia.

Método: Foram utilizados 10 ratos da raça Wistar, machos, pesando em média 394,4 (+/- 40,17) g, fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Estadual Paulista (UNESP) – Campus de Botucatu. O lado operado foi sorteado. Os ratos passaram por uma NLT do nervo fibular na lateral do nervo tibial. Após cinco dias, os animais receberam estimulação elétrica com corrente alternada com 1000 Hz modulada à 10 Hz com duração de pulso em 50 ms. A intensidade foi aumentada até atingir o limiar motor do animal nos dois membros. Este procedimento foi repetido durante 10 dias seguidos. Para as variáveis quantitativas foi utilizada Mann-Whitney. Foi considerado significativo um $p \leq 0,05$.

Resultados: Com mediana de 6,0 mA (5,0/8,0) o lado experimental foi estatisticamente maior que o lado normal com 5,0 mA (4,75 / 7,0).

Discussão: Com o resultado apresentado pudemos verificar que o músculo pós NLT apresenta uma necessidade de receber maior corrente elétrica para atingir seu limiar motor.

Conclusão: A quantidade de corrente elétrica necessária para estimular em nível motor o músculo tibial cranial do rato pós NLT foi de 6,0 (5,0/8,0) mA.

Anexo 3 – Projeto piloto 2

EFEITO DA ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA DO MÚSCULO TIBIAL CRANIAL APÓS NEURORRAFIA TÉRMINO-LATERAL DO NERVO FIBULAR EM RATOS. PROJETO PILOTO 2

Maciel, Fábio Oliveira¹; Viterbo Fausto²; Souza, Bárbara Moraes³; Chinaque, Laís de Fátima Chuvukian⁴

Introdução: Lesões de nervos periféricos podem ser extremamente incapacitantes. A microcirurgia vem apresentando um papel fundamental no prognóstico dos pacientes vítimas desse mal. A recuperação completa da função motora depende da regeneração dos axônios e durante o tempo de regeneração dos axônios ocorre o processo de hipotrofia ou mesmo atrofia da musculatura inervada por este nervo, fato que promove prejuízo funcional para o músculo. A estimulação elétrica com finalidade regenerativa poderia ser aplicada como um método de prevenção da atrofia muscular.

Problema: Existem muitas possibilidades de arranjos da EE, e por este motivo ainda não existe um consenso sobre qual o melhor protocolo a ser utilizado para o tratamento do músculo desnervado.

Objetivo: O objetivo desse trabalho foi analisar a eficiência de oito protocolos de eletroestimulação na recuperação do músculo tibial cranial de ratos pós neurorrafia látero-terminal.

Método: Foram utilizados 32 ratos da raça Wistar, machos, pesando aproximadamente 200 g, fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Estadual Paulista (UNESP) – Campus de Botucatu. Os animais foram divididos, aleatoriamente, em oito grupos experimentais. Todos os grupos passaram por NLT do nervo fibular na lateral do nervo tibial. Após cinco dias, foi realizado o procedimento, de acordo com o grupo experimental. Grupo 1 (4 animais): estimulação elétrica no músculo tibial cranial com Corrente alternada de média frequência com as seguintes características: Frequência Base de 1Mhz, Pulsos de 10Hz, Duração de ciclo de 1ms, Intensidade de 5mA, Tempo 10 minutos, T(on) 10s, T (off) 20s, três vezes por semana. Grupo 2 (4 animais): mesmo procedimento do grupo 1, porém cinco vezes por semana. Grupo 3 (4 animais): estimulação elétrica no músculo tibial cranial com Corrente alternada de média frequência com as seguintes características: Frequência Base de 1Mhz, Pulsos de 10Hz, Duração de ciclo de 1ms, Intensidade de 8mA, Tempo 10 minutos, T(on) 10s, T (off) 20s, três vezes por semana. Grupo 4 (4 animais): mesmo procedimento do grupo 3, porém cinco vezes por semana. Grupo 5 (4 animais): estimulação elétrica no músculo tibial cranial com Corrente alternada de média frequência com as seguintes características: Frequência Base de 1Mhz, Pulsos de 50Hz, Duração de ciclo de 1ms, Intensidade de 5mA, Tempo 10 minutos, T(on) 10s, T (off) 20s, três vezes por semana. Grupo 6 (4 animais): mesmo procedimento do grupo 5, porém cinco vezes por semana. Grupo 7 (4 animais): estimulação elétrica no músculo tibial cranial com Corrente alternada de média frequência com as seguintes características: Frequência Base de 1Mhz, Pulsos de 50Hz, Duração de ciclo de 1ms, Intensidade de 8mA, Tempo 10 minutos, T(on) 10s, T (off) 20s, três vezes por semana. Grupo 8 (4 animais): mesmo procedimento do grupo 7, porém cinco vezes por semana. Os animais foram condicionados em gaiolas apropriadas com temperatura de 24° C (+/- 0,5), com água e ração *ad libitum*, respeitando-se ciclo de 12 hs claro/escuro. Os animais foram submetidos à avaliação da marcha com 30, 60 dias de pós-operatório. Após os 90 dias os animais foram anestesiados para análise eletroneuromiográfica do músculo tibial cranial e após foi coletado a massa do músculo tibial cranial (MTC) bilateral. Para as variáveis quantitativas foi utilizada a técnica da análise de variância paramétrica. Foi considerado significativo um $p \leq 0,05$.

Resultados: Não houve diferença quanto ao Índice Funcional do Fibular com 30, 60 dias ($P = 0,975$) e (0,359). Não houve diferença entre os grupos quanto à massa do MTC ($P = 0,462$), latência ($P = 0,860$) e amplitude ($P = 0,122$). O Grupo 3 apresentou o melhor IFF com 90 dias e a melhor evolução durante os 90 dias de estudo com 28,3%.

Discussão: Este trabalho demonstrou que os oito protocolos de estimulação elétrica para o músculo tibial cranial de ratos foram equivalentes. Isto se deve ao fato de o rato apresentar fibras mistas no MTC que podem se adaptar tanto a 10 Hz quanto a 50 Hz. A literatura não apresenta trabalhos com esse tipo de comparação entre diferentes tipos de estimulação no rato.

Conclusão: O trabalho não demonstrou diferença quanto aos tipos de estimulações utilizadas no MTC dos ratos submetidos a NLT.