

**UNIVERSIDADE METODISTA DE PIRACICABA
FACULDADE CIÊNCIAS DA SAÚDE**

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOTERAPIA

**Regeneração nervosa e recuperação funcional após estimulação
elétrica de alta voltagem**

Andréia Maria Silva

2009

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

ANDRÉIA MARIA SILVA

**REGENERAÇÃO NERVOSA E
RECUPERAÇÃO FUNCIONAL APÓS
ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA DE ALTA
VOLTAGEM**

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em Fisioterapia, da Universidade Metodista de Piracicaba, para obtenção de Título de Mestre em Fisioterapia, Área de concentração: Intervenção Fisioterapêutica. Linha de pesquisa: Plasticidade Neuromuscular e Desenvolvimento Neuromotor.

Orientador(a): Prof^a. Dr^a. Rosana Macher Teodori

PIRACICABA

2009

Ficha Catalográfica

Silva, Andréia Maria

Regeneração nervosa e recuperação funcional após Estimulação Elétrica de Alta Voltagem. Piracicaba – 2008.
100p.

Orientador: Rosana Macher Teodori

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-graduação em Fisioterapia, Universidade Metodista de Piracicaba

1. Regeneração nervosa 2. Estimulação Elétrica de Alta Voltagem 3. Axoniotmese 4. Morfometria 5. Índice Funcional do Ciático (IFC). I. Teodori, Rosana Macher. II. Universidade Metodista de Piracicaba, Programa de Pós-graduação em Fisioterapia. III. Título.

A Deus;
Aos meus pais;
Aos meus irmãos;
Ao Marcelo;
À Luna

Agradecimentos

Primeiramente agradeço a Deus por estar sempre presente em minha vida, e por tornar tudo possível.

Sou muito grata aos meus pais, Antônio e Aparecida, obrigada pelo amor, carinho e atenção e pelos valores, princípios éticos e morais dos quais jamais me afastei.

Ao meu noivo, Marcelo, pela paciência, compreensão, pelo carinho e incentivo nesta jornada.

À Prof^a Dr^a Rosana Macher Teodori, orientadora da dissertação, agradeço pelo apoio, a compreensão e a contribuição com o saber. Acima de tudo, obrigada por estimular o interesse no conhecimento científico.

À Joice, Gabriela, Elaine, Marcela pela grandiosa ajuda nos experimentos.

Em especial à minha amiga de toda hora, Valéria de Oliveira Fontes, pelo carinho e pela paciência.

O meu profundo e sincero agradecimento a todas as pessoas que contribuíram para a concretização desta dissertação, estimulando-me intelectual e emocionalmente.

“A mente que se abre a uma idéia
jamais voltará ao seu tamanho
original”

Albert Einstein

RESUMO

A estimulação elétrica de alta voltagem (EEAV) é um recurso terapêutico pouco explorado na clínica. É conhecida sua ação circulatória e regenerativa em úlceras dérmicas e controle de edema. No entanto, não há relatos sobre sua ação no tecido nervoso periférico. Este estudo avaliou o efeito da estimulação elétrica de alta voltagem sobre as características morfométricas e funcionais do nervo isquiático regenerado após axoniotmese. Vinte ratos Wistar machos (210,80 ±10,79 g), divididos em 4 grupos (n=5): Controle (CON), Desnervado (D), Desnervado + Estimulação Elétrica de Alta Voltagem (EEAV) e sem lesão + Estimulação Elétrica de Alta Voltagem (SHAM). O nervo isquiático esquerdo foi esmagado por 4 pinçamentos de 20s. No grupo SHAM, o nervo foi exposto, mas não foi esmagado. Após 24 horas da lesão, os animais dos grupos EEAV e SHAM sofreram estimulação catódica até o limiar motor por 30 min (Frequência de 100 Hz; Voltagem de 100 V, duração pulso de 20 µseg e duração interpulso de 100 µseg), 5 vezes por semana (segunda a sexta-feira). Um eletrodo ativo de silicone-carbono (2,0 x 2,0 cm), foi posicionado sobre a cicatriz cirúrgica e outro, dispersivo (4,0 x 4,0 cm), foi posicionado paralelo ao ativo, preservando-se uma distância de 1 cm entre eles. Realizou-se o registro da marcha (pré-operatório, 7º, 14º e 21º dias pós-operatório – PO), a partir das distâncias entre a extremidade do 3º dedo e o calcâneo – PL; entre o 1º e o 5º dedo – TS e entre o 2º e o 4º dedo – ITS em ambas as patas. O nervo isquiático de todos os animais foram coletado, fixado em Karnovsky, pós-fixado em tetróxido de ósmio, processado para inclusão em resina Araldite e cortes transversais de 1 µm foram submetidos à análise morfométrica e quantitativa. Os dados funcionais e morfométricos foram processados estatisticamente (SPSS/PC versão 13.0). O teste *Shapiro Wilk* avaliou a distribuição dos dados. Para análise do diâmetro do axônio, utilizou-se o teste Anova (F) seguido de Tamhane's T_2 e, para demais variáveis, utilizou-se o teste Anova (F) seguido de Tukey HSD. Para análise funcional, utilizou-se o teste de Anova (F) para medidas repetidas, seguido de *Post hoc* LSD. Considerou-se $p < 0,05$. Não houve diferença estatística com relação ao número de axônios ($p = 0,4$). O diâmetro dos axônios, das fibras nervosas e a espessura da bainha de mielina nos grupos desnervados foram menores que nos grupos CON, EEAV e SHAM ($p < 0,05$). Na análise do Índice Funcional do Ciático (IFC) intragrupos, nos grupos D e EEAV, houve redução significativa da função no 7º e 14º dia, com recuperação no 21º dia ($p < 0,05$). Na avaliação intergrupos, no 7º e 14º dia PO, houve diferença estatística entre os grupos D e EEAV em relação ao SHAM. No 14º dia PO houve diferença estatística entre os grupos D e EEAV ($p < 0,05$). Conclui-se que a EEAV acelerou a maturação das fibras nervosas regeneradas após axoniotmese, bem como a recuperação funcional.

Palavras-Chave: regeneração nervosa, Estimulação Elétrica de Alta Voltagem, axoniotmese, morfometria, Índice Funcional do Ciático (IFC).

ABSTRACT

The high-voltage electrical stimulation (HVES) is a therapeutic resource little explored in clinical. Its action is known in circulatory and regenerative skin ulcers and control of edema. However, there are no reports on their action in the peripheral nervous tissue. This study evaluated the effect of high-voltage electrical stimulation on the morphometric characteristics and functional recovery of the sciatic nerve after axonotmesis. Twenty male Wistar rats (210.80 ± 10.79 g) divided into 4 groups (n = 5): Control (CON), Denervated (D), Denervated + High Voltage Electrical Stimulation (EEAV) and without injury + High Voltage Electrical Stimulation (SHAM). The left sciatic nerve was crushed by 4 clamping of 20 seconds. In the SHAM group, the nerve was exposed, but not crushed. After 24 hours of injury, the animals of the EEAV and SHAM groups suffered cathodic stimulation until the motor threshold for 30 min (frequency of 100 Hz, voltage of 100 V, pulse duration of 20 μ seg e interpulse duration of 100 μ seg), 5 times per week (monday to friday). A silicon-carbon active electrode (2.0 x 2.0 cm) was placed on the surgical scar and another, dispersive, (4.0 x 4.0 cm) was positioned parallel to the active, according to a distance of 1 cm between them. It was performed the hind footprints (pre-operatory, 7th, 14th e 21th post operatory – PO days), by distance between the 3rd finger extremity and calcaneus – PL; the 1st and the 5th finger – TS and the 2nd and 4th finger – ITS was measured in both legs. All animals' sciatic nerve was collected, fixed in Karnovsky, post fixed in osmium tetroxide, processed for inclusion in Araldite resin and 1 μ m transverse sections were made for the morphometric and quantitative analysis. Functional and morphometric data were processed statistically (SPSS / PC version 13.0). The Shapiro Wilk test evaluated the data distribution. For the axon diameter analysis the ANOVA (F) followed Tamhane's T2 was used. For others variables, the ANOVA (F) followed by Tukey HSD test was used. For functional analysis, we used the Anova (F) test for repeated measures followed by post hoc LSD test ($p < 0.05$). There was no statistical difference in the axons number ($p = 0.4$). The axons, the fiber diameter and myelin sheath thickness in the denervated groups were lower than CON, EEAV and SHAM groups ($p < 0.05$). In the intragroup Sciatic Functional Index (IFC) analysis there was significant reduction of function in both D e EEAV groups in the 7th and 14th PO day with recovery in the 21th day ($p < 0.05$). In the intergroup analysis, there was statistical difference of D and EEAV groups between SHAM group in the 7th and 14th PO days. In the 14th PO day there was statistically difference between D and EEAV groups ($p < 0.05$). We conclude that the EEAV accelerated the regenerated nerve fibers maturation after axonotmesis, as well as functional recovery.

Key words: nerve regeneration, High-Voltage Electrical Stimulation, axonotmesis, morphometry, Sciatic Functional Index (SFI).

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	01
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	03
2.1 ESTRUTURA DO NERVO.....	03
2.2 CLASSIFICAÇÃO DAS LESÕES NERVOSAS PERIFÉRICAS.....	05
2.3 A LESÃO E SUAS CONSEQUÊNCIAS PARA O NERVO.....	05
2.4 A LESÃO E SUAS CONSEQUÊNCIAS PARA O MÚSCULO.....	07
2.5 INTERVENÇÃO FISIOTERAPÊUTICA E RECUPERAÇÃO FUNCIONAL APÓS LESÃO NERVOSA PERIFÉRICA.....	08
2.6 ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA DE ALTA VOLTAGEM (EEAV).....	11
3 OBJETIVO.....	15
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	16
4.1 DESENHO DO ESTUDO.....	16
4.2 AMOSTRAGEM E GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	16
4.3 ÍNDICE FUNCIONAL DO CIÁTICO (IFC).....	16
4.4 LESÃO NERVOSA.....	19
4.5 PROTOCOLO DE ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA DE ALTA VOLTAGEM (EEAV).....	21
4.6 COLETA DO MATERIAL.....	22
4.7 ANÁLISE DO NÚMERO DE AXÔNIOS.....	23
4.8 ANÁLISE MORFOMÉTRICA.....	24
4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	26
5 RESULTADOS	27
5.1 ANÁLISE QUANTITATIVA.....	27
5.1.1 NÚMERO DE AXÔNIOS.....	27
5.2 ANÁLISE MORFOMÉTRICA.....	28
5.2.1 DIÂMETRO DOS AXÔNIOS.....	28

5.2.2 DIÂMETRO DAS FIBRAS NERVOSAS.....	29
5.2.3 ESPESSURA DAS BAINHAS DE MIELINA.....	30
5.3 ANÁLISE HISTOLÓGICA.....	31
5.4 ANÁLISE FUNCIONAL DA MARCHA.....	33
5.4.1 ANÁLISE INTERGRUPOS.....	33
5.4.2 ANÁLISE INTRAGRUPOS.....	34
6 DISCUSSÃO.....	35
6.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE A METODOLOGIA.....	35
6.1.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS.....	35
6.1.2 MODELO DE LESÃO NERVOSA.....	36
6.1.3 PROTOCOLO DE ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA DE ALTA VOLTAGEM (EEAV)	37
6.1.4 REGENERAÇÃO AXONAL E ANÁLISE MORFOMÉTRICA.....	41
7 CONCLUSÃO.....	50
REFERÊNCIAS.....	51
ANEXO 1.....	63

1 INTRODUÇÃO

O sistema nervoso periférico (SNP) apresenta boa capacidade regenerativa, mas a recuperação funcional após lesão é frequentemente pobre, especialmente nos casos de axoniotmese e neurotmese, limitando o indivíduo de retornar às suas atividades funcionais normais. Para minimizar este problema, diversos estudos têm investigado diferentes formas de favorecer a regeneração nervosa e conseqüente recuperação funcional (Mendonça, Barbieri e Mazzer, 2003).

Os nervos são freqüentemente acometidos por lesões traumáticas, como o esmagamento, compressão, estiramento, avulsão e secção parcial ou total, que causam interrupção da transmissão de impulsos nervosos e diminuição ou perda da sensibilidade e motricidade no território inervado (Monte-Raso et al., 2006).

Após a lesão do SNP, tem início uma série de eventos degenerativos, havendo fragmentação do axônio e da bainha de mielina. Horas após, tem início o processo de regeneração, cujo sucesso depende, em grande parte, da severidade da lesão (Burnett e Zager, 2004).

O músculo também sofre mudanças histológicas com a degeneração nervosa, observando-se atrofia com alterações nas fibras musculares, resultando na diminuição do diâmetro destas, bem como da força muscular (Lieber, 2002).

A recuperação morfológica e funcional após uma lesão nervosa periférica raramente é completa e perfeita. Inúmeros fatores influenciam na regeneração, como a natureza e o nível da lesão, o tempo de desnervação, o tipo e diâmetro das fibras nervosas afetadas e a idade do indivíduo (Sunderland, 1985). Quanto maior a disfunção causada pela lesão, pior o prognóstico, impossibilitando o

indivíduo de realizar suas atividades laborais, o que acarreta problemas econômicos, sociais e, muitas vezes, aposentadoria precoce.

Diversas pesquisas se empenham na investigação de diferentes formas de favorecer a regeneração nervosa e a recuperação funcional. Pode-se destacar o uso do ultra-som (Monte-Raso et al., 2006), fototerapia (Gigo-Benato, Geuna e Rochkind, 2005), exercício em esteira (Sobral et al., 2008), estimulação elétrica de baixa frequência (Mendonça, Barbieri e Mazzer, 2003), entre outros.

Um dos recursos pouco explorados na clínica é a Estimulação Elétrica de Alta Voltagem (EEAV). Sua ação regenerativa na cicatrização de úlceras dérmicas (Davini et al., 2005; Low e Reed, 2001) e seus efeitos circulatórios (Davini et al., 2005; Nelson, Hayes e Currier 2003) tem sido investigados. Entretanto a literatura não aponta a influência da EEAV sobre a regeneração nervosa periférica, havendo a necessidade de estudos científicos que possam evidenciar seu papel neste processo. Além disso, é importante compreender os efeitos desta corrente em outros tecidos, possibilitando sua utilização em diferentes condições clínicas, bem como o gerenciamento de condutas terapêuticas que beneficiem o paciente após lesão nervosa periférica.

Considerando a ação regenerativa e circulatória da EEAV no tecido cutâneo, a hipótese deste estudo é que a EEAV pode acelerar a recuperação morfológica e funcional do nervo isquiático após axoniotmese em ratos.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Estrutura do Nervo

A organização estrutural do nervo permite aos axônios conduzir impulsos nervosos que facilitam a interação do indivíduo com o ambiente. Os nervos espinhais são constituídos de axônios, que são longas extensões dos corpos celulares localizados nos gânglios das raízes dorsais (neurônios sensoriais), gânglios autonômicos (neurônios autonômicos) ou coluna ventral da medula espinhal (motoneurônios) (Topp e Boyd, 2006). Os axônios apresentam um delgado envoltório lipoproteico (axônios amielínicos) (Coelho, Fortunato e Moreira, 2001) ou apresentam diversas camadas mielínicas (axônios mielínicos) (Flores, Lavernia e Owens, 2000). A fibra nervosa mielínica é constituída por um único axônio envolto por uma célula de Schwann, cuja membrana envolve a fibra nervosa e forma a bainha de mielina. A bainha de mielina é interrompida por intervalos regulares ao longo do eixo do axônio que medem de 1 a 3 mm, denominados de nodos de Ranvier, onde ocorre despolarização durante a transmissão do impulso nervoso (Flores, Lavernia e Owens, 2000; Guyton e Hall, 1997). A espessura da bainha de mielina é proporcional ao diâmetro do axônio (Welch, 1996) e, considerando a ação isolante elétrica desta bainha, ela está diretamente relacionada à velocidade de condução do impulso nervoso (Ferreira e Martinez, 2000).

As fibras nervosas amielínicas são envolvidas, em conjunto, por uma única célula de Schwann (Flores, Lavernia e Owens, 2000). Essas fibras apresentam um delgado envoltório lipoprotéico e estão presentes em maior número no sistema nervoso autônomo (Coelho, Fortunato e Moreira, 2001).

Anatomicamente, o nervo é envolto por três camadas distintas de tecido conjuntivo: epineuro, perineuro e endoneuro (Dagum, 1998; Rempel, Dahlin e Lundborg; 1999; Topp e Boyd, 2006). O endoneuro envolve a fibra nervosa e é constituído por tecido conjuntivo frouxo e fibras colágenas tipo I em maior quantidade que do tipo III. O perineuro é formado por tecido conjuntivo denso modelado e fibras colágenas tipo I (camada externa) e tipo III (camada interna) e envolve os fascículos nervosos individualmente. O epineuro reveste externamente o nervo e possui uma camada externa e outra interna. A camada externa contém tecido conjuntivo denso modelado ou não modelado, enquanto a camada interna possui tecido conjuntivo denso. As camadas têm predomínio de fibras colágenas tipo I, grande quantidade de fibrócitos e fibroblastos, além de possuírem vasos sanguíneos de maior calibre (Guimarães et al., 2006).

O SNP apresenta um sistema vascular intrínseco, bem desenvolvido ao nível das bainhas conjuntivas, sendo os grandes vasos encontrados no epineuro e perineuro e os capilares encontrados apenas no endoneuro, enquanto o sistema extrínseco compreende todos os vasos da região anatômica próxima ao tronco nervoso (Dagum, 1998; Flores, Lavernia e Owens, 2000; Pachioni et al., 2006).

A comunicação entre o corpo celular e o órgão alvo se dá por meio de um sistema de transporte axonal anterógrado e retrógrado. O transporte anterógrado pode ser rápido, que transporta neurotransmissores, ou lento, que transporta proteínas. O sistema retrógrado recicla neurotransmissores e transporta fatores neurotróficos para o corpo celular (Dagum, 1998).

2.2 Classificação das lesões nervosas periféricas

As lesões nervosas periféricas podem ser produzidas por vários mecanismos que incluem: traumas por esmagamento, laceração direta, estiramento e compressão. Os nervos apresentam-se como estruturas elásticas que permitem certo grau de distensibilidade. Quando a capacidade de distensão é excedida, a estrutura é danificada e a passagem dos impulsos nervosos é interrompida (Flores, Lavernia e Owens, 2000; Burnett e Zager, 2004).

Seddon (1943), citado por Dourado et al. (2003) classificou as lesões nervosas periféricas em três tipos: neuropraxia, caracterizada por um bloqueio temporário da condução nervosa; axonotmese, caracterizada por um bloqueio da condução nervosa devido a perda de continuidade do axônio, com preservação da membrana epineural; e neurotmese, quando o bloqueio da condução nervosa é dado por uma perda da continuidade do nervo, sendo esta a forma mais grave de lesão.

Sunderland (1978), citado por Burnett e Zager (2004) classificou as lesões nervosas em cinco categorias, de acordo com sua severidade. O primeiro grau é equivalente a neuropraxia de Seddon; o segundo grau equivale a axonotmese; o terceiro grau, que reflete uma lesão parcial do endoneuro (esta categoria está entre axonotmese e neurotmese de Seddon); o quarto e quinto graus, que correspondem a neurotmese de Seddon, sendo que no quarto grau, todas as porções do nervo são rompidas, exceto o epineuro e no quinto grau ocorre completa lesão do nervo.

2.3 A lesão e suas consequências para o nervo

Imediatamente após a lesão, ocorrem alterações metabólicas e morfológicas no corpo celular, no segmento nervoso distal e proximal, bem como no músculo.

No segmento distal, ocorre degeneração Walleriana que, inicialmente, envolve mudanças histológicas com fragmentação do axônio e da mielina. Ocorre um desarranjo dos neurotúbulos e neurofilamentos e o contorno axonal se torna irregular. Dentro de 48 a 96 horas, a continuidade axonal e a condução do impulso nervoso são perdidas. No segmento proximal, ocorre degeneração retrógrada que avança desde o sítio da lesão até o primeiro nódulo de Ranvier proximal. Em caso de lesões próximas ao corpo celular, este pode ser envolvido, ocorrendo sua degeneração (Burnett e Zager, 2004).

O corpo celular sofre alterações morfológicas, na expressão gênica e no metabolismo celular. Evidencia-se a cromatólise, caracterizada pela dispersão da substância de Nissl, desintegração e condensação granular do retículo endoplasmático rugoso, migração do núcleo para periferia da célula, com aumento na síntese protéica e de RNA (Evans, 2001).

As células de Schwann exercem importante papel durante a degeneração Walleriana, iniciando sua atividade 24 horas após a lesão, havendo um aumento do citoplasma e aceleração do ritmo mitótico. Com a participação dos macrófagos, as células de Schwann realizam a fagocitose dos restos degenerados, limpando o local da lesão (Fawcett e Keynes, 1990; Burnett e Zager, 2004). Após remoção do material fagocitado os macrófagos retornam aos capilares. As células de Schwann, por meio de interdigitação de seus citoplasmas, formam cordões lineares denominados “bandas de Bungner” ou colunas de

células de Schwann, que são importantes guias para o brotamento axonal durante a reinervação (Burnett e Zager, 2004).

A regeneração axonal inicia-se poucas horas após a lesão. De cada axônio, partem de 2 a 3 brotos que seguirão até o órgão-alvo, mediados por fatores tróficos secretados pelas células de Schwann (Fawcett e Keynes, 1990; Johnson, Zoubos e Soucacos, 2005).

Duas semanas após a axoniotmese em ratos, tem início a reinervação muscular, quando 25% das fibras já estão inervadas por mais de um axônio. No período que compreende entre 14 e 25 dias após a lesão, a acetilcolina já pode ser liberada no músculo reinervado e, após o estabelecimento da conexão sináptica, o crescimento de neuritos em direção à terminação motora é inibido, ocorrendo a eliminação sináptica (Gorio et al., 1983).

A taxa de regeneração axonal estimada é de 1mm ao dia no homem e é dependente de vários fatores, dentre eles a natureza e severidade da lesão, a duração da desnervação, a condição do tecido periférico e a idade do indivíduo (Burnett e Zager, 2004). O ritmo de crescimento axonal em ratos varia de 3 a 4 mm/dia (Gorio et al., 1983).

2.4 A lesão e suas conseqüências para o músculo

A inervação é essencial para a preservação das propriedades fisiológicas e funcionais das fibras musculares.

A desnervação causa diminuição da isoforma lenta da cadeia pesada de miosina, com conseqüente aumento da isoforma rápida (Pette e Staron, 2001; Baldwin e Haddad, 2002). Além disso, promove atrofia (Ijkema-Paassen et al., 2004; Fernandes et al., 2005) devido à diminuição ou ausência de síntese

protéica e aumento da proteólise miofibrilar, seguidas do aumento de proteases lisossomais e de cálcio intracelular (Engel e Franzini-Armstrong, 1994). O aumento do influxo de cálcio no músculo causa perda das proteínas metabólicas e contráteis, caracterizando a atrofia muscular (Lieber, 2002).

No homem, dois meses após a desnervação, observa-se uma redução de 70% da área de secção transversa dos músculos e os núcleos celulares assumem a posição central (Burnett e Zager, 2004).

Após desnervação do músculo esquelético também ocorre aumento da densidade de tecido conjuntivo (Fernandes et al., 2005). Salonen et al. (1987) observaram que a lesão do nervo isquiático causa alterações fibróticas no músculo esquelético, com aumento do colágeno tipo I e III no endomísio e perimísio, sendo mais pronunciado o aumento do colágeno tipo I no perimísio. Como o colágeno tipo I é mais rígido, seu aumento expressivo poderia levar à perda da elasticidade muscular, prejudicando a função no caso de reinervação (Fernandes et al., 2005).

2.5 Intervenção fisioterapêutica e recuperação funcional após lesão nervosa periférica

Diversos estudos têm investigado diferentes formas de favorecer o processo de regeneração nervosa e recuperação funcional. Dentre eles, destacam-se o laser (Gigo-Benato, Geuna e Rochkind, 2005), o ultra-som (Monte-Raso et al, 2006), a estimulação elétrica de baixa frequência (Mendonça, Barbieri e Mazzer, 2003; Souza, 2005; Fernandes et al., 2005; Oliveira et al., 2008) e exercícios (Sobral et a., 2008).

Quanto à estimulação elétrica muscular de baixa frequência, Fernandes et al. (2005) observaram redução da atrofia muscular e da proliferação de tecido conjuntivo no músculo a partir da utilização dessa corrente, enquanto Souza (2005) e Oliveira et al. (2008) observaram benefícios à maturação das fibras nervosas regeneradas.

Poucos estudos investigaram a influência desse recurso aplicado diretamente no nervo lesado. Mendonça, Barbieri e Mazzer (2003) pesquisaram o efeito da estimulação elétrica de baixa frequência aplicada diretamente sobre o nervo isquiático de ratos. Utilizaram uma amostra de 43 ratos divididos em 4 grupos: (1) nervo intacto com circuito inativo; (2) nervo esmagado com circuito inativo; (3) nervo intacto com circuito ativo e (4) nervo esmagado com circuito ativo. Eles observaram que a recuperação morfológica e funcional foi mais efetiva nos animais submetidos à estimulação elétrica, devido ao aumento do fluxo sanguíneo decorrente da presença de maior número de vasos e maior diâmetro dos *vasa nervorum*.

Além da estimulação elétrica, outros recursos fisioterapêuticos também foram utilizados.

Monte-Raso et al. (2006) aplicaram ultra-som (US) sobre a pele adjacente ao nervo isquiático esmagado de ratos, 24 horas após a lesão, durante 10 dias consecutivos (modo de pulso: 1:5, frequência: 1 MHz, intensidade: 0,4 w/cm², duração da aplicação = 2 minutos). Por meio dos resultados do Índice Funcional do Ciático (IFC) nos períodos pré-operatório, 7^o, 14^o, 21^o dia pós-operatório, observaram recuperação funcional de 75% no grupo tratado e de 55% no grupo não tratado, concluindo que o US de baixa intensidade acelerou a regeneração do nervo.

Gigo-Benato, Geuna e Rochkind (2005) realizaram uma metanálise envolvendo a utilização do laser com comprimentos de onda 632,8; 650; 780; 808; 820; 904 e 905 nm, no tratamento da lesão nervosa periférica, concluindo que este recurso apresenta ação regenerativa quando aplicado sobre a lesão, tanto em casos de axoniotmese como de neurotmese.

Sobral et al. (2008), após lesão por esmagamento do nervo isquiático, submeteram os ratos a exercício em esteira (velocidade= 8 m/min, inclinação=0%, por 30 minutos, durante 14 dias) 24 horas e 14 dias após a lesão. Em seguida, realizaram análise morfométrica do nervo regenerado e análise funcional da marcha. Observaram que o protocolo de exercício aplicado, tanto na fase imediata como tardia, não influenciou o brotamento axonal, o grau de maturação das fibras regeneradas, nem a funcionalidade dos músculos reinervados, sugerindo que os benefícios do exercício físico para o músculo poderiam sustentar sua aplicabilidade, especialmente no sentido de retardar a atrofia, o que poderia refletir diretamente em recuperação funcional mais efetiva após a regeneração nervosa.

Um recurso fisioterapêutico pouco explorado na clínica é a estimulação elétrica de alta voltagem (EEAV). Fundamentada por evidências científicas (Mendel, et al., 1992, Peters et al., 2001, Garcia e Guirro, 2005) a EEAV vem ganhando aceitação, tanto na pesquisa quanto na área clínica.

A maioria dos experimentos realizados até o momento priorizou a ação circulatória da EEAV, apontando efeitos de redução da formação de edema, diminuição do extravasamento de macromoléculas por meio da inibição da permeabilidade vascular (Taylor et al., 1997) e sua ação regenerativa, relacionada

à cicatrização de úlceras cutâneas, pois apresenta efeito bactericida (Szuminsky et al., 1994).

Low e Reed (2001) citam que a EEAV atua no sistema vascular com efeito de bombeamento, aumentando o fluxo sanguíneo nos músculos e tecidos vizinhos, além de ter efeito direto sobre os nervos autonômicos, levando à dilatação local e aumentando a troca de líquidos nos tecidos.

Roederer, Goldberg e Cohen (1983) e Román et al. (1987) demonstraram que a aplicação de campos elétricos negativos pode aumentar a regeneração de nervos periféricos de mamíferos. Entretanto, a literatura não apresenta estudos que apontem a influência da EEAV sobre a regeneração nervosa periférica, havendo necessidade de estudos desenvolvidos com critérios científicos que permitam evidenciar e compreender seu papel nesse processo.

2.6 Estimulação Elétrica de Alta Voltagem (EEAV)

As correntes elétricas utilizadas na eletroterapia podem ser de três tipos: corrente contínua - fluxo unidirecional contínuo ou ininterrupto de partículas carregadas; corrente alternada - fluxo bidirecional contínuo ou ininterrupto de partículas carregadas; e corrente pulsada - fluxo unidirecional (monofásicas), ou bidirecional (bifásicas) de partículas carregadas que periodicamente param por um período de tempo (Robinson e Snyder-Mackler, 2001).

A voltagem (V) pode ser definida como a diferença de potencial entre dois pólos e as correntes podem ser de alta ou baixa voltagem. A frequência (Hz ou pps) é definida como o número de ciclos emitidos por segundo e as correntes podem ser de baixa, média e alta frequência (Starkey, 2001).

Dentre as correntes pulsadas, destaca-se a EEAV, que apresenta duração de pulso muito curta combinada com corrente pico muito alta e permite uma estimulação confortável. Essa combinação é eficaz para estimular as fibras sensoriais, motoras e condutoras da dor (Nelson, Hayes e Currier, 2003).

Robinson e Snyder-Mackler (2001) destacam que a EEAV possui um pulso monofásico de dois picos, com amplitude de pico máximo de até 500 V, durações de pulso de aproximadamente 50 a 200 ms e frequências que variam de 1 até aproximadamente 120 pulsos de dois picos por segundo.

Os estimuladores EEAV afetam diretamente em nível celular e os efeitos indiretos ocorrem em níveis teciduais, segmentares e sistêmicos. Considerando que esses estimuladores possuem polaridade (onda monofásica), podem ser efetivos para conter e absorver edemas, acelerar a reparação de tecidos dérmicos e subdérmicos e controlar a dor (Low e Reed, 2001).

Robinson e Snyder-Mackler (2001) apontam a importância do posicionamento dos eletrodos com orientação monopolar para aplicação desta corrente. Sugerem que o eletrodo ativo seja colocado sobre o local a ser tratado, devendo apresentar área duas vezes menor que a do eletrodo dispersivo, o qual deve manter certa distância da área alvo.

Karnes et al. (1995), visando redução de edema, realizaram uma única aplicação de EEAV em 5 animais utilizando polaridade catódica e, em outros 5, utilizaram polaridade anódica. Outros 4 animais receberam tratamento com polaridade catódica e anódica e 3 animais controle receberam histamina sem EEAV, durante 30 minutos. Observaram que a EEAV com polaridade anódica em nível sensorial reduziu o diâmetro arteriolar, o que poderia alterar o fluxo

sanguíneo. Sugeriram que a polaridade é uma variável importante para mudança no diâmetro arteriolar.

Davini et al. (2005) estudaram a ação da EEAV na pele, sendo que a ação circulatória (controle de edema) foi mais efetiva quando a aplicação foi realizada com polaridade negativa no limiar motor. Quanto à ação regenerativa, maior velocidade de regeneração foi alcançada quando o eletrodo estava sobre a lesão, iniciando a aplicação com polaridade negativa e depois alternando a polaridade.

Taylor et al. (1997) discutem que o controle do edema promovido pela EEAV está relacionado à capacidade da corrente de reduzir a permeabilidade capilar, restringindo assim a passagem de macromoléculas através dos vasos.

Segundo Low e Reed (2001), a contração muscular rítmica e o seu relaxamento durante a aplicação de EEAV promovem um efeito de bombeamento, aumentando o fluxo sanguíneo no músculo e tecidos vizinhos, sendo esse efeito coadjuvante na redução do edema.

Walker, Currier e Threlkeld (1988) propuseram um estudo para investigar se a EEAV poderia aumentar o fluxo sanguíneo do músculo esquelético em indivíduos saudáveis, que foram divididos em três grupos: 1. Estimulado (EEAV, n=16) aplicou-se EEAV com contração isométrica induzida com 30Hz; 2. Exercício (EX, n=14) realizou contração isométrica voluntária máxima (CVM) em 10% e 30% com máxima intensidade por 5 minutos; 3. Controle (C, n=8). Para avaliar a pressão sanguínea utilizaram o esfigmomanômetro, para auscultar a artéria braquial. O fluxo sanguíneo arterial dos músculos da panturrilha foi avaliado por um aparelho Doppler direcional. No grupo estimulado, o fluxo sanguíneo e a pressão sanguínea não sofreram alteração, mas no grupo EX 30% CVM, o fluxo sanguíneo aumentou e a pressão sanguínea sistólica diminuiu. Concluíram que a

EEAV, da forma como aplicada, não promoveu aumento do fluxo sanguíneo muscular.

Fitzgerald e Newsome (1993) realizaram um estudo de caso onde o indivíduo apresentava uma ferida infectada por *Staphylococcus aureus*, com 17 cm de comprimento; 7,5 cm de largura superior; 5,5 cm de largura média; 2cm de largura inferior e 5 cm de profundidade. Aplicaram EEAV sobre a ferida por 60 minutos (20 minutos na polaridade negativa seguida por 40 minutos na polaridade positiva) uma vez ao dia, associado com antibióticos. Após duas semanas de tratamento, passaram a aplicar EEAV duas vezes ao dia. A ferida foi completamente fechada após 10 semanas de tratamento e os autores destacam que a EEAV pode ter acelerado a cura da ferida.

Szuminsky et al. (1994) realizaram um estudo com objetivo de investigar a ação bactericida da EEAV *in vitro* nas duas polaridades em diferentes espécies de bactérias. Observaram efeito bactericida direta e indiretamente no eletrodo positivo e negativo. Kitchen (2003) descreve o efeito bactericida quando o eletrodo cátodo for aplicado sobre a região afetada.

Por se tratar de um recurso que vem sendo explorado recentemente na clínica fisioterapêutica, torna-se importante compreender os efeitos da EEAV em diferentes tecidos, o que permitirá sua adequada utilização em diferentes condições clínicas.

Considerando os relatos da literatura sobre o efeito regenerativo da EEAV, este estudo se propõe a investigar sua ação sobre a regeneração nervosa periférica, o que pode contribuir para o gerenciamento das condutas fisioterapêuticas no tratamento de lesões nervosas periféricas.

3 OBJETIVO

Investigar o efeito da estimulação elétrica de alta voltagem sobre as características morfométricas e funcionais do nervo isquiático regenerado após axoniotmese.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Desenho do estudo

O estudo caracterizou-se por uma pesquisa do tipo experimental. Foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal, da Universidade Federal de São Carlos, sob protocolo nº 037/2008 (Anexo1).

4.2 Amostragem e grupos experimentais

Utilizou-se 20 ratos Wistar machos, com idade entre 6 e 7 semanas, pesando em média 210,80 ($\pm 10,79$ g), obtidos do Biotério Central da Universidade Metodista de Piracicaba. Os animais foram divididos em 4 grupos (n=5): Controle (CON) - animais sem lesão e sem EEAV; Desnervado (D) - lesão por esmagamento do nervo isquiático; Desnervado + EEAV (EEAV) - lesão por esmagamento do nervo isquiático e EEAV aplicada diariamente; SHAM – sem lesão, porém submetidos a EEAV diariamente (SHAM).

4.3 Índice Funcional do Ciático (IFC)

Todos os animais foram treinados a caminhar na passarela de marcha (De Medinacelli, Freed e Wyatt, 1982; Bain, Mackinnon e Hunter, 1989) - Figura 1. Em seguida, obteve-se o registro das impressões das pegadas no período pré operatório, que serviram como parâmetro inicial de avaliação, para comparação com os registros pós operatórios no 7º, 14º e 21º dias.



Figura 1- Aparato utilizado para análise da marcha. Observar as pegadas do animal marcadas no papel branco.

Para obter as impressões das pegadas, a face plantar das patas posteriores dos animais foram marcadas com tinta preta de impressão digital. A seguir, os animais foram colocados para caminhar num corredor medindo 42 x 8,2 cm, que termina numa caixa em uma das extremidades, com fraca luminosidade no interior, onde o animal tende a se abrigar, deixando as suas pegadas impressas em tiras de papel sulfite A4 branco (De Medinacelli, Freed e Wyatt, 1982; Varejão et al. 2004).

Em seguida, foram obtidas as distâncias entre a extremidade do terceiro dedo e o calcâneo – comprimento da pegada (CP) ou *Print Length* (PL); entre o primeiro e o quinto dedo – largura da pegada (LP) ou *Total Spreading* (TS) e entre o segundo e quarto dedo – largura intermediária da pegada (LIP) ou *Intermediary Toes* (ITS) –(Figura 2).

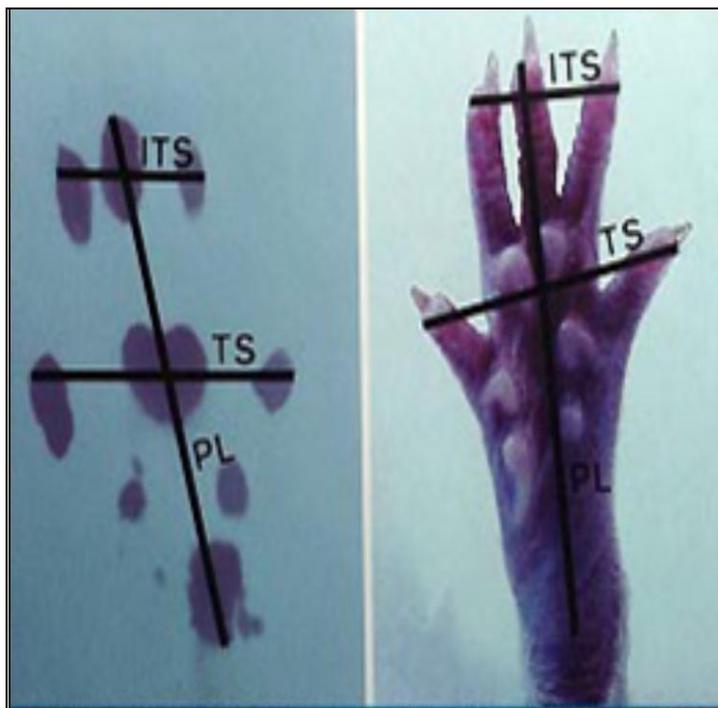


Figura 2- Parâmetros de medidas para cálculo do Índice Funcional do Ciático (IFC). Fonte: Varejão et al. (2004).

As medidas foram obtidas da pata experimental (E) e normal (N), por meio de um paquímetro digital *MITUTOYO*[®]. Os valores foram aplicados na equação proposta por Bain, Mackinnon e Hunter (1989), no período pré operatório e no 7^o, 14^o e 21^o dia pós operatório:

$${}^1\text{SFI} = -38,3 \times \frac{\text{EPL} - \text{NPL}}{\text{NPL}} + 109,5 \times \frac{\text{ETS} - \text{NTS}}{\text{NTS}} + 13,3 \times \frac{\text{EITS} - \text{NITS}}{\text{NITS}} - 8,8$$

¹ SFI (Sciatic Functional Index) ou IFC (Índice Funcional do Ciático), E (Experimental), N (Normal), PL (*Print Length*), TS (*Total Spreading*) e ITS (*Intermediary Toes*).

Os resultados obtidos dessa equação expressam a perda funcional em termos percentuais, sendo que o valor 0 (zero) representa a função normal ou ausência de disfunção e o valor -100 (menos cem) representa a perda total da função nervosa. Portanto, quanto mais próximo de zero o valor obtido, melhor a função.

4.4 Lesão nervosa

Os animais dos grupos D e EEAV foram submetidos à cirurgia para esmagamento do nervo isquiático, recebendo anestesia intramuscular de uma mistura de Ketalar (50 mg/mL) e Rompun (2 g/100mL), na proporção 1:1, na dose de 0,3 mL/100 g de massa corporal.

Em seguida, foi realizada a tricotomia na região glútea esquerda, onde se realizou uma incisão de aproximadamente 2 cm sobre a pele e os músculos foram divulsionados até a exposição do nervo isquiático. O nervo foi delicadamente separado do tecido conjuntivo adjacente e, a uma distância de 5 mm proximal ao ponto de sua ramificação, foi esmagado com uma pinça hemostática previamente preparada. Realizaram-se quatro pinçamentos com duração de 20 segundos e intervalo de um segundo entre eles, de acordo com Fernandes et al. (2005) - Figura 3.

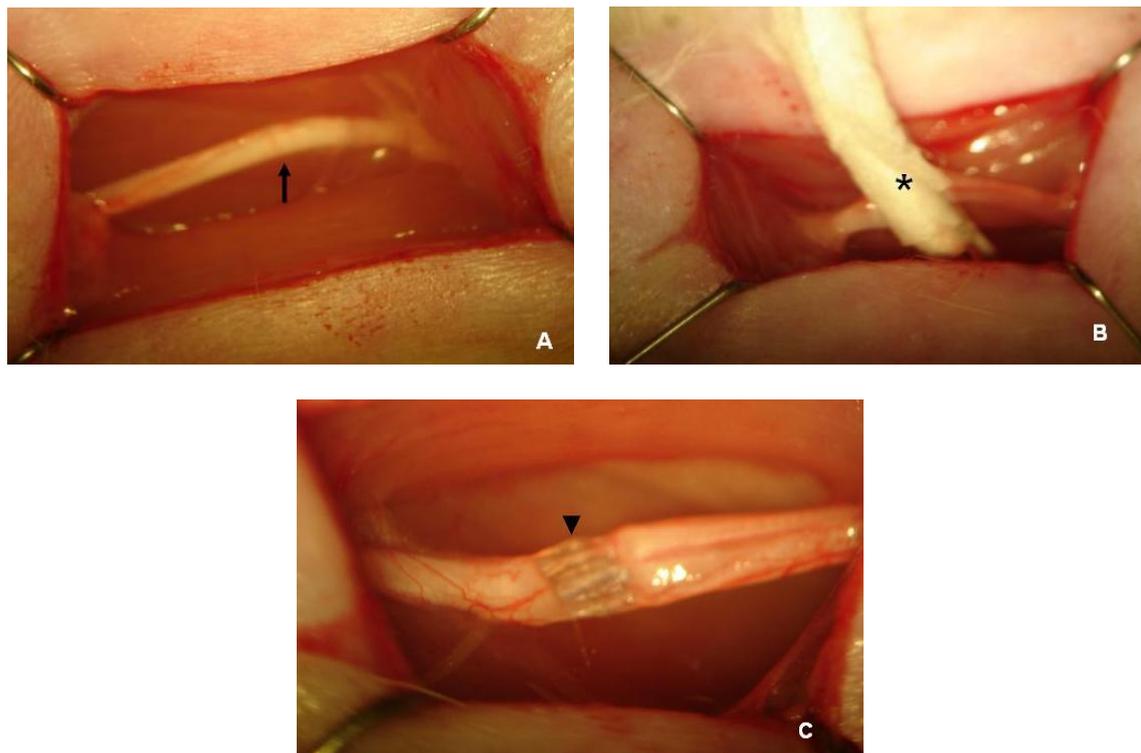


Figura 3- A: Nervo isquiático exposto (seta); B: Pinçamento do nervo (asterístico); C: Aspecto macroscópico do nervo após esmagamento (cabeça de seta).

Os animais do grupo SHAM foram submetidos ao mesmo procedimento, entretanto, o nervo isquiático foi exposto e mantido intacto. Ao término desse procedimento, os planos musculares e cutâneos foram fechados com fio de sutura Ethicon 6-0 e os animais foram mantidos em gaiolas individuais de polietileno até o 3º dia. A partir do 4º dia os animais foram agrupados, sendo submetidos a ciclo claro/escuro de 12 horas e livre acesso à ração e água, sob temperatura controlada ($23 \pm 2^\circ \text{C}$), durante 21 dias.

Nos dois primeiros dias pós operatório, receberam $4 \mu\text{L}$ de Dipirona Sódica (500 mg/mL) - via oral, a cada 12 horas, com efeito analgésico.

4.5 Protocolo de Estimulação Elétrica de Alta Voltagem (EEAV)

Para eletroestimulação utilizou-se o equipamento Neurodyn High Volt – ANVISA 10360310008 - IBRAMED® (Figura 4). O equipamento foi aferido por meio de um Osciloscópio Tektronix TDS 210, estando todos os parâmetros físicos da corrente de acordo com o especificado no equipamento. O timer do equipamento também foi aferido a partir de três cronômetros da marca Technos. Essa variável estava de acordo com o especificado no equipamento.

A aplicação de EEAV nos grupos EEAV e SHAM foi realizada sob anestesia (Ketalar e Rompum - dose de 0,15 mL/100 g de massa corporal) e teve início 24 horas após a lesão nervosa, com estimulação catódica até o limiar motor, durante 30 minutos (Frequência de 100 Hz; Voltagem de 100 V; duração pulso de 20 μ seg e duração interpulso de 100 μ seg), 5 vezes por semana (segunda a sexta-feira), durante 21 dias. Um eletrodo ativo de silicone-carbono, medindo 2,0 x 2,0 cm, foi posicionado sobre a cicatriz cirúrgica e outro, dispersivo de silicone-carbono, medindo 4,0 x 4,0 cm, foi posicionado paralelamente ao ativo, preservando-se uma distância de 1 cm entre eles (Figura 5). Utilizou-se gel como meio de acoplamento.



Figura 4- Equipamento utilizado para intervenção: Neurodyn High Volt –IBRAMED.



Figura 5- Posicionamento dos eletrodos. Eletrodo ativo (*), eletrodo dispersivo (**).

4.6 Coleta do Material

Após 21 dias de aplicação da EEA, os animais foram pesados e anestesiados da mesma forma que para a cirurgia de esmagamento do nervo. A coleta do nervo foi realizada 24 horas após a última intervenção.

O nervo isquiático esquerdo foi exposto cirurgicamente e fixado *in situ* à 4^o C, durante 10 minutos, com fixador de Karnovsky (1965) modificado, contendo 1 % de paraformaldeído e 2 % de glutaraldeído em tampão cacodilato de sódio a 0,1 M, pH 7.3. Em seguida, a porção distal à lesão do nervo foi retirada e os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical.

Os fragmentos do nervo isquiático dos animais dos 4 grupos foram mantidos em solução fixadora (Karnovsky) por 24 horas e pós-fixados em tetróxido de ósmio a 1 % em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7.3, por duas horas, imersos em uranila 5 % durante 24 horas, para coloração em bloco, desidratados em soluções crescentes (30 % a 100 %) de acetona e incluídos em resina Araldite 502 (Electron Microscopy Sciences®).

Foram obtidos cortes transversais de 1 μm com navalha de vidro, em ultramicrótomo LKB, que foram corados com Azul de Toluidina a 1 %, em solução aquosa de bórax a 1 %, para microscopia óptica.

4.7 Análise do número de axônios

Para o cálculo da porcentagem da amostra, realizou-se a somatória da área dos 5 campos (objetiva de 100 x) multiplicada por 100, dividindo-se pela somatória da área do nervo (objetiva 10 x). Em seguida, foi calculado o número total de axônios (somatória do número de axônios multiplicado por 100, dividido pela porcentagem da amostra). A figura 6 mostra como a área do nervo foi obtida.

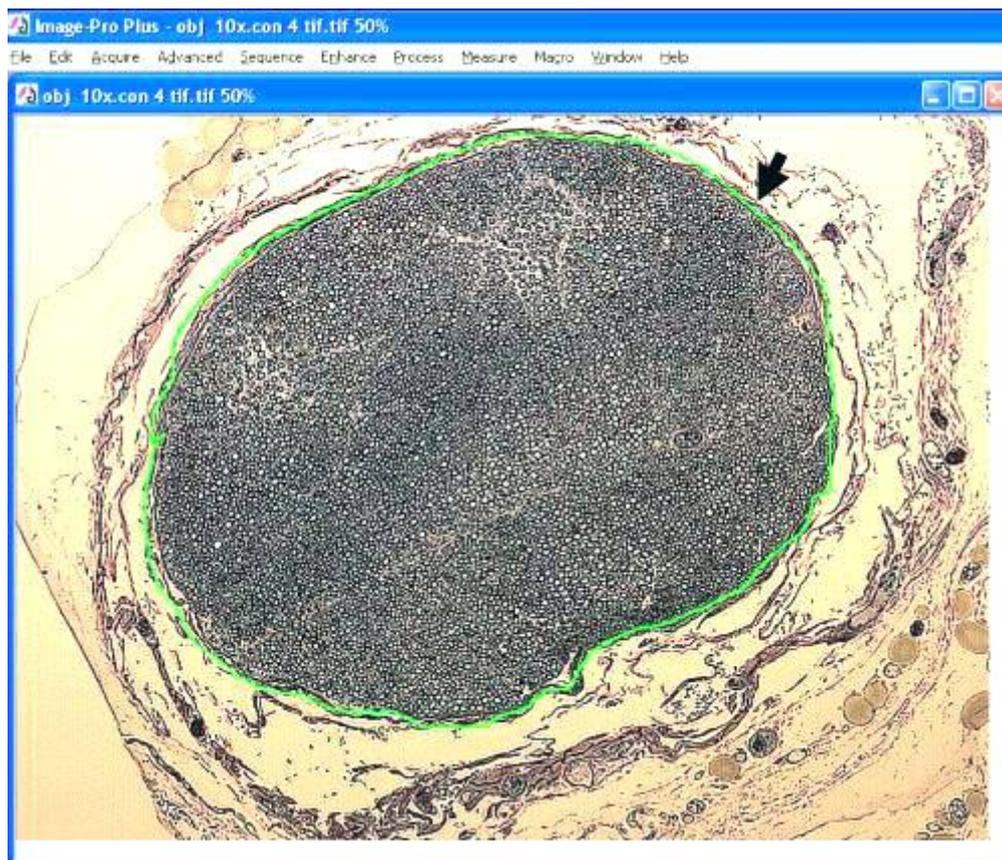


Figura 6- Tela do software Image-Pro Plus 6.2 - Media Cybernetics®, mostrando o procedimento utilizado para mensuração da área do nervo. Aumento=100 x.

4.8 Análise Morfométrica

A análise morfométrica foi feita a partir de cortes da porção distal do nervo nos animais dos grupos D e EEAV, bem como do segmento correspondente nos animais dos grupos CON e SHAM, em microscópio de luz Olympus® - BX 41-BF, acoplado a uma câmera de vídeo Infinity Lite®. As imagens obtidas foram transferidas para um computador Pentium IV, que conta com o *software* Image-Pro Plus 6.2 – Media Cybernetics®, para análise de imagens. A calibração do sistema de análise de imagens para obtenção de medidas na unidade de

micrômetros (μm) foi realizada com o auxílio de uma lâmina de calibração micrometrada ZEISS 5_{+100/100} mm.

Analisou-se um corte por animal em cada grupo, do qual foram obtidas imagens em objetiva de 10 x, para a observação de todo o nervo e em objetiva de 100 X, para a seleção dos campos para amostra. A amostra consistiu de 5 campos aleatoriamente definidos em cada corte.

As medidas foram realizadas de forma semi-automática, sendo que em cada fibra nervosa mielínica foram obtidos valores do diâmetro dos axônios e das fibras nervosas (em micrômetros). A partir desses dados, a espessura da bainha de mielina foi calculada (Figura 7).

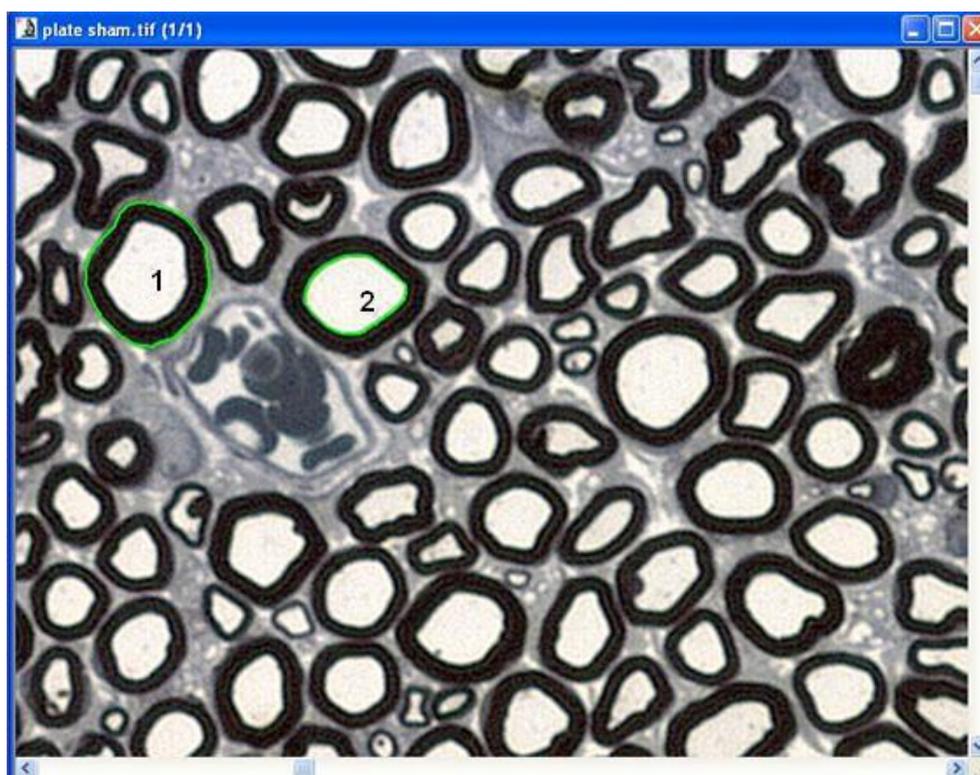


Figura 7- Tela do software Image-Pro Plus 6.2 - Media Cybernetics®, mostrando o procedimento utilizado para mensuração do diâmetro das fibras (1) e dos axônios (2). Aumento=1000 x.

Os valores referentes ao diâmetro de cada axônio e fibra nervosa foram transferidos para o *Excel (Windows – XP – Microsoft®)* e constituíram uma lista de dados.

O diâmetro médio dos axônios de cada nervo foi obtido a partir da somatória dos diâmetros dos axônios, dividido pelo número de axônios mensurados. O cálculo do diâmetro médio das fibras seguiu a mesma lógica. Os valores de espessura das bainhas de mielina foram obtidos subtraindo-se o diâmetro do axônio do diâmetro da fibra e, em seguida, dividindo-se por dois. A espessura média das bainhas de mielina também foi obtida dividindo-se a somatória das espessuras das bainhas de mielina pelo número de fibras nervosas analisadas.

4.9 Análise Estatística

Para análise estatística dos resultados foi utilizado o *software Statistical Package for Social Science for Personal Computer (SPSS/PC versão 13.0)*.

Utilizou-se o teste de *Shapiro Wilk* para avaliar a normalidade dos dados.

Para análise morfométrica, inicialmente realizou-se análise exploratória dos dados. Para comparação do diâmetro do axônio utilizou-se o teste Anova (F) seguido Tamhane's T_2 e para demais variáveis utilizou o teste Anova (F) seguido de Tukey HSD.

Para análise funcional, utilizou-se o teste Anova (F) para medidas repetidas, seguido de *Post hoc* LSD (comparação intergrupos e intragrupos).

Para todos os dados, considerou-se o nível de significância de 5 %.

5 RESULTADOS

5.1 Análise Quantitativa

5.1.1 Número de Axônios

A figura 8 expressa o número médio de axônios nos diferentes grupos. No grupo CON, o número de axônios foi $9161,60 \pm 1394,14$; no grupo D, foi $11140,60 \pm 1152,53$; no grupo EEAV, foi $9780,60 \pm 2061,95$ e no grupo SHAM foi $10078,00 \pm 2261,94$. Não houve diferença significativa entre os grupos ($p= 0,4$).

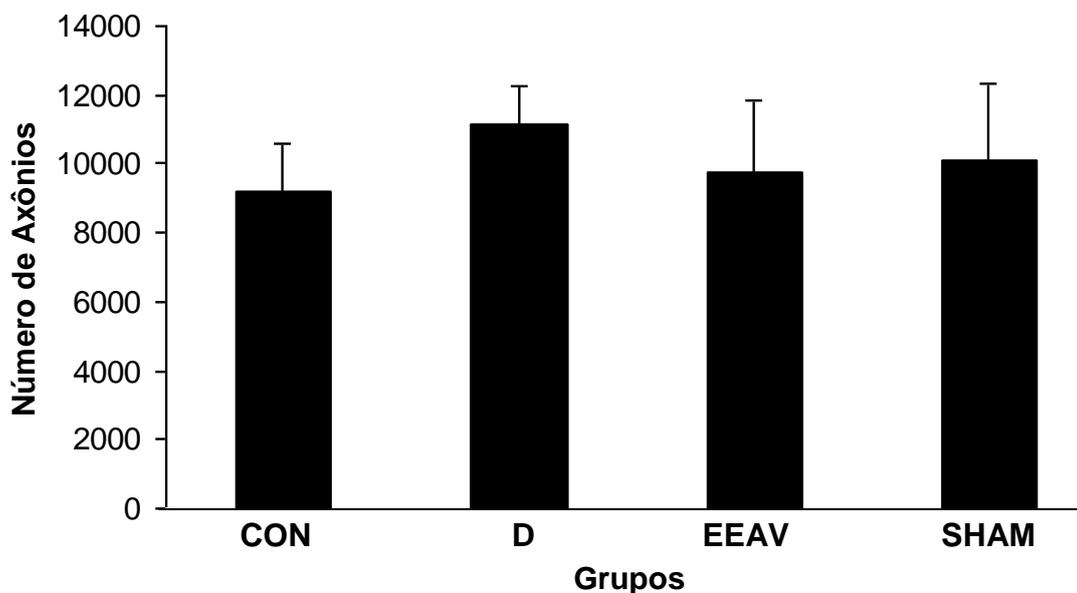


Figura 8- Número médio \pm DP de axônios nos grupos: controle (CON), Desnervado (D), Desnervado + Estimulação Elétrica de Alta Voltagem (EEAV), Sem lesão + Estimulação Elétrica de Alta Voltagem (SHAM) ($p= 0,4$).

5.2 Análise Morfométrica

5.2.1 Diâmetro dos Axônios

O diâmetro médio dos axônios no grupo D ($3,53 \pm 0,43 \mu\text{m}$) foi menor que nos grupos CON ($6,73 \pm 0,38 \mu\text{m}$) ($p=0,00001$), EEAV ($5,38 \pm 0,34 \mu\text{m}$) ($p=0,0005$) e SHAM ($6,43 \pm 1,16 \mu\text{m}$) ($p=0,01$). Entre os grupos CON e SHAM e os grupos EEAV e SHAM não houve diferença ($p= 0,9$; $p= 0,5$), respectivamente (Figura 9).

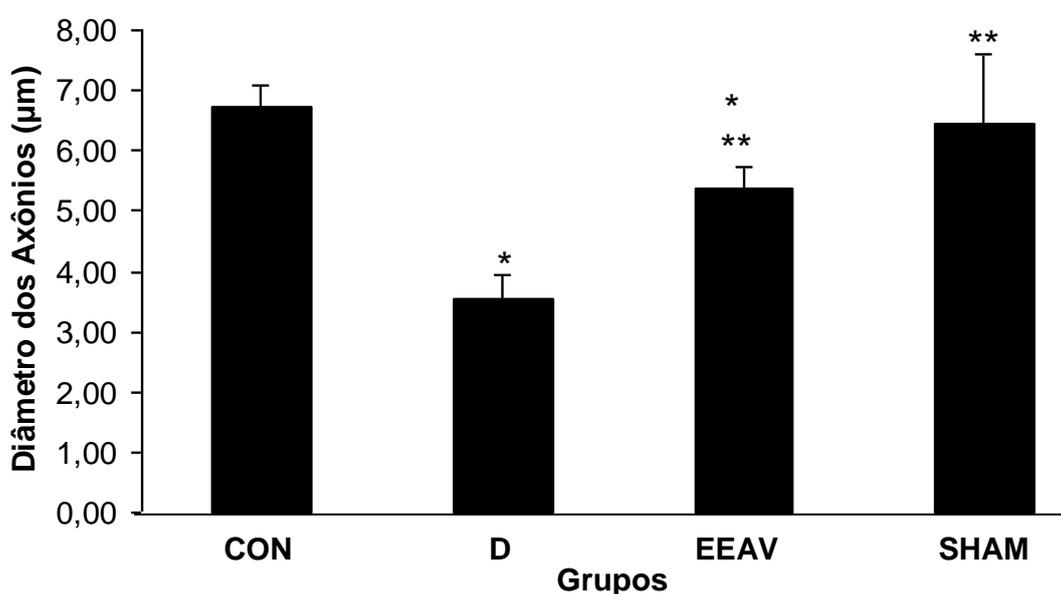


Figura 9- Diâmetro médio \pm DP dos axônios nos grupos: Controle (CON), Desnervado (D), Desnervado + Estimulação Elétrica de Alta Voltagem (EEAV) e sem lesão + Estimulação Elétrica de Alta Voltagem (SHAM). (*) Difere do grupo CON; (**) Difere do grupo D.

5.2.2 Diâmetro das Fibras Nervosas

O diâmetro médio das fibras nervosas no grupo D ($6,66 \pm 0,67 \mu\text{m}$) foi menor que nos grupos CON ($11,45 \pm 0,49 \mu\text{m}$), EEAV ($11,05 \pm 0,59 \mu\text{m}$) e SHAM ($11,48 \pm 1,21 \mu\text{m}$) ($p=0,00001$). Entre os grupos CON e EEAV ($p= 0,8$); CON e SHAM ($p=0,9$), EEAV e SHAM ($p= 0,8$) não se observou diferença (Figura 10).

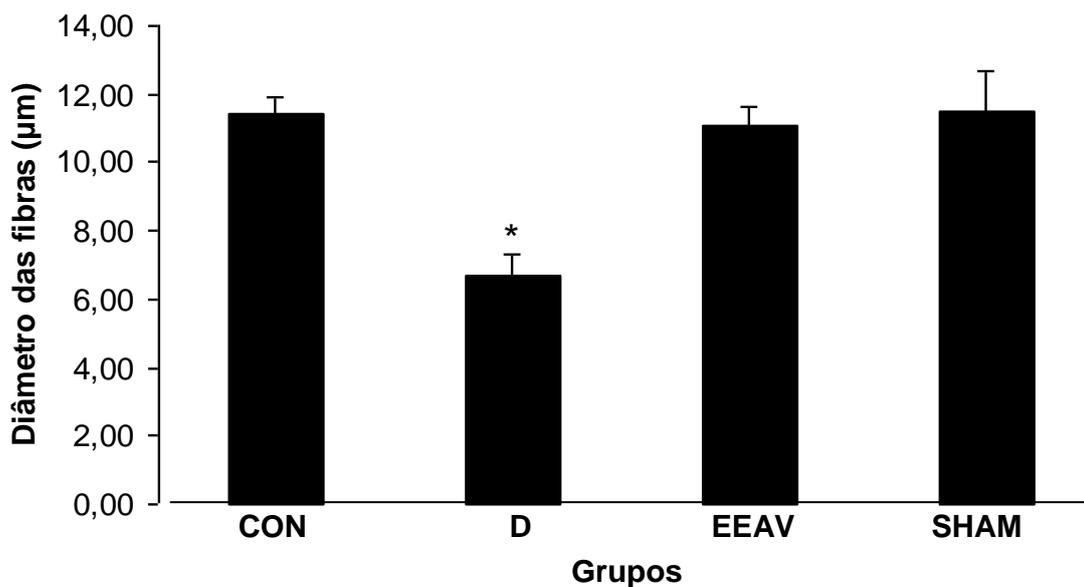


Figura 10- Diâmetro médio \pm DP das fibras nervosas nos grupos: Controle (CON), Desnervado (D), Desnervado + Estimulação Elétrica de Alta Voltagem (EEAV) e sem lesão + Estimulação Elétrica de Alta Voltagem (SHAM). (*) Difere dos grupos CON, EEAV e SHAM.

5.2.3 Espessura das Bainhas de Mielina

A espessura média das bainhas de mielina no grupo D ($0,75 \pm 0,06 \mu\text{m}$) foi menor que nos grupos CON ($1,14 \pm 0,11 \mu\text{m}$), EEAV ($1,24 \pm 0,11 \mu\text{m}$) e SHAM ($1,21 \pm 0,05 \mu\text{m}$) ($p= 0,00002$). Entre os grupos CON e EEAV ($p=0,2$), CON e SHAM ($p= 0,5$) e EEAV e SHAM ($p= 0,9$) não se observou diferença (Figura 11).

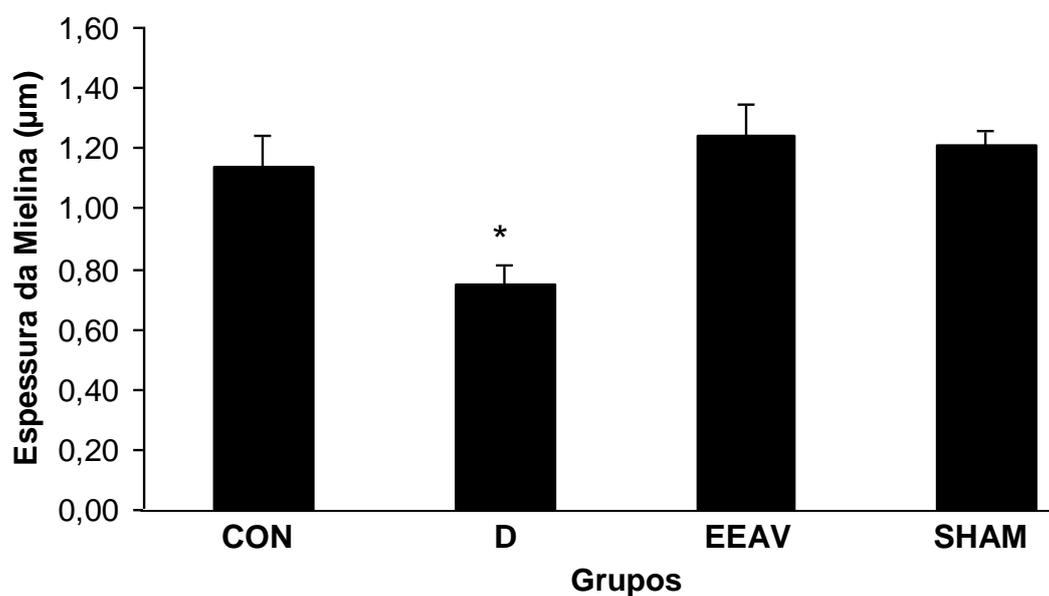


Figura 11- Espessura média \pm DP das bainhas de mielina nos grupos: Controle (CON), Desnervado (D), Desnervado + Estimulação Elétrica de Alta Voltagem (EEAV) e sem lesão + Estimulação Elétrica de Alta Voltagem (SHAM). (*) Difere do grupo CON, EEAV e SHAM.

5.3 Análise Histológica

No grupo CON (Figura 12A) os axônios apresentam diâmetros normais e espessuras de bainha de mielina proporcionais aos seus respectivos diâmetros, refletindo o aspecto de normalidade do nervo.

No grupo D (Figura 12B) observam-se axônios regenerados com diâmetros e espessuras de bainhas de mielina menores, além do aumento da área de tecido conjuntivo.

No grupo EEAV (Figura 12C) nota-se que os axônios regenerados apresentam características de maturação mais precoce quando comparado ao grupo D (Figura 12B), com diâmetros de axônios e espessuras de bainha de mielina maiores, além da preservação da proporcionalidade entre diâmetro dos axônios e espessura das bainhas de mielina.

No grupo SHAM (Figura 12D) as características histológicas do nervo são semelhantes às do grupo CON.

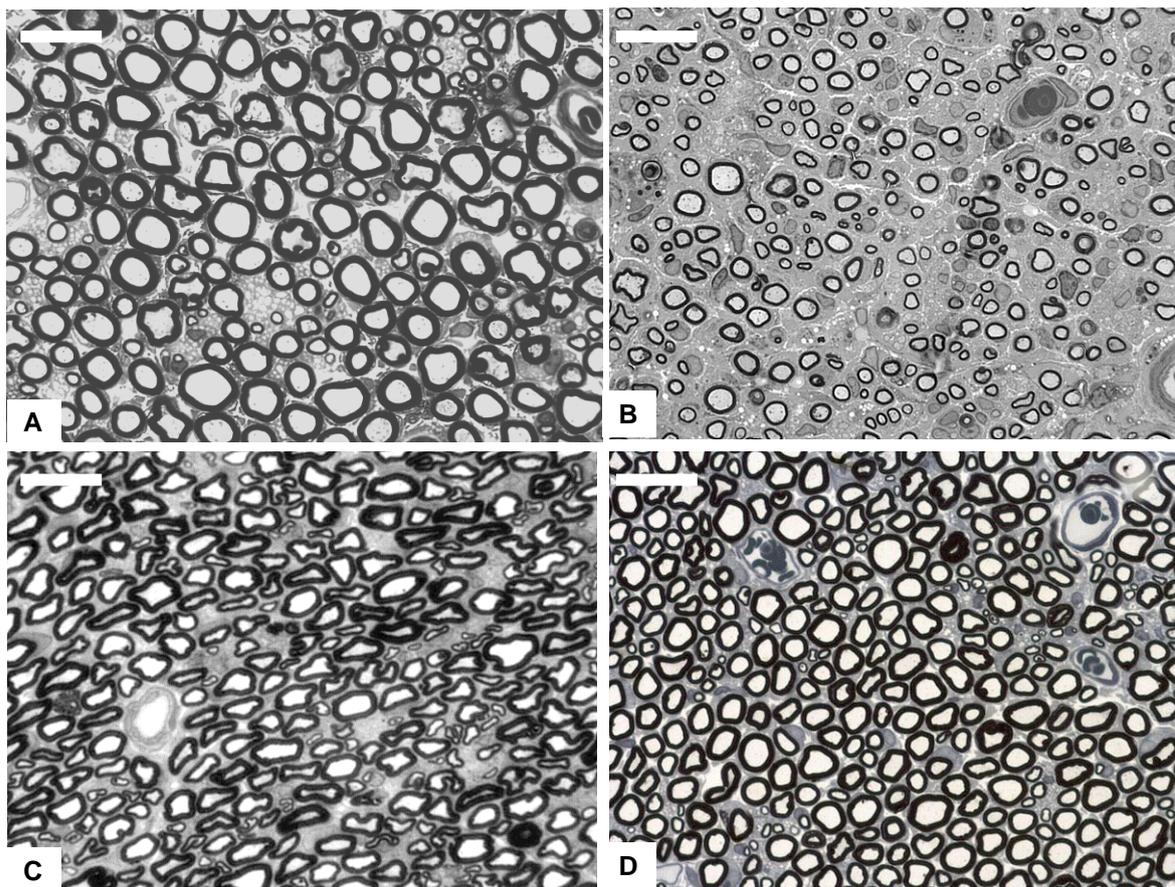


Figura 12- Fotomicrografia de cortes transversais do nervo isquiático nos grupos: Controle (A); Desnervado (B); Desnervado + Estimulação Elétrica de Alta Voltagem (C) e SHAM + Estimulação Elétrica de Alta Voltagem (D). Observar as diferenças no diâmetro dos axônios e espessura das bainhas de mielina. (Barra: 20 μ m).

5.4 Análise Funcional da Marcha

5.4.1 Análise Intergrupos

A figura 13 expressa os resultados da análise do IFC nos diferentes grupos durante os períodos de avaliação funcional. No 7º dia PO, os valores de IFC no grupo D e EEAV foram mais negativos que no grupo SHAM ($p=0,0005$ e $0,0002$, respectivamente). No 14º dia PO os valores de IFC no grupo D foram mais negativos que no grupo EEAV ($p=0,009$) e SHAM ($p=0,000003$) e no grupo EEAV esses valores foram mais negativos que no grupo SHAM ($p=0,0002$).

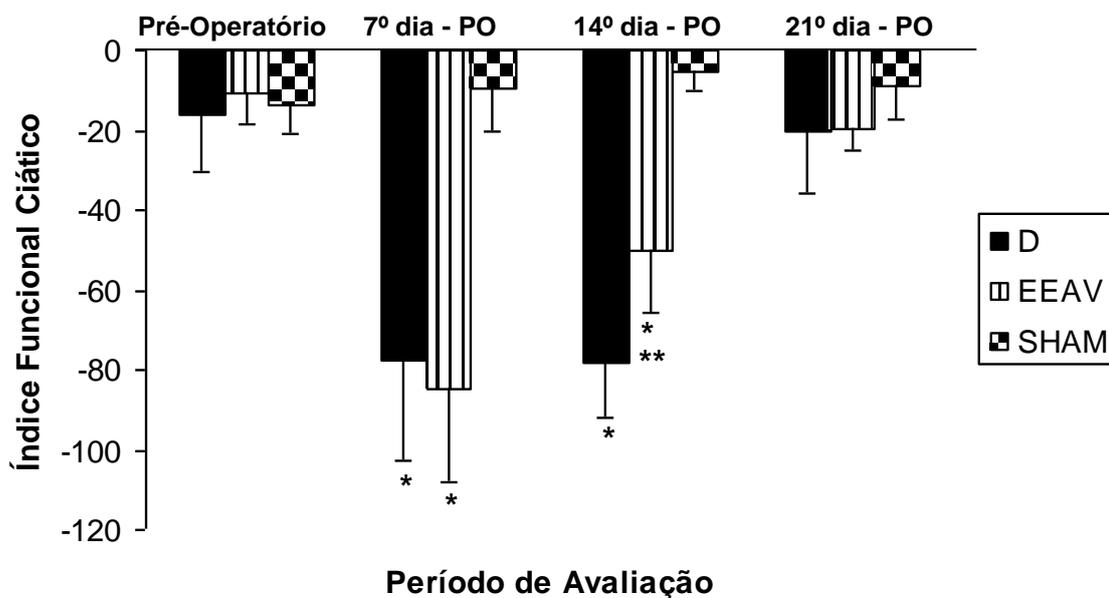


Figura 13 – Comparação intergrupos ($-32,93 \pm 6,52$) do Índice Funcional do Ciático (IFC) nos grupos: Desnervado (D), Desnervado + Estimulação Elétrica de Alta Voltagem (EEAV) e SHAM + Estimulação Elétrica de Alta Voltagem (SHAM), nos diferentes tempos. (*) Difere do SHAM; (**) Difere do D.

5.4.2 Análise Intragrupos

Uma comparação intragrupos dos valores de IFC nos diferentes períodos de avaliação mostra que, em ambos os grupos desnervados e EEAV, ocorre redução significativa da função no 7º e 14º dia, com recuperação no 21º dia PO ($p < 0,05$). Entre o 7º e 14º dia PO, o grupo D apresentou valores de IFC mais negativos em relação ao pré-operatório e 21º dia PO ($p=0,005$ e $p=0,009$, respectivamente). O mesmo ocorreu no grupo EEAV ($p=0,002$ e $p=0,009$, respectivamente).

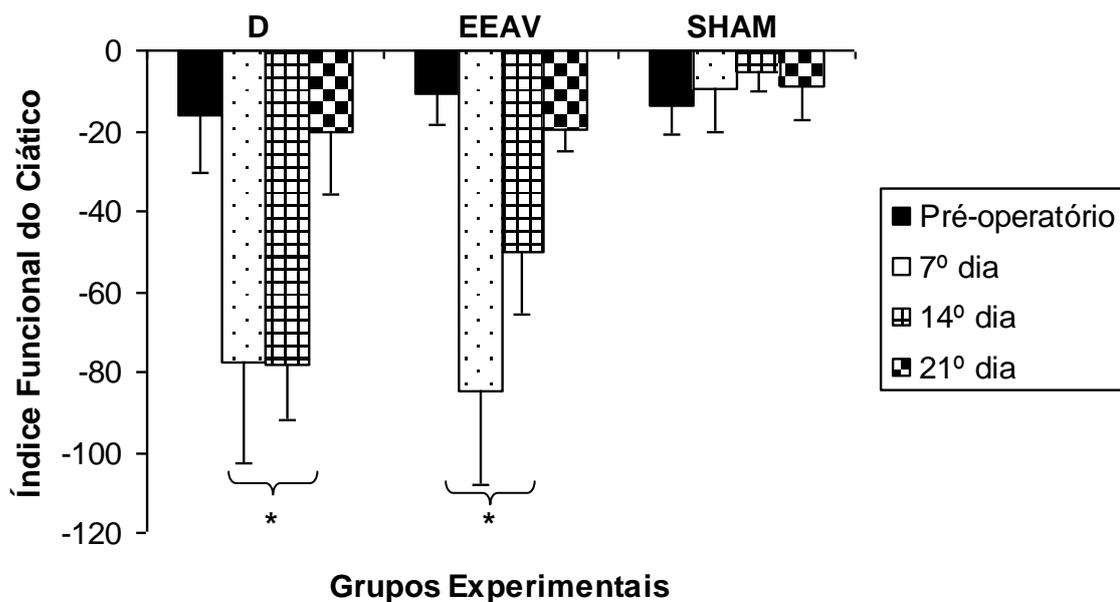


Figura 14 - Comparações intragrupos ($-32,93 \pm 6,52$) do Índice Funcional do Ciático (IFC) nos grupos: Desnervado (D), Desnervado + Estimulação Elétrica de Alta Voltagem (EEAV) e SHAM + Estimulação Elétrica de Alta Voltagem (SHAM), nos diferentes tempos. (*) Difere do pré-operatório e 21º dia PO.

6 DISCUSSÃO

6.1 Considerações Gerais sobre a Metodologia

6.1.1 Animais Experimentais

Utilizou-se o rato da linhagem Wistar por ser animal de pequeno porte, baixo custo, de fácil manuseio e disponibilidade, cujos nervos apresentam anatomia microscópica semelhante à de nervos humanos (Pachioni et al., 2006; Mazzer et al., 2006). Além disso, os ratos Wistar são bem conhecidos biologicamente e estudados há muito tempo pela comunidade científica (Grecco et al., 2003).

O nervo isquiático foi escolhido por ser o maior do corpo, por apresentar facilidade de acesso e vários fascículos, com densa irrigação sanguínea (Pachioni et al., 2006).

Fagundes e Taha (2004) descrevem que o rato se apresenta, nas bases de dados Medline, Lilacs, SciELO e Biblioteca Cochrane, como o animal mais utilizado em pesquisa, seguido do camundongo, coelho, cão, suíno e primatas. Cerca de 85% dos artigos científicos publicados no Medline e 70,5% no Lilacs são referentes a ratos e camundongos.

A idade e o gênero também foram fatores padronizados. De acordo com Verdú et al. (2000) a taxa e a densidade de regeneração axonal diminuem com a idade, havendo ainda uma redução no brotamento colateral e terminal das fibras regeneradas. O gênero feminino foi excluído, pois, segundo Gouveia Jr e Morato (2002), o ciclo estral interfere na deambulação, portanto, o uso de ratas poderia influenciar os resultados da pesquisa.

6.1.2 Modelo de Lesão Nervosa

A via de administração de anestésico foi intramuscular, com a combinação de cetamina (Ketalar) e xilasina (Rompun), que é uma das mais utilizadas em animais de pequeno porte e mantém o animal em plano anestésico de 40 a 60 minutos, com possibilidade de reforço da dose (Schanaider e Silva, 2004).

A lesão do tipo axoniotmese é um modelo ideal para uso experimental, pois não há secção total do nervo e lesões deste tipo são mais comuns e, conseqüentemente, mais estudadas (Mazzer et al., 2006). Neste tipo de lesão preservam-se os envoltórios conjuntivos, com degeneração completa do axônio e bainha de mielina no segmento distal à lesão. A preservação dos envoltórios conjuntivos permite um direcionamento adequado aos axônios em crescimento, favorecendo a reinervação muscular (Burnett e Zager, 2004).

Para o esmagamento do nervo, utilizou-se uma pinça hemostática Erwin-Guth[®] de 12 cm, cujas faces de pressão foram revestidas com fita micropore[™] - 3M[®] e a pressão exercida para o pinçamento foi padronizada até o terceiro dente da cremalheira da pinça. Sobral et al. (2008) analisaram histologicamente o nervo isquiático de animais submetidos ao mesmo procedimento de lesão nervosa aplicado neste estudo e observaram que, após 6 dias da lesão, não havia axônios íntegros no nervo, que apresentava intenso processo de degeneração axonal, com evidente retração e desintegração das bainhas de mielina, o que demonstra a eficácia da técnica em produzir uma lesão do tipo axoniotmese.

Mazzer et al. (2006) realizaram esmagamento do nervo isquiático de ratos com diferentes cargas (500 g, 1.000 g, 5.000 g, 10.000 e 15.000 g), que eram projetadas sobre o trajeto do nervo por um dispositivo portátil e mantidas por 10

minutos. Por meio de análise morfológica e morfométrica das fibras mielinizadas, demonstraram que a lesão foi diretamente proporcional à carga aplicada e que uma carga de 500 g é suficiente para produzir dano severo.

Bridge et al. (1994) compararam métodos que utilizam fórceps de joalheiro e pinça hemostática para o esmagamento de nervo em ratos, com tempo de compressão variando de 15 a 30 segundos. Apesar de não ter sido possível quantificar a pressão exercida pelos diferentes instrumentos, independentemente do tipo de pinça utilizada, houve degeneração Walleriana em ambos os grupos, não havendo diferença significativa entre as técnicas utilizadas.

A padronização de 21 dias de duração do experimento neste estudo considerou os resultados de Gorio et al. (1983), que notaram ausência de axônios no músculo desnervado de ratos quando analisado 10 dias após axoniotmese. Em análise realizada 15 dias depois, notaram que 25 % das fibras estavam reinervadas por mais de um axônio e, entre 21 e 25 dias, observaram que a maioria das fibras musculares estava poliinervada. Aos 26 dias da lesão era evidente a eliminação sináptica e, por volta de 90 dias as junções neuromusculares já estavam recuperadas.

Portanto, o período de 21 dias seria suficiente para demonstrar a possível influência da estimulação elétrica de alta voltagem sobre a regeneração nervosa e recuperação funcional dos músculos desnervados.

6.1.3 Protocolo de estimulação elétrica de alta voltagem (EEAV)

A estimulação elétrica de alta voltagem (EEAV) é uma corrente terapêutica vastamente utilizada em alguns países da Europa, sendo que suas primeiras

publicações datam da década 1970. Em nosso país, sua comercialização e utilização ainda é incipiente e a escassez de estudos que permitam convalidar seus efeitos limita o uso deste recurso.

A vantagem clínica desta corrente é que a estimulação é agradável e atinge fibras nervosas sensoriais, motoras e nociceptivas (Robinson e Snyder-Mackler, 2001). Newton (1984) e Wolf (1981) destacam que a corrente de alta voltagem é agradável porque apresenta uma duração de pulso muito pequena e uma amplitude média da corrente contínua muito baixa.

Quanto aos eletrodos, segundo Davini et al. (2005), devem ter uma ótima capacidade de condução da corrente, podendo ser metálicos, de silicone-carbono ou auto-adesivos. Neste estudo optou-se por eletrodos de silicone-carbono, pois são compatíveis com diferentes equipamentos e são de fácil aplicação (Nolan, 1991), têm baixo custo e são reutilizáveis, podendo ser cortados do tamanho desejado para se adequar à região da pele onde está sendo aplicada a corrente (Low e Reed, 2001).

Gerleman e Barr (2002) descrevem que, quanto maior a distância entre os eletrodos, menor será a concentração da corrente nos tecidos, pois esta tende a dissipar-se para os tecidos próximos. Segundo Hooker (2004), quando os eletrodos estão mais próximos, o campo elétrico estará localizado nos tecidos adjacentes à superfície, atingindo tecidos mais profundos, como nervo e músculo, na presença de espaço entre os eletrodos. Considerando estas referências, optou-se por manter uma distância de 1cm entre os eletrodos neste estudo, visando a concentração da corrente no local da lesão nervosa.

De acordo com Nelson et al. (2003), a soma das áreas dos eletrodos ativos não deve exceder a área do eletrodo dispersivo. Robinson e Snyder-Mackler

(2001) descrevem que a densidade da corrente (quantidade de corrente por unidade de área de condução) é inversamente proporcional à área de contato do eletrodo. À medida que a área de contato diminui, a densidade de corrente aumenta. Por este motivo, neste estudo a área do eletrodo ativo foi duas vezes menor que aquela do eletrodo dispersivo.

Quanto ao meio de acoplamento entre o eletrodo e a pele utilizou-se gel estéril, pois, segundo Gerleman e Barr (2002), para que haja transmissão do estímulo elétrico entre a interface eletrodo-pele, é necessário a aplicação de um agente de acoplamento, que pode ser líquido ou gel.

O número de pulsos por segundo determina a frequência da corrente (Gerleman e Barr, 2002). Os estimuladores de corrente pulsada permitem o ajuste da frequência, independente da duração da fase, sendo que as correntes de baixa frequência variam de 1 a 100 Hz (Guirro e Guirro 2004).

Wong, em 1986, realizou um estudo comparando estimulação elétrica de alta voltagem (EEAV) com estimulação neuromuscular de baixa voltagem (ENBV), avaliando a força muscular induzida eletricamente e o nível de desconforto destas duas correntes. A duração do pulso foi 40 μ s para EEAV (corrente monofásica) e 300 μ s para ENBV (corrente bifásica). A frequência foi de 50 Hz para ambas correntes e foi utilizado o mesmo grupo muscular em indivíduos saudáveis (n=24). O pico de torque foi avaliado pela dinamometria isocinética e para o nível de desconforto utilizou-se a escala visual analógica (EVA). O estudo indicou que a EEAV produziu pico médio de torque maior e nível de desconforto menor que a ENBV.

Houghton (2003) estudou o efeito da EEAV na cicatrização de úlceras crônicas em humanos. Um grupo recebeu tratamento convencional e o outro foi

tratado com EEAV (100 μ s, 150v e 100HZ) aplicado por 45 minutos, 3 vezes/semana, durante 4 semanas. O grupo tratado com EEAV apresentou redução de 44,3% na área da úlcera após 4 semanas de tratamento, enquanto que o grupo que recebeu tratamento convencional apresentou redução de 16%, o que demonstra o papel da EEAV em acelerar a regeneração de úlceras cutâneas.

Davini et al. (2005) consideram que o papel da EEAV no processo cicatrização das úlceras cutâneas ainda não está bem esclarecido e apontam como hipótese o efeito bactericida da EEAV. Acredita-se que as mudanças eletroquímicas são as principais responsáveis por este efeito, pois parecem promover mudanças no pH da pele, gerar calor localizado, além de recrutar fatores antimicrobianos já presentes no organismo.

Robinson e Snyder-Mackler (2001) citam que a estimulação elétrica (neuromuscular, transcutânea e de alta voltagem) pode ser usada para melhorar a perfusão vascular periférica, o que ocorre por meio de dois mecanismos: reflexo (ativação nervos autônomos) ou pela contração muscular (age como bomba ou estímulo para as fibras aferentes III e IV).

Neste estudo utilizou-se a EEAV no limiar motor, pois, de acordo com Robinson e Snyder-Mackler (2001), uma contração muscular rítmica é requerida para aumentar o fluxo sanguíneo arterial para a área estimulada. Bettany, Fish e Mendel (1990) relatam que EEAV pode influenciar o fluxo sanguíneo, mas seu efeito depende da intensidade, frequência e do local da estimulação. No estudo de Nohr, Akers e Wessman (1987), observou-se aumento significativo do fluxo sanguíneo durante e após a aplicação de EEAV em ratos. A estimulação foi aplicada com intensidade de 90V e frequência variando de 2 a 120Hz, em nível motor e com polaridade negativa.

6.1.4 Regeneração axonal e Análise morfométrica

A semelhança no número de axônios entre os grupos D e EEAV sugere que o recurso aplicado não inibiu a regeneração axonal, entretanto, também não aumentou o número de axônios regenerados. Toft, Fugleholm e Schmalbruch (1988) citam que após duas a quatro semanas do esmagamento do nervo isquiático de ratos, o número de axônios no segmento proximal permanece o mesmo, enquanto no segmento distal é 2 a 3 vezes maior. Neste estudo, ambos os grupos desnervados apresentaram número de axônios na porção distal à lesão ligeiramente maior que o controle, não atingindo o dobro, provavelmente pelo tempo transcorrido após a lesão.

Oliveira et al. (2008), que também utilizaram estimulação elétrica de baixa frequência (pulso quadrado bifásico; duração da fase: 3 ms; frequência: 10Hz; amplitude: 5 mA; aumentado 1 mA cada cinco minutos) no músculo sóleo desnervado de ratos, obtiveram resultados diferentes, onde a eletroestimulação favoreceu o brotamento axonal após axoniotmese, quando o número de axônios chegou a atingir o dobro dos valores controle após 21 dias da lesão, justificando que isso poderia ter ocorrido por ter sido utilizada uma corrente bifásica, que favorece o aumento do fluxo sanguíneo endoneural, aumentando o aporte de substâncias tróficas ao nervo em regeneração.

Como se observa, a literatura aponta a influência da corrente bifásica (estimulação elétrica de baixa frequência) sobre o músculo desnervado (Fernandes et al., 2005; Caierão et al., 2008) e sobre a regeneração nervosa (Oliveira et al., 2008), entretanto nada é apontado sobre a possível influência da EEAV no processo de regeneração nervosa e recuperação funcional.

No que diz respeito às características morfométricas do nervo, os parâmetros que refletem a maturação axonal envolvem diâmetro das fibras nervosas e dos axônios, bem como espessura das bainhas de mielina.

Os resultados obtidos demonstram que a EEAV acelerou a recuperação do diâmetro das fibras e dos axônios regenerados, bem como da espessura das bainhas de mielina. Considerando os efeitos circulatórios da EEAV apontados por Low e Reed (2001) e Davini et al. (2005), é possível que a estimulação catódica no limiar motor aplicada sobre o tecido nervoso periférico lesado, tenha promovido aumento da circulação nos envoltórios conjuntivos do nervo, favorecendo o aporte de nutrientes e fatores neurotróficos imprescindíveis ao restabelecimento das características morfológicas e fisiológicas do nervo.

Os resultados do grupo SHAM permitiram demonstrar que a aplicação de EEAV no nervo normal não influencia suas características quantitativas e morfométricas, o que ressalta o efeito deste recurso sobre a maturação das fibras nervosas regeneradas.

Orida e Feldman (1982) apontam que os macrófagos tendem a migrar em direção ao ânodo. Desta forma, é possível que, quando se realiza a estimulação catódica, a densidade de macrófagos no local da lesão nervosa seja aumentada, acelerando a fagocitose dos restos de axônio e mielina degenerados e, conseqüentemente, acelerando o processo de regeneração e maturação do nervo. Entretanto, a densidade de macrófagos não foi investigada neste estudo.

Uma vez que a maturação do nervo regenerado, refletida nos valores de diâmetro de suas fibras, é de fundamental importância para a recuperação da velocidade de condução nervosa e, portanto, para a recuperação funcional, o principal desafio para a clínica é, ainda, identificar mecanismos que permitam

“acelerar” o processo de regeneração nervosa para permitir a recuperação da atividade contrátil fisiológica no tempo mais curto possível, garantindo uma recuperação funcional mais eficiente.

A recuperação completa da função motora após lesão de nervo pressupõe a ocorrência de um conjunto de processos morfológicos e fisiológicos que determinam o retorno da atividade elétrica dos axônios sobre os músculos paralisados (English et al., 2007).

Neste estudo, todos os parâmetros morfométricos foram recuperados no grupo submetido à EEAV, sendo que apenas o diâmetro dos axônios não atingiu os valores controle aos 21 dias após a lesão. Considerando que a maturação do nervo só se completa a partir da reconexão deste com o músculo e quando a eliminação sináptica também se completa, o que ocorre apenas por volta do 60º dia após axoniotmese (Carmignoto et al., 1983; Gorio et al., 1983), é possível inferir que a EEAV acelerou a maturação axonal, pois esses resultados já são observados aos 21 dias após a lesão.

Fraher e Dockery (1998) relatam que existe correlação entre a espessura da bainha de mielina e o calibre do axônio, de forma que o axônio controla a espessura da bainha de mielina durante o desenvolvimento, ou seja, um axônio com determinado calibre terá espessura da bainha de mielina proporcional a ele. Neste estudo, a EEAV provocou recuperação da espessura das bainhas de mielina em relação ao grupo não tratado, que foi proporcional ao diâmetro dos axônios, o que refletiu automaticamente no diâmetro das fibras nervosas, reforçando a influência da EEAV na aceleração da maturação axonal.

Esses resultados desafiam o que a literatura aponta a muitos anos, referente à recuperação morfológica de fibras nervosas lesadas, pois Schroder

(1972) cita que, em lesões por compressão, o diâmetro dos axônios pode atingir os valores controle após 6 meses, mas a espessura da bainha de mielina atinge apenas 79% do valor normal após 1 ano. Mira (1979) identificou a presença de fibras nervosas regeneradas na porção distal à lesão por esmagamento do nervo isquiático de ratos entre o 10^o e o 15^o dia após a lesão, entretanto, a variação dos diâmetros das fibras permaneceu o mesmo após dois anos da lesão. Isso reforça os benefícios da EEAV sobre a maturação de nervos regenerados após esmagamento, ressaltando-se a rapidez com que isso ocorreu após aplicação desse recurso.

Devido à ausência na literatura de dados referentes ao efeito da estimulação elétrica alta voltagem na lesão nervosa periférica em ratos desnervados, não foi possível comparar os dados encontrados com outros estudos.

Além da recuperação das características morfológicas e quantitativas do nervo regenerado, avaliou-se neste estudo a repercussão sobre a recuperação funcional dos músculos desnervados, que reflete na funcionalidade para a marcha.

Kanaya, Firrell e Breidenbach (1996) e Oliveira et al. (2001) destacam as vantagens do IFC em relação a outros métodos de avaliação da recuperação do nervo lesado, como os eletrofisiológicos e histomorfométricos, pois não é invasivo, é de fácil realização e baixo custo, além de proporcionar informações sobre o sistema sensorial e motor. Varejão et al. (2004) considera o IFC um método confiável para avaliação do processo de regeneração nervosa periférica.

A análise do IFC em cada grupo mostra que no grupo SHAM, onde houve aplicação de EEAV sobre o nervo que não foi lesado, a funcionalidade se

manteve nos diferentes períodos de avaliação, apontando que não houve qualquer influência deste recurso sobre as características funcionais do nervo normal.

Nos grupos desnervados, o comportamento funcional seguiu as evidências já citadas por Carmignoto et al. (1983) e Gorio et al. (1983), observando-se perda completa da função entre o 7º e 14º dia após a lesão e recuperação observada no 21º dia, quando o músculo já se encontra quase completamente reinervado (presença de poliinervação).

Os resultados funcionais avaliados nos diferentes tempos em cada grupo (análise intergrupos) mostram que todos os grupos apresentavam valores de IFC entre 0 e -20 no período pré operatório, sendo que no 7º dia após a lesão, os grupos desnervados mostraram redução significativa da função, atingindo valores de IFC próximos a -100, o que caracteriza perda completa da função. No 14º dia pós operatório, esses valores se mantiveram próximos a -100 no grupo D, porém, no grupo EEAV houve recuperação funcional significativa em relação ao grupo D no mesmo período, demonstrando a eficácia da EEAV em acelerar a recuperação, não apenas das características morfológicas do nervo regenerado, mas também sua condição funcional, ou seja, o restabelecimento do controle dos músculos pelos motoneurônios inferiores. No 21º dia após a lesão, ambos os grupos desnervados recuperaram a funcionalidade, não havendo diferença entre o grupo EEAV e D.

Estes resultados sugerem que a aplicação de EEAV acelerou a reinervação muscular e, conseqüentemente, a liberação de acetilcolina na junção neuromuscular estaria ocorrendo de maneira precoce, pois, segundo Gorio et al (1983), após 15 dias do esmagamento nervoso em ratos, 25% das fibras

musculares estão reinervadas. No grupo D, observou-se que no 14^o dia não havia recuperação funcional, pois os valores de IFC permaneceram próximos a -80, provavelmente devido ao fato de apenas um quarto das fibras musculares estarem reinervadas, o que não refletiria em melhora da função. Entretanto, no grupo EEAV os valores de IFC estavam próximos a -50 e, apesar desse valor não refletir, ainda, função normal, pode sugerir que mais de 25% das fibras musculares estariam reinervadas, resultando em maior força de contração (Carmignoto et al., 1983) e melhora da condição funcional.

Apesar dos resultados de IFC mostrarem que aos 21 dias após a lesão todos os grupos atingiram valores entre -20 e 0, uma vez que a regeneração nervosa e recuperação funcional é espontânea após axoniotmese (Fawcett e Keynes, 1990), é imprescindível destacar aqui os efeitos da desnervação para o músculo.

A rápida atrofia muscular que ocorre após desnervação é consequente à perda das proteínas musculares que ocorre principalmente nos componentes miofibrilares, que representam 60% das proteínas do músculo (Furuno, Goodman e Goldberg, 1990), sendo a atividade contrátil importante para a manutenção da área de secção transversa das fibras musculares (Dow et al., 2004).

Fernandes et al. (2005) demonstraram que a desnervação, induzida por esmagamento do nervo isquiático, causou atrofia e proliferação conjuntiva no músculo sóleo de ratos e que a estimulação elétrica fásica de baixa frequência foi efetiva para minimizar os efeitos da desnervação sobre a área de secção transversa das fibras musculares e densidade de área do tecido conjuntivo intramuscular.

Caierão et al. (2008) também demonstraram que a desnervação reduz significativamente a área de secção transversa das fibras musculares e aumenta a densidade de área do tecido conjuntivo. Eles destacam a importância da ativação do músculo desnervado, por meio de estimulação elétrica fásica de baixa frequência, para minimizar a atrofia e proliferação conjuntiva do músculo, discutindo a importância de se evitar a proliferação do tecido conjuntivo intramuscular, pois em excesso, funciona como barreira mecânica ao suprimento sanguíneo para as fibras musculares, contribuindo para a atrofia muscular. Carter et al. (1998) também destacam que o excesso de tecido conjuntivo intramuscular prejudicaria o processo de reinervação muscular, por se configurar como uma barreira mecânica durante a reconexão do terminal nervoso com os receptores de acetilcolina na junção neuromuscular.

Portanto, a presença de estímulos para a contração muscular é imprescindível e deve ser aplicada logo após a lesão, por meio de recursos que possibilitem que essa contração seja realizada de forma natural, o mais precocemente possível, estimulando-se a recuperação do controle do motoneurônio inferior sobre as fibras musculares. Os resultados da aplicação da EEAV neste estudo apontam que a EEAV acelerou a regeneração nervosa e recuperação funcional, propiciando ao músculo a possibilidade de recuperar precocemente sua atividade voluntária, impedindo assim, a evolução dos efeitos deletérios da desnervação para o músculo.

Fazendo uma analogia à disfunção mais incapacitante após lesão nervosa periférica em humanos, ou seja, a dificuldade de recuperação dos movimentos finos da mão, os resultados deste estudo sugerem que a utilização da EEAV poderia tornar o prognóstico mais favorável, possibilitando recuperação precoce

e, associada à intervenção fisioterapêutica, uma recuperação mais eficaz da função da mão e retorno precoce às atividades laborais do indivíduo. Entretanto, estudos envolvendo pacientes necessitam ser realizados para a constatação desses resultados na clínica, o que possibilitaria menor tempo de tratamento para esse tipo de disfunção.

Tendo em vista que a literatura não aponta o emprego deste recurso na lesão nervosa periférica, torna-se importante investigar ainda outras questões, como os resultados da estimulação anódica, a morfologia do músculo reinervado após aplicação de EEAV catódica ou anódica, bem como os processos fisiológicos, bioquímicos e moleculares envolvidos no efeito dessa corrente sobre o nervo lesado. Embora os resultados tenham sido positivos, seria interessante a avaliação diária do IFC entre o 14º ao 21º dia pós-operatório, com o objetivo de identificar o momento em que a corrente exerce maior ação sobre o tecido em regeneração.

Além disso, a identificação do momento em que a regeneração nervosa inicia após aplicação de EEAV poderia auxiliar a definir parâmetros de intervenção.

Deve-se destacar que a regeneração nervosa após axoniotmese ocorre espontaneamente, não havendo, em função do tipo de lesão, fatores que prejudiquem a regeneração. O mesmo não ocorre no caso de neurotmese. Desta forma, abre-se também a perspectiva de investigação do efeito da EEAV nesse tipo de lesão, que costuma trazer comprometimentos ainda maiores e por tempo mais prolongado aos pacientes, na maioria das vezes impedindo a recuperação de uma função eficiente.

Enfim, novos estudos serão de grande valia para elucidar os efeitos da EEAV e viabilizar a utilização deste recurso no tratamento da lesão nervosa periférica em humanos.

7 CONCLUSÃO

Conclui-se que a EEAV acelerou a maturação das fibras nervosas regeneradas após axoniotmese, bem como a recuperação funcional.

REFERÊNCIAS*

Bain JR, Mackinnon SE, Hunter RT. Functional Evaluation of Complete Sciatic peroneal and posterior tibial nerve lesions in the rat. *Plast Reconstr Surg.* 1989; 83(1): 129-38.

Baldwin KM, Haddad F: Skeletal muscle plasticity: Cellular and molecular responses to altered physical activity paradigms. *Am J Phys Med Rehabil* 2002; 81 (11): 40-51.

Bettany JA, Fish DR, Mendel FC. Influence of high voltage pulsed direct current on edema formation following impact injury. *Physical Therapy.* 1990; 70 (4): 219-224.

Bridge PM, Ball DJ, Mackinnon SE, Nakao Y, Brandt K, Hunter DA et al. Nerve crush injuries – A model for axonotmesis. *Exp Neurol.* 1994; 127 (2): 284-90.

Burnet MG, Zager EL. Pathophysiology of peripheral nerve injury: a brief review. *Neurosurg. Focus.* 2004; 16: 1-7.

Caierão QM, Betini J, Teodori RM, Minamoto VB. O efeito do intervalo da estimulação elétrica no músculo desnervado de rato. *Rev. Bras. Fisiot.* 2008; 12(2): 143-8.

* Baseadas na norma do International Committee of Medical Journal Editors – Grupo de Vancouver; 2005. Abreviatura dos periódicos em conformidade com Medline.

Carmignoto G, Finesso M, Siliprandi R, Gorio A. Muscle reinnervation – I. Restoration of transmitter release mechanisms. *Neurosci.* 1983; 8(3): 392-401.

Carter AJ, Kristmundsdottir F, Gilmour J, Glasby MA. Changes in muscle cytoarchitecture after peripheral nerve injury and repair. *J Hand Surg [Br].* 1998; 23 (3): 365-9.

Coelho TH, Fortunato JMS, Moreira AFL. Sinaptogênese: do cone de crescimento à sinapse neuromuscular. *Rev. Port Psicoss.* 2001; 3(1): 95-121.

Dagum AB. Peripheral nerve regeneration, repair and grafting. *J Hand Therapy.* 1998; 11: 111-117.

Davini R, Nunes CV, Guirro ECO e Guirro RRJ. Estimulação elétrica de alta voltagem: uma opção de tratamento. *Rev. Bras. Fisioter.* 2005; 9 (3): 249-256.

De Medinacelli I., Freed WJ., Wyatt, RJ. An index of the function condition of rat sciatic nerve based on measurements made from walking tracks. *Exp Neurol.* 1982; 17: 634-43.

Dow DE, Cederna PS, Hassett CA, Kostrominova TY, Faulkner JA, Dennis RG. Number of contractions to maintain mass and force of a denervated rat muscle. *Muscle & Nerve.* 2004; 30(1): 77-86.

Engel AG, Franzini-Armstrong C. Myology. 2. ed. Philadelphia: McGRAW-HILL INC; 1994. 1960p.

English AW, Schwartz G, Meador W, Sebatier MJ, Mulligan A. Electrical stimulation promotes peripheral axon regeneration by enhanced neuronal neurotrophin signaling. Dev Neurobiol. 2007; 67(2):158-72.

Evans GRD. Peripheral nerve injury: a review and approach to tissue engineered constructs. Wiley-Liss. 2001; 263(4): 396-404.

Fagundes DJ, Taha MO. Modelo animal de doença: critérios de escolha e espécies de animais de uso corrente. Acta Cir. Bras. 2004; 19(1): 59-65.

Fawcett JW, Keynes RJ. Peripheral nerve regeneration. Ann Rev Neurosci. 1990; 13: 43-60.

Feedar JA, Kloth LC, Gentzkow. Chronic dermal ulcer healing enhanced with monophasic pulsed electrical stimulation. Physical Therapy. 1991; 71 (9): 639-649.

Fernandes KCBG, Polacow MLO, Guirro RRJ, Campos GER, Somazz MC, Pinto VF, et al. Análise morfométrica dos tecidos muscular e conjuntivo após desnervação e estimulação elétrica de baixa frequência. Rev Bras Fisiot. 2005; 9 (2): 235-241.

Ferreira SC, Martinez AMB. O processo de degeneração Walleriana e os eventos moleculares nele envolvidos – uma revisão com enfoque no sistema nervoso periférico. *Fisioterapia Brasil*. 2000; 1 (2): 109-115.

Fitzgerald KG e Newsome D. Treatment of a large infected thoracic spine wound using high voltage pulsed monophasic current. *Physical Therapy*. 1993; 73 (6): 355-360.

Flores AJ, Lavernia CJ, Owens PW. Anatomy and physiology of peripheral nerve injury and repair. *Am J Orthop*. 2000; 29 (3): 167-173.

Fraher J, Dockery P. A strong myelin thickness-axon size correlation emerges in developing nerves despite independent growth of both parameters. *J. Anat*. 1998; 193: 195-201.

Furuno K, Goodman MN, Goldberg AL. Role of different proteolytic systems in the degradation of muscle proteins during denervation atrophy. *J Biol Chem*. 1990;265(15):8550-7.

Garcia, LB, Guirro, ECO. Efeitos da estimulação de alta voltagem no linfedema pós-mastectomia. *Rev Bras Fisiot*. 2005; 9(2): 243-248.

Gerleman DG, Barr JO. Instrumentação e segurança do produto. In: Nelson RM, Hayes KW, Currier DP. *Eletroterapia Clínica*. 3 ed. Manole: São Paulo; 2002. p. 15-53.

Guimarães GC, Machado MRF, Cruz C, Santos ALQ, Miglino MA, Cattelan JW. Morfologia microscópica do nervo radial do gato doméstico. *Biosci. J.* 2006; 22(3): 12137.

Guirro ECO, Guirro RRJ. Eletroterapia. In: Guirro ECO, Guirro RRJ. *Fisioterapia dermatofuncional: fundamentos, recursos e patologias*. 3 ed. Barueri: Manole; 2004.

Guyton AC, Hall JE. *Tratado de Fisiologia Médica*. 9ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara koogan, 1997, 1014p.

Gigo-Benato D., Geuna S., Rockkind, S. Phototherapy for enhancing peripheral nerve repair: a review of the literature. *Muscle Nerve*. 2005; 31: 694-701, june.

Gorio A, Carmignoto G, Finesso M, Polato P e Nunzi MG. Muscle reinnervation – II. Sprouting, synapse formation and repression. *Neuroscience*. 1983; 8 (3): 406-416.

Gouveia Júnior A, Morato S. Influências do ciclo estral sobre o desempenho de ratos no labirinto em cruz elevado. *Interação em Psicologia*. 2002; 6(2): 141-48.

Grecco MAS, Leite VM, Albertoni WM, Santos JBG, Hirakawa CK, Faloppa F, et al. Estudo da regeneração nervosa em nervos tibiais de ratos Wistar utilizando o Fluoro-Gold como marcador neuronal. *Acta Ortop. Bras.* 2003; 11(4): 225-229.

Hooker DN. Correntes de estimulação elétrica. In: Pretince WE. Modalidades terapêuticas para fisioterapeutas. 2ª ed. Porto Alegre: Artmed; 2004. p 77-128.

Houghton PE, Kincaid CB, Lovell M, Campbell KE, Keast DH, Woodbury MG, et al. Effect of electrical stimulation on chronic leg ulcer size and appearance. *Physical Therapy*. 2003; 83 (1): 17-28.

Ijkema-Paassen J, Jansen K, Gramsbergen A, Meek MF. Transection of peripheral nerves, bridging strategies and effect evaluation. *Biomaterials*. 2004; 25: 1583-1592.

Johnson EO, Zoubos AB, Soucacos PN. Regeneration and repair of peripheral nerves. *Injury, Int. J. Care Injured*. 2005; 36 Suppl 4: S24-29.

Kanaya F, Firrell JC, Breidenbach WC. Sciatic function index, nerve conduction tests, muscle contraction, and axon morphometry as indicators of regeneration. *Plast Reconstr Surg*. 1996; 98 (7): 1264-71.

Karnes JL, Mendel FC, Fish DR, Burton HW. High-voltage pulsed current: its influence on diameters of histamine-dilated arterioles in hamster cheek pouches. *Arch phys med rehabil*. 1995; 76.

Karnovsky MJ. A formaldehyde – glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. *J Cell Biol*. 1965; 27: 137.

Kitchen S. Eletroterapia: Prática baseada em evidência. 11 ed. Manole: São Paulo; 2003.

Lieber RL. Skeletal muscle structure, function & plasticity: the physiological basis of rehabilitation. 2 ed. San Diego: Lippincott Williams & Wilkins; 2002.

Low J, Reed A. Eletroterapia explicada: princípios e prática. Manole: São Paulo; 2001, 484p.

Mazzer PYCN, Barbieri CH, Mazzer N, Fazan VPS. Avaliação qualitativa e quantitativa das lesões agudas por esmagamento do nervo isquiático do rato. Acta Ortop Bras. 2006; 14(4): 220-225.

Mendel FC, Wylegala JA, Fish DR. Influence of high voltage pulsed current on edema formation following impact injury in rats. Phys Ther. 1992; 72: 673-688.

Mendonça AC, Barbieri CH, Mazzer. Directly applied low intensity direct electric current enhances peripheral nerve regeneration in rats. J. Neurosci Methods. 2003; 129: 183-90.

Mira, JC. Quantitative studies of the regeneration of rat myelinated nerve fibres: variations in the number and size of regenerating fibres after repeated localized freezings [abstract]. J Anat. 1979; 129 (Pt1): 77-93.

Monte-Raso VV, Barbieri CH, Mazzer N, Fazan VPS. Os efeitos do ultra-som terapêutico nas lesões por esmagamento do nervo ciático de ratos: análise funcional da marcha. *Revista brasileira de fisioterapia*. 2006; 10(1): 113-119.

Nelson RM, Hayes KW, Currier DP. *Eletroterapia Clínica*. 3ª ed. Manole: São Paulo; 2003, 600p.

Newton RA. *Electrotherapy treatment: selecting appropriate waveform characteristics*. Clifton, NJ: JA Preston Corp; 1984.

Nolan MF. Conductive differences in electrodes used with transcutaneous electrical nerve stimulation devices. *Phy Ther*. 1991; 71(10): 746-751.

Nohr T, Akers TK, Wessman HC. Effect of high voltage stimulation on edema reduction in the rat hind limb. *Physical Therapy*. 1987; 67(4):526-533.

Oliveira LS, Sobral LL, Takeda SY, Betini J, Guirro RR, Somazz MC et al. Estimulación eléctrica y natación em La fase aguda de la axonotmesis: influencia sobre la regeneración nerviosa y la recuperación funcional. *Rev. Neurol*. 2008; 47(1): 11-15.

Oliveira EF, Mazzer N, Barbieri CH, Selli M. Correlation between function index and morphometry to evaluate recovery of the rat sciatic nerve following crush injury: experimental study. *J. Reconstr Microsurg*. 2001; 17(1): 69-75.

Orida N, Feldman JD. Directional protrusive pseudopodia activity and motility in macrophages induced by extracellular electric fields. *Cell Motil.* 1982; 2:243-256.

Pachioni CAS, Mazzer N, Barbieri CH, Fazan VPS, Padovani CR, Moro CA, et al. Lesão por esmagamento do nervo isquiático de ratos: estudo da vascularização. *Octa Ortop Bras.* 2006; 14(4): 203-207.

Pette D, Staron RS. Transitions of muscle fiber phenotypic profiles. *Histochem Cell Biol.* 2001; 115 (5): 359-72.

Peters EJ, Lavery LA, Armstrong DG, Fleichili JG. Electric stimulation as an adjunct to heal diabetic foot ulcers: a randomized clinical trial. *Arch Phys Med Rehabil* 2001; 82(6): 721-725.

Rempel D, Dahlin L, Lundborg G. Pathophysiology of nerve compression syndromes: response of peripheral nerves to loading. *J. Bone Joint Surg Am.* 1999; 81 (11): 1600-1610.

Robinson AJ e Snyder-Mackler L. *Eletrofisiologia Clínica – Eletroterapia e teste eletrofisiológico.* 2ª ed. Artmed: Porto Alegre; 2001, 426p.

Roederer E, Goldberg NH, Cohen MJ. Modification of retrograde degeneration in transected spinal axons of the lamprey by applied dc current. *J. Neurosci.* 1983; 3(1): 153-160.

Román GC, Strahlendorf HK, Coates PW, Rowley BA. Stimulation of sciatic nerve regeneration in the adult rat by low-intensity electric current. *Exp Neurol.* 1987; 98: 222-232.

Salonen V, Peltonen J, Roytta M, Virtanen I. Laminin in traumatized peripheral nerve: basement membrane changes during degeneration and regeneration. *J. Neurocytol.* 1987; 16: 713-20.

Seddon HJ. Three types of nerve injury. *Brain.* P. 1943; 63-237. Apud Dourado E, Gomes ACA, Gomes PFS, Ribeiro TPA. Técnicas Microcirúrgicas de reparação nervosa: procedimentos convencionais e alternativos. *Rev. Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial.* 2003; 3(2): 49-54.

Schanaider A, Silva PC. Uso de animais em cirurgia experimental. *Acta Cir. Bras.* 2004; 19(4): 441-447.

Schroder JM. Altered ratio between axonal diameter and myelin sheath thickness in regenerated nerve fibers. *Brain Res.* 1972; 45(1): 49-65.

Sobral LL, Oliveira LS, Takeda SYM, Somazz MC, Montebelo MIL, Teodori RM. Exercício imediato versus tardio na regeneração do nervo isquiático de ratos após axoniotmese: análise morfométrica e funcional. *Rev. Bras. Fisiot.* 2008; 12(4): 311-6.

Souza AVA. Efeito da estimulação elétrica muscular de baixa frequência sobre a regeneração do nervo isquiático de ratos submetidos a axoniotmese [dissertação de Mestrado]. 72p. Piracicaba: UNIMEP; 2005.

Sunderland S. Nerve and Nerve Injure. 2ª ed. London: Churchill Livingstone; 1978.
Apud Burnet MG, Zager EL. Pathophysiology of peripheral nerve injury: a brief review. Neurosurg. Focus. 2004; 16: 1-7.

Sunderland S. Nerve and Nerve Injure. 2ª ed. London: Churchill Livingstone; 1985.

Starkey C. Recursos eletroterapêuticos em fisioterapia. São Paulo: Manole; 2001, 421p.

Szuminsky NJ, Albers AC, Unger P, Eddy JG. Effect of narrow, pulsed high voltages on bacterial viability. Physical Therapy. 1994; 74 (7): 660-67.

Taylor K, Mendel FC, Fish DR, Hard R e Burton HW. Effect of high-voltage pulsed current and alternating current on macromolecular leakage in hamster cheek pouch microcirculation. Physical therapy. 1997; 77 (12): 1729-1740.

Toft PB, Fugleholm K, Scmalbruch H. Axonal branching following crush lesions of peripheral nerves of rat. Muscle Nerve. 1988; 11: 880-889.

Topp KS, Boyd BS. Structure and biomechanics of peripheral nerves: nerve responses to physical stresses and implications for physical therapist practice. *Phys Ther.* 2006; 86 (1): 92-109.

Varejão ASP, Melo-Pinto P, Meek MF, Filipe VM e Bulas-cruz J. Methods for the experimental functional assessment of rat sciatic nerve regeneration. *Neurological Research.* 2004; 26: 186-194.

Verdú E, Ceballos D, Vilches JJ, Navarro X. Influence of aging on peripheral nerve function and regeneration. *J Peripher Nerv Syst.* 2000; 5 (4): 191-2008.

Walker DC, Currier DP, Threlkeld J. Effects of high voltage pulsed electrical stimulation on blood flow. *Physical Therapy.* 1988; 68(4): 481-485.

Welch JA. Peripheral nerve injury. *Semin Vet Surg (Small Anim).* 1996; 11(4): 273-84.

Wolf SL. *Electrotherapy.* Churchill Livingstone: New York; 1981.

Wong RA. High voltage versus low voltage electrical stimulation: force of induced muscle contraction and perceived discomfort in healthy subjects. *Physical Therapy.* 1986; 66(8): 1209-1214.

ANEXO 1



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
Comissão de Ética em Experimentação Animal
Via Washington Luís, km. 235 - Caixa Postal 676
Fones: (016) 3351.8109 / 3351.8110
Fax: (016) 3361.3176
CEP 13560-970 - São Carlos - SP - Brasil
propq@power.ufscar.br - www.propq.ufscar.br

Parecer da Comissão de Ética em Experimentação Animal nº 037/2008

Protocolo nº 037/2008

A Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de São Carlos – CEEA/UFSCar – na sua 24ª. Reunião, ocorrida em 16/09/2008, **APROVOU** o trabalho intitulado Estimulação elétrica de alta voltagem: influência sobre a regeneração nervosa periférica e recuperação funcional, elaborado por Rosana Macher Teodori, Elaine Caldeira de Oliveira Guirro, Andréia Maria Silva e Valéria de Oliveira Fontes.

São Carlos, 16 de setembro de 2008.


Prof.ª. Dr.ª. Keico Okino Nonaka

Presidente da Comissão de Ética em Experimentação Animal

