*Estudo da Regeneração do Nervo
Ciático de Ratos Submetidos à Estimulação
Elétrica Após Lesão por Esmagamento*

*Autora: Adriana Clemente Mendonça
Orientador: Dr. Cláudio Henrique Barbieri
2000*

**BIOENGENHARIA
USP**

Curso de Pós-Graduação Interunidades Bioengenharia

*Escola de Engenharia de São Carlos
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Instituto de Química de São Carlos*

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Escola de Engenharia de São Carlos
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Instituto de Química de São Carlos

**Estudo da regeneração do nervo ciático
de rato submetido a estimulação elétrica
após lesão por esmagamento**

Adriana Clemente Mendonça

Ribeirão Preto
2000

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Escola de Engenharia de São Carlos
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Instituto de Química de São Carlos

**Estudo da regeneração do nervo ciático
de rato submetido a estimulação elétrica
após lesão por esmagamento**

Adriana Clemente Mendonça

Dissertação apresentada à Área Interunidades
Bioengenharia - Escola de Engenharia de São
Carlos/ Faculdade de Medicina de Ribeirão
Preto / Instituto de Química de São Carlos,
Universidade de São Paulo para obtenção do
grau de Mestre em Bioengenharia.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Cláudio Henrique Barbieri

CO-ORIENTADORES: Prof. Dr. Nilton Mazzer

Prof. Dr. Amilton Antunes Barreira

Ribeirão Preto
2000

Universidade de São Paulo
Curso de Pós-Graduação Interunidades Bioengenharia
Escola de Engenharia de São Carlos
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Instituto de Química de São Carlos

MEMBROS DA COMISSÃO JULGADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
DA ALUNA ADRIANA CLEMENTE MENDONÇA APRESENTADA AO CURSO DE
PÓS-GRADUAÇÃO INTERUNIDADES BIOENGENHARIA EESC/FMRP/IQSC-
USP, EM 20/12/2000.

Prof. Dr. Cláudio Henrique Barbieri – Orientador

Prof. Dr. José Marcos Alves – SMM / EESC - USP

Profa. Dra. Valéria Paula Sassoli Fazan – Faculdade de Medicina do
Triângulo Mineiro – Depto. de Ciências Biológicas

Clase.	TESE-EESC
Curr.	13593
Tombo	T0257/00

st 1130329

Este trabalho contou com o apoio financeiro da CAPES
(Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior)

*A Deus, pois em todas as minhas conquistas
sempre sou fortemente amparada por suas mãos.
À minha mãe, minha grande amiga, porque
seus ensinamentos de vida jamais aprenderei
em escola alguma.
Ao Rogério e à Sheila pela força e pela alegria
sempre ao meu lado.*

AGRADECIMENTO ESPECIAL

O dever de um Mestre é ensinar, mas apenas aqueles que o fazem por amor contribuem para a edificação do ser humano.

Meu agradecimento muito especial ao meu orientador Cláudio Henrique Barbieri por todos os ensinamentos, pela paciência, amizade e fiel dedicação em todas as etapas deste trabalho, desde o ensinamento da técnica cirúrgica à criteriosa correção.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que colaboraram com a realização deste trabalho, em particular:

Ao Prof. Dr. *Nilton Mazzer* pela amizade e orientação à mim dedicadas.

Ao Prof. Dr. *Amilton Antunes Barreira* pelo apoio e acolhida em seu laboratório.

Aos técnicos do Laboratório de Neurologia: *Cristina e Renato*, pela paciência, carinho e inestimável ajuda.

À *Silvana*, secretária da Neurologia e ao *Cláudio*, pós-graduando da Neurologia pela amizade e ajuda.

Ao Eng. *Shimano* pela amizade e valiosa colaboração.

Aos técnicos do Laboratório de Bioengenharia: *Luiz Henrique e Chico* pelo carinho, amizade, dedicação e empenho com que me acompanharam nesta jornada.

Aos amigos do Laboratório de Bioengenharia: Prof. *Paulin, Teresinha e Moro* pelo carinho e amizade.

Ao Eng. *Marcelo Selli* pela valiosa ajuda ao ceder e ensinar-me o manuseio de seu programa para avaliação do índice funcional do ciático.

Aos estatísticos *Cássio*, da Neurologia e *Gilberto* da UNIUBE pela valiosa colaboração na análise dos dados.

As secretárias do Departamento de Biomecânica, Medicina e Reabilitação do Aparelho Locomotor- HCFMRP- USP: *Fátima, Rose e Elisângela* pelo carinho, paciência e colaboração em todos os momentos.

As secretárias da Área Interunidade Bioengenharia de São Carlos: *Janete e Marielza* pelo carinho, paciência e colaboração.

Ao Prof. Dr. *Picado* e novamente ao Eng. *Shimano* pelas valiosas sugestões como banca de minha qualificação.

A todos aqueles que anonimamente, ou por descuido me fiz esquecer, mas que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

A todos, meu MUITO OBRIGADA!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	i
LISTA DE TABELAS.....	ii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	iii
LISTA DE SÍMBOLOS.....	v
RESUMO.....	vi
<i>ABSTRACT</i>	viii
1- INTRODUÇÃO.....	01
1.1- Mecanismos da regeneração da lesão nervosa.....	01
1.2- Lesão nervosa por esmagamento.....	02
1.3- Avaliação funcional da regeneração nervosa.....	04
1.4- Propriedades elétricas dos tecidos.....	09
1.5- Estimulação elétrica da cicatrização ou regeneração tecidual.....	11
1.6- Estimulação elétrica da regeneração de tecido nervoso.....	15
2- MATERIAL E MÉTODO.....	17
2.1- Animal e Grupos Experimentais.....	17
2.2- O circuito estimulador.....	18

2.3-	Anestesia e Procedimentos Cirúrgicos.....	21
2.4-	Impressão das pegadas. Obtenção e análise.....	25
2.5-	Análise Histológica e Morfométrica.....	30
2.6-	Análise Estatística.....	32
3-	RESULTADOS.....	33
3.1-	Generalidades.....	33
3.2-	Análise Funcional da Marcha.....	33
3.3-	Análise Histológica.....	37
3.3.1-	Grupo 1 (Sem lesão e sem estímulo).....	37
3.3.2-	Grupo 2 (Com lesão e sem estímulo).....	38
3.3.3-	Grupo 3 (Sem lesão e com estímulo).....	39
3.3.4-	Grupo 4 (Com lesão e com estímulo).....	40
3.4-	Análise morfométrica das fibras mielínicas.....	44
4-	DISCUSSÃO.....	52
5-	CONCLUSÕES.....	59
6-	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 01 – O Circuito estimulador.....	20
FIGURA 02 (A e B) – Técnica de esmagamento.....	23
FIGURA 03 – Posicionamento e fixação dos eletrodos.....	24
FIGURA 04 – Impressão das pegadas do rato.....	27
FIGURA 05 – Esquema das medidas para cálculo do IFC.....	28
FIGURA 06 – Programa utilizado para cálculo do IFC.....	29
FIGURA 07 – Variação do IFC em função do tempo.....	35
FIGURA 08 – Histologia Grupo 1 (100obj x 1,6opt x 0,5cam).....	37
FIGURA 09 – Histologia Grupo 2 (100obj x 1,6opt x 0,5cam).....	38
FIGURA 10 – Histologia Grupo 3 (100obj x 1,6opt x 0,5cam).....	39
FIGURA 11-A – Histologia Grupo 4 (100obj x 1,6opt x 0,5cam).....	41
FIGURA 11-B – Histologia Grupo 2 (vasos) (10obj. x 1,25opt. x 0,5cam.).....	42
FIGURA 11-C – Histologia Grupo 4 (vasos) (10obj. x 1,25opt. x 0,5cam.).....	42
FIGURA 11-D – Histologia Grupo 4- vasos endoneurais (40obj x 1,6opt x 0,5cam).....	43
FIGURA 11-E – Histologia Grupo 4- vasos interfasciculares (20obj x 1,25opt x 0,5cam).....	43
FIGURA 12 – Histograma: Distribuição das fibras e Razão G do Grupo 1.....	48
FIGURA 13 – Histograma: Distribuição das fibras e Razão G do Grupo 2.....	49
FIGURA 14 – Histograma: Distribuição das fibras e Razão G do Grupo 3.....	50
FIGURA 15 – Histograma: Distribuição das fibras e Razão G do Grupo 4.....	51

LISTA DE TABELAS

TABELA 01 – Comportamento médio e mediano do IFC e suas respectivas variações, DP e IIQ para cada grupo e período de coleta.....	36
TABELA 02 – Variação dos principais dados morfométricos obtidos para cada um dos grupos.....	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AME - Área média de esmagamento

cam - Câmera

DP - Desvio padrão

ENM - Eletroneuromiografia

EIT - Espalhar dos dedos intermediários de 2 a 4 do rato lesado (experimental)

EPL - Comprimento da pata do rato lesado (experimental)

ETOF – Distância de uma pata a outra do rato lesado (experimental)

ETS - Espalhar total dos dedos de 1 a 5 do rato lesado (experimental)

IFC- Índice Funcional do Ciático

IQQ - Intervalo inter-quartilico

IT - Intermediate Toes (Espalhar dos dedos intermediários do rato de 2 a 4)

LSD - Diferença mínima significativa

NIT - Espalhar dos dedos intermediários de 2 a 4 do rato normal (controle)

NPL - Comprimento da pata do rato normal (controle)

NTOF – Distância de uma pata a outra do rato normal (controle)

NTS - Espalhar total dos dedos de 1 a 5 do rato normal (controle)

obj - Objetiva

oc - Ocular

opt - Optvar

PB - Fosfato

PFI - Peroneal Functional Index (Índice Funcional do nervo fibular)

PL - Print Length (Comprimento da pata do rato)

P.O. - Pós-operatório

SFI - Sciatic Functional Index

SIMS – Sistema gerenciador do índice do ciático

SNC - Sistema Nervoso Central

TFI - Tibial Functional Index (Índice Funcional do nervo tibial)

TOF – Opposite Foot (Distância de uma pata a outra do rato)

TS - Toe Spread (Espalhar total dos dedos do rato de 1 a 5)

LISTA DE SÍMBOLOS

Ω - Ohms

$\varnothing$ - Diâmetro

Σ - Somatória

RESUMO

Uma investigação experimental sobre a influência da estimulação elétrica direta na regeneração do nervo usando uma lesão por esmagamento do nervo ciático de ratos como modelo foi realizada. Quarenta e dois ratos foram utilizados e divididos em quatro grupos, de acordo com o procedimento: 1) Sem lesão e sem estimulação; 2) lesão por esmagamento, sem estimulação; 3) sem lesão, com estimulação; 4) lesão por esmagamento, com estimulação. O nervo ciático foi exposto através de uma incisão lateral na coxa direita e submetido à lesão por esmagamento numa máquina universal de testes com uma carga de 15.000g concentrada em um segmento de 5mm por 10 minutos, nos grupos 2 e 4. Um estimulador elétrico foi desenvolvido para liberar uma corrente elétrica contínua de baixa intensidade ($1\mu\text{A}$). O mesmo foi implantado no espaço subcutâneo próximo a coluna lombar, o ânodo foi colocado proximalmente e o catodo distalmente ao esmagamento. A recuperação funcional foi avaliada em intervalos semanais até o 21º dia pós-operatório, através do Índice Funcional do Ciático (IFC) e calculada por um programa específico, apresentando melhora progressiva em ambos os grupos com lesão por esmagamento, porém mais acentuada naqueles com estimulação elétrica. Os animais foram sacrificados no 21º dia pós-operatório para análise histológica e morfométrica dos nervos, onde os resultados mostraram aumento da densidade das

fibras nervosas mas decréscimo do diâmetro das fibras nervosas, assim como um aumento no número e diâmetro dos vasos sanguíneos intra e extra-fasciculares no grupo estimulado. Similar, mas um menos evidente fenômeno foi observado no grupo sem lesão por esmagamento mas com estimulação elétrica. Concluiu-se que a estimulação elétrica direta de baixa intensidade provoca a regeneração nervosa após lesão por esmagamento em condições controladas e que o IFC é um método confiável para avaliar a recuperação nervosa uma vez que seus resultados aproximam-se do estudo morfométrico.

Palavras chave: lesão nervosa periférica, lesão por esmagamento, nervo ciático, campo elétrico, microcorrente, eletroterapia

ABSTRACT

An experimental investigation of the influence of direct electrical stimulation on nerve regeneration using a crush injury of the sciatic nerve of rats as model was undertaken. Forty two rats were used and divided into four groups according to the procedure carried out: 1) no injury, no stimulation; 2) crush injury, no stimulation; 3) no injury, stimulation; 4) crush injury, stimulation. The sciatic nerve was exposed through a lateral incision on the right thigh and submitted to a crush injury in an universal testing machine with a 15000 g load concentrated on a 5 mm-long segment for 10 minutes, in groups 2 and 4. An electrical stimulator was developed to deliver a continuous direct low intensity electrical current (1 μ A). The device was implanted into the subcutaneous space near the lumbar spine, the anode placed proximally and the cathode distally to the crush injury. Functional recovery was checked at weekly intervals up to the 21st postoperative day, by means of the Sciatic Functional Index (SFI) as calculated by a specific software and showed progressive improvement in both groups with crush injury but more marked in that with electrical stimulation (4). The animals were killed on the 21st postoperative day for morphometric and histological examination of the nerves, whose results showed an increased nerve fiber density but decreased nerve fiber diameter, as well as increased number and diameter of intra and extrafascicular blood vessels in the

stimulated group. Similar but less marked phenomena were observed in the group without crush injury but with electrical stimulation. It was concluded that low intensity direct electrical stimulation enhances nerve regeneration following a crush injury in controlled conditions and that the SFI is a reliable method to evaluate the nerve recovery since its results closely matched those of the morphometric study.

Key words: peripheral nerve lesion, crush injury, sciatic nerve, electric field, microcurrent, electrotherapy

1-INTRODUÇÃO

1.1 - Mecanismos da regeneração da lesão nervosa

Inúmeras e profundas alterações nervosas e musculares ocorrem em consequência da lesão de um nervo periférico. Embora existam amplos relatos de que os nervos periféricos se regeneram, restaurando as funções nervosas perdidas, sabe-se que a recuperação funcional raramente é completa e perfeita, as vezes apesar da aplicação de técnicas sofisticadas de reconstrução.

Sabe-se que, em condições normais, há uma contínua síntese e transporte do material axoplasmático, ou seja, da substância intracelular do neurônio, do corpo celular para a periferia e vice-versa, sendo que a função do nervo periférico é fortemente afetada pela interrupção desses dois fenômenos. A síntese e o transporte do material axoplasmático do sistema nervoso central (SNC) para a periferia e vice-versa são interrompidos no gânglio da raiz dorsal após a secção do axônio ou o esmagamento do nervo. Quais são as substâncias transportadas e os objetivos do transporte não estão ainda inteiramente esclarecidos, mas há evidências de que o movimento de moléculas no sentido bidirecional é uma forma de intercâmbio de informações e que, na presença de lesão axonal, o intercâmbio seria interrompido, privando tanto o SNC quanto os tecidos-alvos (periféricos) das informações.

Cerca de 4 a 5 dias após a lesão do nervo periférico, o corpo celular "registra" sua ocorrência e se prepara para repará-la, sintetizando o material axoplasmático, do que é evidência a concentração de corpúsculos de Nissl junto à raiz do axônio (SEDDON, 1975; SUNDERLAND, 1985). A regeneração axonal ocorre, então, pelo transporte intra-axonal do material sintetizado no corpo celular, e que é impulsionado ao longo do axônio por meio de movimentos amebóides, que se iniciam na raiz do coto proximal do axônio lesado. Para que ocorra a regeneração, além da síntese e transporte do material axoplasmático, deve haver a confluência de outros fatores positivos, que incluem alterações físico-químicas e ultra-estruturais no meio adjacente, com a proliferação de células de Schwann e fibroblastos e a regeneração da bainha de mielina (PARIZOTTO, 1988).

1.2 - Lesão nervosa por esmagamento

A lesão nervosa por esmagamento é um dos modelos experimentais mais utilizados para o estudo da regeneração dos nervos periféricos. MIRA (1979) submeteu o nervo ciático de ratos ao esmagamento e observou que as primeiras fibras regeneradas eram observadas em torno do 10º ao 15º dia, o retorno à normalidade ocorrendo em torno do segundo mês. Observou, ainda, que os nervos em regeneração continham cerca de 15% a mais de fibras mielinizadas do que o nervo normal, sendo que o diâmetro médio destas fibras não ultrapassava 80% do normal nem após dois anos da lesão. O autor dividiu as fibras nervosas mielinizadas em categorias segundo o diâmetro e encontrou, no 7º mês, 47% de fibras de grande

diâmetro no nervo regenerado, em comparação aos 61% encontrados no nervo normal, concluindo que o processo de regeneração era caracterizado pela formação de fibras de menor diâmetro, mas em maior número que o normal.

O método da lesão por esmagamento tem sido utilizado por inúmeros autores para o estudo dos processos biológicos envolvidos na regeneração nervosa (GRAGG & THOMAS, 1964; DE MEDINACELI, FREED & WYATT, 1982; DE MEDINACELI, DERENZO & WYATT, 1984; BAIN, MACKINNON & HUNTER, 1989; BRIDGE, BALL, MACKINNON et al., 1994), pois apresenta a vantagem de não destruir completamente a estrutura morfológica do nervo, como ocorre com a secção e sutura, que introduz variáveis de difícil controle, a começar com a habilidade do pesquisador em realizar o reparo, que deve ser microcirúrgico.

DAHLIN & RYDEVIK (1991) demonstraram lesões estruturais e funcionais nas compressões de nervos periféricos, enfatizando que os vasos intraneurais (*vasa nervorum*) são ocluídos à aplicação de pressões elevadas, causando isquemia focal. Além disso, ocorrem alterações estruturais das fibras nervosas, com desorganização dos envoltórios neurais, inclusive a bainha de Schwann, levando à deterioração da função nervosa. Demonstraram, ainda, que há interrupção do transporte axonal bidirecional a pressões iguais ou maiores que 200mmHg, aplicadas por 8 horas.

BRIDGE; BALL; MACKINNON et al. (1994) referiram o uso de pinças hemostáticas ou pinças de relojoeiro para produzir lesões por esmagamento no nervo ciático de ratos, com diferentes tempos de aplicação da pressão. Concluíram que a lesão produzida era do tipo axonotmesis, sem diferenças estatisticamente

significativas entre os grupos, e que o método era confiável e reprodutível. Entretanto, a pressão aplicada não era medida.

OLIVEIRA (1995) realizou um estudo de correlação morfo-funcional da regeneração do nervo ciático de ratos submetidos ao esmagamento com cargas controladas de três magnitudes (100 g, 500 g e 15.000g). Demonstrou que as alterações morfológicas produzidas eram diretamente proporcionais à magnitude da carga e que a recuperação funcional era diretamente proporcional aos índices morfométricos de regeneração.

1.3 - Avaliação funcional da regeneração nervosa

A avaliação da regeneração de nervos periféricos lesados em condições experimentais, em animais, fica restrita quase que exclusivamente aos métodos morfológicos, morfométricos e eletrofisiológicos, contemplando ora um, ora outro aspecto do fenômeno. Poucos métodos são voltados à avaliação da recuperação funcional, por motivos óbvios, e menos ainda à correlação com os achados dos métodos convencionais, como a histologia, microscopia eletrônica e a eletroneuromiografia (ENMG), os quais, por sua vez, são muito utilizados, isoladamente ou em associação.

GRAGG & THOMAS (1964) submeteram o nervo fibular de coelhos a lesão por esmagamento e, um ano após a lesão, encontraram uma velocidade de condução no seguimento distal de cerca de 75% daquela obtida no lado normal, situação que permaneceu ainda depois de 16 meses. Demonstraram também que a

velocidade de condução ficou em torno de 90% do normal para as fibras de maior diâmetro e maior espessura da bainha de mielina, mesmo que apresentando um comprimento inter-nodal menor que 50% do normal no segmento regenerado.

STEIN; NICHOLS; JHAMANDAS et al. (1977) analisaram a recuperação funcional de lesões de nervo periférico através de eletroneuromiografia (ENMG) em gatos, e GORDON & STEIN (1982) correlacionaram os achados da análise histológica com os da ENMG, observando as unidades motoras do músculo tríceps sural após reinervação, também em gatos. DEVOR; SCHONFELD; SELTZER et al. (1979) analisaram a velocidade de regeneração e o comprometimento sensitivo nas lesões por esmagamento no nervo ciático de rato, encontrando indícios de retorno da sensibilidade na área afetada já em torno do vigésimo dia após a lesão.

No que se refere à avaliação funcional da regeneração nervosa, GUTMANN & GUTMANN (1942) demonstraram que a perda da habilidade de “espalhar os dedos” durante a marcha era um critério confiável para avaliar o grau de lesão do nervo fibular em coelhos.

DE MEDINACELI; FREED; WYATT (1982) descreveram um novo método de avaliação funcional, chamado de Índice Funcional do Ciático (IFC) (Sciatic Functional Index, ou SFI) através da análise das pegadas de ratos submetidos a diferentes tipos de lesão do nervo ciático. Nas pegadas das patas traseiras dos animais, analisavam quatro parâmetros: TOF (distância de uma pata à outra), PL (comprimento da pata), TS (espalhar total dos dedos) e IT (espalhar intermediário dos dedos). Os autores realizaram este experimento com ratos intactos e ratos submetidos a esmagamento do nervo ciático. As pegadas foram registradas fazendo o rato caminhar sobre uma tira de filme radiográfico não exposto, sendo suas patas

traseiras embebidas com solução reveladora, que marcava o filme. De posse dos registros das pegadas, os autores introduziram a seguinte equação:

$$SFI = \left[\left(\frac{ETOF - NTOF}{NTOF} \right) + \left(\frac{NPL - EPL}{EPL} \right) + \left(\frac{ETS - NTS}{NTS} \right) + \left(\frac{EIT - NIT}{NIT} \right) \right] \times \frac{220}{4}$$

Onde:

E: Experimental

N: Normal

TOF: Distância de uma pata à outra

PL: Comprimento da pata

TS: Espalhar total dos dedos

IT: Espalhar dos dedos intermediários

Os resultados obtidos com esta equação foram expressados como um percentual quantitativo da função normal, em que 0 (zero) corresponde à função normal e -100 (menos cem) corresponde à disfunção completa. De acordo com DE MEDINACELI; FREED; WYATT (1982), este método permitiu uma avaliação mais fácil da recuperação funcional do nervo ciático, bem como uma correlação com os indicadores morfológicos de recuperação, embora tenha envolvido complicadas medidas e cálculos matemáticos.

DE MEDINACELI; DERENZO; WYATT (1984) aperfeiçoaram o método, descrevendo a primeira avaliação do IFC por computador, através de um sistema gerenciador do Índice do Ciático (SIMS). Eles testaram o novo método analisando as pegadas de sete ratos Sprague-Dawley submetidos a esmagamento do nervo ciático, a intervalos regulares, até o 53º dia. Como no trabalho anterior, o registro das pegadas foi realizado utilizando-se tiras de filme radiográfico, sendo as patas

traseiras molhadas previamente em uma solução reveladora. As imagens das pegadas foram digitalizadas e os parâmetros previamente estabelecidos foram medidos, armazenados e manipulados através do sistema gerenciador. Os autores compararam os dados obtidos com este método àqueles obtidos com o cálculo manual descrito anteriormente e concluíram que o SIMS permitiu uma avaliação funcional do nervo ciático mais homogênea, rápida e precisa. Entretanto, a aplicação do método envolveu o uso de equipamento complexo e dispendioso.

Baseados em análises de regressão linear múltipla dos parâmetros calculados nas pegadas dos ratos com lesão completa do nervo ciático e lesões isoladas dos nervos tibial e fibular, respectivamente, BAIN; MACKINNON; HUNTER (1989) modificaram o IFC descrito anteriormente e introduziram o Índice Funcional Tibial (TFI) e o Índice Funcional Fibular ou Peroneal (PFI). As pegadas dos animais foram obtidas do mesmo modo que nos trabalhos anteriores de DE MEDINACELI; FREED; WYATT (1982) e DE MEDINACELI; DERENZO; WYATT (1984), e os parâmetros avaliados foram: PL (comprimento da pata), TS (espalhar total dos dedos) e IT (espalhar dos dedos intermediários). Fatores de correção individualizados foram determinados para cada um dos índices e aplicados ao cálculo final, como mostram as fórmulas desenvolvidas:

$$SFI = -38,3 \times \frac{EPL - NPL}{NPL} + 109,5 \times \frac{ETS - NTS}{NTS} + 13,3 \times \frac{EIT - NIT}{NIT} - 8,8$$

$$TFI = -37,2 \times \frac{EPL - NPL}{NPL} + 104,4 \times \frac{ETS - NTS}{NTS} + 45,6 \times \frac{EIT - NIT}{NIT} - 8,8$$

$$PFI = 174,9 \times \frac{EPL - NPL}{NPL} + 80,3 \times \frac{ETS - NTS}{NTS} - 13,4$$

Onde:

N = Normal

E = Experimental

PL = Comprimento da pata

TS= Espalhar total dos dedos

IT = Espalhar dos dedos intermediários

O parâmetro TOF (distância de uma pegada à outra) foi excluído dos cálculos, por ter sido considerado pouco confiável e cada parâmetro foi avaliado independentemente através de regressão linear. Para os três índices avaliados, o valor -100 (menos cem) correspondeu à lesão completa do nervo, e o valor 0 (zero) correspondeu ao nervo normal, ou com 100% da função, valor observado apenas no grupo intacto (sem lesão).

LOWDON; SEABER; URBANIAK (1988) propuseram o uso de tiras de papel impregnado com solução de azul de bromofenol ao invés de filme radiográfico, como utilizado até então, para o registro das pegadas dos animais. O papel tratado com essa substância apresenta a cor amarela, adquirindo a cor azul quando molhado. Sendo as patas traseiras dos animais embebidas com água, suas pegadas apareciam, então, impressas em azul. Dentre as vantagens deste método estão o baixo custo, de aproximadamente um terço em relação ao filme radiográfico, menor risco de escorregões dos animais ao caminharem sobre o papel e melhor qualidade de impressão das pegadas, que se tornam mais nítidas, facilitando sua identificação e mensuração. Entretanto, na preparação do papel impregnado com o azul de bromofenol deve-se tomar o cuidado de armazená-lo em local seco e protegido por embalagem plástica, para que não absorva umidade.

SELLI (1998) aperfeiçoou o método de análise da impressão das pegadas dos ratos, desenvolvendo um programa de computador (software) específico para a medida dos parâmetros propostos por DE MEDINACELI; FREED; WYATT (1982), DE MEDINACELI; DERENZO; WYATT (1984) e por BAIN; MACKINNON; HUNTER (1989). Segundo esse método, as impressões das pegadas contidas nas tiras de papel são digitalizadas por meio de um *scanner* e os parâmetros propostos são medidos, simplesmente marcando-os com o cursor do *mouse* numa sequência pré-estabelecida. O programa, então, realiza todos os cálculos, fornecendo rapidamente o valor de todos os índices funcionais.

OLIVEIRA (1995) empregou o método desenvolvido por SELLI (1998) antes mesmo de sua publicação, para avaliar a recuperação funcional de ratos submetidos a lesão por esmagamento do nervo ciático com cargas de 100 g, 500 g e 15.000 g por um período de dez minutos. Correlacionou os dados dessa avaliação com aqueles de estudos morfométricos dos nervos em regeneração e concluiu que existe uma correlação direta entre os dois métodos, de modo que os índices funcionais podem ser considerados muito confiáveis.

1.4 – Propriedades elétricas dos tecidos

As funções orgânicas são, de modo geral, regidas ou influenciadas por impulsos elétricos de origem biológica, que podem ser alterados por situações patológicas, como as lesões teciduais. Essas alterações foram descritas por alguns autores.

BURR* e BARNES** apud WATSON (1998) e WEISS; KIRSNER; EAGLSTEIN (1990) descreveram alterações de polaridade elétrica em tecidos moles lesados. O tecido lesado inicialmente mostra polaridade positiva, que passa a negativa mais tarde, acreditando-se que a inversão da polaridade esteja relacionada com o período proliferativo da cicatrização. Além da inversão da polaridade, BARNES** mediu a tensão elétrica antes e depois de produzir uma lesão por lixamento na ponta do dedo de 70 voluntários. Registrou valores inferiores a 1mV imediatamente antes, e de 15 a 50mV imediatamente após a lesão, com a positividade do lado da lesão.

BORGENS (1982), após revisão bibliográfica, referiu a presença de um campo elétrico formado em tecidos lesados, com alteração da polaridade com o tempo. Sabe-se hoje que os tecidos vivos possuem eletropotenciais de corrente constante, que regulam o seu processo natural de cicatrização, conforme demonstrado pelas alterações bioelétricas conseqüentes a lesões de tecidos como o osso, a pele, o músculo e o nervo, havendo evidências de que o processo de regeneração é modificado na presença de estímulo elétrico. O que permanece desconhecido é se a atividade elétrica tecidual é apenas uma conseqüência de processos metabólicos e fisiológicos locais ou se ela funciona como um mecanismo iniciador ou controlador para o processo de cicatrização.

BECKER & SPADARO*** apud WATSON (1998) sugerem que a atividade elétrica normal dos tecidos faz parte de uma rede elétrica global. A perturbação dessa

* BURR, H.S.; HARVEY, S.C.; TAFFEL, M. (1938). Bio-electric correlates of wound healing. *Yale J. of Biology and Medicine* 11: 103-107

** BARNES, T.C. (1945). Healing rate of human skin determined by measurement of the electrical potential of experimental abrasions. *Am J. of Surgery* 69: 82-88

*** BECKER, R.O.; SPADARO, J.A. (1972). Electrical stimulation of partial limb regeneration in mammals. *Bulletin of the New York Academy of Medicine* 48 (4): 627-641

atividade, causada por uma lesão, desencadearia o estímulo para o reparo. O retardo do reparo ou cicatrização, por desequilíbrio da atividade global, poderia ser resolvido através do uso de uma corrente elétrica externa.

WEISS; KIRSNER; EAGLSTEIN (1990) sugerem que, se a atividade elétrica está presente ou se altera no processo de cicatrização de tecidos lesados, então pode-se esperar que a exposição artificial de feridas à estimulação elétrica altere este processo.

1.5 - Estimulação elétrica da cicatrização ou regeneração tecidual

A utilização de corrente elétrica de baixa intensidade para cicatrização de feridas é antiga, havendo relatos de que já no século XVII eram utilizadas lâminas de ouro, geradoras de pequena atividade elétrica no meio eletrolítico, para obter a cura das lesões cutâneas da varíola. No século XIX, a corrente elétrica chegou a ser utilizada em pacientes para o tratamento de pseudo-artrose (BRIGHTON, 1981).

FUKADA & YASUDA (1957) descreveram o efeito piezo-elétrico do osso, correlacionando-o com sua capacidade regenerativa, visto ser o osso o único tecido, ao lado do tecido nervoso, dotado de capacidade de regeneração e não apenas de cicatrização. Depois disso, as propriedades elétricas, piezo-elétricas e de eletreto do osso e de outros tecidos passaram a ser intensamente investigadas, dando início a um novo capítulo na medicina, que é o da estimulação elétrica do crescimento e regeneração tecidual (BASSET & BECKER (1962)*, BASSET; PAWLUK;

* BASSET, C.A.L.; BECKER, R.O. (1962). Generation of electric potentials by bone in response to mechanical stress. *Science*, 137

BECKER (1964)^{**}, ATHENSTAEDT (1974)^{***}, MASCARENHAS (1974)^{****}, MASCARENHAS & KÖBERLE (1972)^{*****} apud FUENTES; SOUZA; VALERI et al. (1982).

BASSET; LAND; HERRMANN (1968), ao estimularem fibroblastos com um campo elétrico de corrente direta exógeno, demonstraram um aumento de até 20% na síntese de DNA e de até 100% na síntese de colágeno. ASSIMACOPOULUS (1968) tratou úlceras crônicas, que não respondiam a nenhuma forma de tratamento, com corrente elétrica direta de até 0,1 mA e obteve cicatrização completa em seis semanas.

WOLCOTT; WHELLER; HARDWICKE et al. (1969) tratou 83 úlceras isquêmicas com corrente elétrica direta de baixa intensidade. Aplicava na lesão, inicialmente e por no mínimo três dias, uma polaridade negativa, invertendo-a posteriormente, quando era atingido o ápice da cicatrização. Os autores observaram que ocorria uma redução no número de colônias de bactérias nas feridas estimuladas pelo pólo negativo, seguido de um incremento no processo de cicatrização pelo uso do pólo positivo. Observaram ainda que, em determinada altura, o processo de cicatrização da ferida estaciona, situação em que deve ser invertida a polaridade.

Experimento similar foi realizado por GAULT & GATENS (1976), em pacientes com úlceras isquêmicas bilaterais, ficando demonstrado que a velocidade

^{**} BASSET, C.A.L.; PAWLUCK, R.J.; BECKER, R.O. (1964). Effects of electrical currentes on bone "in vivo". *Nature*. 204- 652

^{***} ATHENSTAEDT, H. (1974). Pyroelectric and piezoelectric properties of vertebrates. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 238:68

^{****} MASCARENHAS, S. (1974). The electrical effect in bone and biopolymer and the bone-water problem. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 238:36

^{*****} MASCARENHAS, S.; KÖBERLE, G. (1972). Possible biological importance of the electret effect in bone and collagen. *Proceedings of the First Latin American Conference on Medical Physics and Radiation Protection*, São Paulo, Brasil.

média de cicatrização no lado estimulado era de 30% da área por semana, contra 14,7% no grupo não estimulado.

BORGENS; VANABLE; JAFFE (1977) num de seus primeiros trabalhos sobre bioeletricidade e regeneração tecidual, estimularam a pata traseira amputada de rãs, demonstrando tendência à regeneração no grupo submetido à estimulação elétrica. Demonstraram, ainda, diferenças significativas entre a estimulação catodal e anodal e o grupo controle, com crescimento maior do segmento regenerado na estimulação catodal. Atribuíram este crescimento ao campo elétrico formado ao redor do eletrodo, confeccionado em prata, e não aos produtos da degradação eletrolítica do eletrodo (cloreto de prata). Por outro lado, observaram destruição tecidual ao redor do ânodo, mas não descartaram a possibilidade de esta ter sido causada pelos produtos da degradação eletrolítica do eletrodo, confeccionado em platina.

BORGENS; VANABLE; JAFFE (1979) obtiveram resultados semelhantes ao estimularem eletricamente o membro amputado de “*xenopus*” com uma corrente de 0,1 μ A, empregando eletrodos de aço inoxidável. Observaram crescimento do tecido regenerado significativamente maior no grupo estimulado.

CHENG; HOOFF; BOCKX et al. (1982) relatam o efeito da corrente elétrica na produção de ATP, síntese de proteínas e transporte através da membrana celular, em tecido da pele de ratos. Ressaltaram a efetiva estimulação da corrente elétrica, chegando a resultados bastante animadores, mas ressaltaram que a corrente deve ser de baixa intensidade.

Segundo BRIGHTON (1981), a utilização de eletricidade para cicatrizar tecidos é antiga, pois já em 1841 houve relato do tratamento de pseudo-artroses com

estímulos elétricos. O tratamento alternativo de pseudo-artroses com a estimulação elétrica direta passou a ser mais intensamente investigado na década dos anos 70, tanto em animais, como em seres humanos, com os mais diversos enfoques, levando à conclusão de que um campo elétrico de corrente direta, com intensidade na faixa dos micro-ampéres (μA), estimula a consolidação de pseudo-artroses.

No entanto, as conclusões são ainda muito controversas, não havendo concordância em relação a vários parâmetros, como por exemplo o material de confecção dos eletrodos e a dosagem utilizada na estimulação. BRIGHTON (1981) relatou que diferentes materiais se comportam de forma diferente para o tratamento das pseudo-artroses, exigindo um ajuste na dose de estimulação. Cita doses entre 5 e 8 μA para cátodos de platina ou aço inoxidável, e entre 0,1 e 1,1 μA para cátodos de prata. A revisão da literatura mostra que intensidades de corrente elétrica entre 5 e 20 μA são utilizadas pelos diversos autores e que o estímulo é sempre catodal, ou seja, com o pólo negativo sobre o foco da pseudo-artrose (FRIEDENBERG, ROBERTS, DIDIZIAN et al., 1971; BRIGHTON, FRIEDENBERG, MITCHELL et al., 1977; BRIGHTON, 1981; BASSET, MITCHELL & GASTON, 1981; O'REILLY, COOK, GRAFFNEY et al., 1981; FUENTES, MARCONDES, VALERI et al., 1982; FUENTES, MARCONDES & PORTUGAL, 1982; BRIGHTON & POLLACK, 1985 e CUNDY & PATERSON, 1990).

BRIGHTON; SHAMAN; HEPPENSTALL et al. (1995), com base nas observações de 271 pacientes portadores de pseudo-artrose da tíbia, concluíram que o sucesso da estimulação elétrica está relacionado com a época do início da estimulação e com a idade da lesão, sendo mais eficaz a estimulação precoce.

1.6 – Estimulação elétrica da regeneração de tecido nervoso

JAFFE & POO (1979), estudando gânglios da raiz dorsal de nervos periféricos estimulados com campo elétrico de 70 a 140 mV/mm, por 4 a 8 horas, em embriões de galinha, observaram que o crescimento axonal foi estimulado na presença do campo elétrico, e que esse crescimento foi da ordem de 2 a 5 vezes mais rápido no cátodo em comparação ao ânodo. Confirmaram esse fenômeno invertendo a polaridade do campo, sendo que o pólo negativo aumentou a velocidade deste crescimento de 10,7 $\mu\text{m/h}$ para 14,3 $\mu\text{m/h}$.

HINKLE; Mc GAIG; ROBINSON (1981), estimulando embriões de rã, observaram que, na presença do pólo negativo, houve aumento da emissão de neurites pelos neurônios e de crescimento do mioblastos, ficando claro que a orientação de nervos e músculos é influenciada pela presença de um campo elétrico de baixa intensidade. Admitiram que pouco se sabia sobre a seqüência normal de eventos intracelulares, tornando impossível especular o ponto em que a intervenção da corrente elétrica age neste sistema.

BORGENS; BLIGHT; MURPHY et al. (1986), BORGENS; BLIGHT; GINNIS (1990) e BORGENS (1999) aplicaram estimulação catodal em local cranialmente situado em relação a uma lesão medular espinal de mamífero (porco) e observaram que houve crescimento axonal ao redor da lesão, mas não através dela. Entretanto, quando o estímulo foi aplicado em ponto distalmente situado, o crescimento ocorreu através da lesão, levando a uma regeneração mais acelerada, em comparação ao grupo controle.

POLITIS; ZANAKIS; ALBALA (1988) demonstraram o incremento no processo de regeneração em nervo óptico de mamífero com estimulação catodal distal.

Os estudos sobre a estimulação elétrica da regeneração de tecidos nervosos incluem os nervos periféricos, que parecem se beneficiar dela. Os primeiros sinais desta regeneração aparecem em torno de 3 a 4 semanas após o início da estimulação, mas alguns autores relatam que esta continua a ocorrer até um período de 90 dias. Há unanimidade em relação a que o estímulo deve ser catodal distal à lesão, mas, em relação a intensidade da corrente e ao material utilizado na confecção dos eletrodos há muita variação de um estudo para outro. A intensidade empregada nos diferentes estudos variou de 0,5 a 10 μ A, com os eletrodos implantados no tecido subcutâneo, mas o aumento da velocidade de regeneração de nervos periféricos foi mais evidente com as baixas intensidades (WILFREDA & HOPF, 1983; POMERANZ, MULLEN & MARKUS, 1984; KERNS, FAKHOURI, WEINRIB et al., 1986; KERNS, PAVKOVIC, FAKHOURI et al., 1987; McDEVITT, FORTNER, POMERANZ et al., 1987; ROMAN, STRAHLENDORF, COATES et al., 1987; BEVERIDGE & POLITIS, 1988; POLITIS, ZANAKIS & ALBALA, 1988; KERNS, FAKHOURI, WEINRIB et al., 1991; POMERANZ & CAMPBELL, 1993; SHEN & ZHU, 1995).

Foi o objetivo do presente trabalho estudar a influência da aplicação de corrente elétrica direta de baixa intensidade na regeneração do nervo ciático de ratos submetidos a esmagamento com carga de 15.000g por 10 minutos, à luz da morfometria do nervo e do Índice Funcional do Ciático (IFC), pela análise da impressão da pegada da pata traseira do animal.

2-MATERIAL E MÉTODO

2.1 - Animal e Grupos Experimentais

Todo o trabalho experimental foi desenvolvido no Laboratório de Bioengenharia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Foram utilizados ratos machos da raça Wistar, com peso corporal variando entre 300 e 350 gramas, fornecidos pelo biotério geral da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Foram operados quarenta ratos, mantidos inicialmente em gaiolas coletivas com cinco animais cada, com dieta na base de ração-padrão e água *ad libitum*. Os animais foram, posteriormente, mantidos em gaiolas individuais, devidos a intercorrências tais como a mutilação de um animal por outro, remoção do material (circuito estimulador) implantado no espaço subcutâneo e infecções, que levaram à perda de vários animais, posteriormente repostos. Tal medida foi complementada com a aplicação sistemática de uma dose de antibiótico logo após a cirurgia, evitando assim a infecção e morte dos animais.

De acordo com o procedimento realizado, os ratos foram divididos em quatro grupos:

Grupo 1: ratos sem lesão, com estimulador inativo implantado (n=9);

Grupo 2: ratos submetidos a esmagamento do nervo ciático com carga de 15.000g por 10 minutos, com estimulador inativo implantado (n=10);

Grupo 3: ratos sem lesão, com o estimulador ativo implantado; corrente elétrica constante de 1 μ A (micro-ampère) (n=10);

Grupo 4: ratos submetidos a esmagamento de 15.000g por 10 minutos, com estimulador ativo implantado; corrente elétrica constante de 1 μ A (micro-ampère) (n=14).

2.2 - O circuito estimulador

O circuito estimulador confeccionado para o presente estudo foi baseado naquele desenvolvido por SHEN & ZHU (1995), que na realidade era um modelo aperfeiçoado do circuito utilizado por KERNS; PAVIKOVIC; FAKHOURI et al. (1987). Para a confecção do circuito foi utilizada uma bateria de 1,5 V e uma resistência de 1,3 M Ω , de dimensões e peso muito reduzidos, para utilização na construção de computadores. Esses componentes foram calculados para fornecerem uma corrente elétrica contínua de 1 μ A. Foi empregado, como cabo e eletrodo, fio monofilamento de aço inoxidável de 0,65 mm de diâmetro, revestido de polietileno azul (Ethicon®). Após a soldagem dos cabos de aço inoxidável à bateria e à resistência, o conjunto recebeu primeiro um revestimento de resina epóxi e, depois de seca, uma camada de resina de silicone de qualidade médica (Dow Corning®). Depois da aplicação dos revestimentos, o corpo do circuito mediu 17 mm de

diâmetro e os eletrodos mediram cerca de 2 cm de comprimento, sendo o peso final do conjunto de aproximadamente 3 g (FIGURA 1).

Após a confecção, os estimuladores eram esterilizados num recipiente fechado com pastilhas de formalina, por no mínimo 24 horas. Pouco antes da sua utilização, eles eram lavados com solução degermante de polivinilpirolidona-iodo (Laboriodine, Glicolabor®), ficando depois imersos em solução fisiológica por cerca de 10 minutos, até o momento da implantação.

Vários circuitos foram previamente confeccionados, com a finalidade exclusiva de testar a intensidade da corrente elétrica liberada, bem como a sua duração e estabilidade, tendo sido utilizado para isso um multímetro digital (ET-2060®). Ficou demonstrado que a corrente liberada variava muito pouco em torno de 1 μ A, perdurando com grande estabilidade por mais de um mês.

* Dow Corning®

FIGURA 1- Representação esquemática do estimulador elétrico.

2.3 - Anestesia e Procedimentos Cirúrgicos

Os ratos eram inicialmente pesados e identificados e, logo a seguir, colocados na passarela de marcha para aprendizado e posterior registro da impressão pré-operatória das pegadas das patas traseiras. Para a realização dos procedimentos operatórios, o animal era anestesiado com solução de pentobarbital sódico (Nembutal-Abbott) na dose de 60 mg/Kg de peso corporal, por via intraperitoneal. Em seguida era realizada a tricotomia na face lateral da coxa direita e o animal era posicionado em decúbito ventral, com abdução das patas traseiras, que eram fixadas à mesa operatória. A antissepsia era feita com solução alcoólica de iodo a 20% (álcool iodado).

O nervo ciático era, então, abordado através de uma incisão cutânea longitudinal retilínea na face lateral da coxa, indo desde a altura do trocanter maior até o joelho, seguida de divulsão romba entre o músculo quadríceps e os glúteos. Nos grupos em que se produziu a lesão por esmagamento, uma vez isolado o nervo ciático, o animal era transportado para a máquina universal de ensaios, dotada de uma célula de carga de alta precisão para cargas até 200 Kg e de acessórios que permitiam o esmagamento de um segmento de 5 mm de comprimento. O esmagamento era, então, realizado numa porção intermediária do nervo, entre a sua emergência na raiz da coxa e sua bifurcação próximo ao joelho, com carga estável de 15.000 g por um período de 10 minutos. O tempo necessário para a carga de 15.000 g ser atingida foi em média de 30 segundos (FIGURA 2).

Após o esmagamento, o nervo ciático era destacado cuidadosamente dos acessórios e deixado em seu trajeto de origem, e o rato era transportado de volta à

sala cirúrgica, para implantação do circuito elétrico estimulador. O corpo do circuito era implantado no espaço subcutâneo, em local situado proximal e dorsalmente à incisão cutânea, e os cabos dos eletrodos eram passados por um pequeno orifício aberto através da musculatura, de forma que ficassem adjacentes ao nervo. O pólo positivo (ânodo) era fixado ao músculo piriforme, próximo à emergência do ciático, e a cerca de 8 mm da área média de esmagamento (AME); o pólo negativo (cátodo) era fixado junto ao outro extremo do nervo, cerca de 7 mm distalmente à área média de esmagamento (AME), de modo que a distância média entre um pólo e outro era de 15 mm (FIGURA 3).

Os cabos eram suturados com pontos isolados de fio monofilamento de nylon 4/0 (Ethicon®) à musculatura vizinha para garantir sua estabilidade; particular cuidado era tomado com o cátodo, que era firmemente preso, de modo que o nervo ficasse passando sobre ele com o mínimo de atrito possível. Terminada a implantação do circuito, era medida a corrente liberada, para confirmar sua passagem e registrar seu valor. A musculatura e a pele eram então aproximadas e suturadas com pontos simples separados do mesmo fio monofilamento de nylon 4/0 e a ferida era apenas lavada com solução anti-séptica (álcool iodado a 20%), ficando exposta.

Nos grupos em que não se produziu o esmagamento, todos os demais procedimentos eram idênticos, o nervo ciático sendo exposto e o estimulador sendo implantado como descrito anteriormente.

FIGURA 2- Esmagamento do nervo ciático na máquina universal de ensaios:

A- Máquina Universal de Ensaio

B- Dispositivo para esmagamento com 5mm de largura

FIGURA 3- Posicionamento e fixação dos eletrodos, o ânodo junto ao músculo piriforme e o cátodo sob a porção distal do nervo, distalmente à área média de esmagamento de 5 mm de extensão.

2.4 - Impressão das pegadas. Obtenção e análise.

Para registrar as pegadas dos ratos, foram utilizadas tiras de papel embebidas com solução de azul de bromofenol previamente preparadas, medindo 43 cm de comprimento por 8,7 cm de largura, medidas adequadas para a passarela de marcha dos ratos existente no Laboratório de Bioengenharia e construída segundo desenho de DE MEDINACELI; FREED; WYATT (1982).

Para a preparação do papel, o azul de bromofenol em sua forma anidra (Sigma) foi diluído a 1% em acetona absoluta, adquirindo uma coloração alaranjada. As folhas de papel eram mergulhadas nesta solução e colocadas ao sol para secar, sendo em seguida cortadas em tiras e armazenadas em sacos plásticos para que não tivessem contato com umidade, que altera sua cor para o azul.

Os animais eram feitos caminhar na passarela revestida com as tiras de papel assim preparadas, com as patas traseiras embebidas em água, que imediatamente mudava a cor da pegada de amarelo para azul (FIGURA 4). As pegadas ficavam, então, impressas nas tiras de papel, que eram deixadas a secar para a marcação das medidas necessárias para o cálculo do IFC (FIGURA 5). Posteriormente eram analisadas utilizando-se um programa de computador (*software*) desenvolvido por SELLI (1998) (FIGURA 6), para obtenção do IFC proposto por BAIN; MACKINNON; HUNTER (1989), que leva em consideração o comprimento da pegada (Print Length), a abertura total dos dedos, do 1º ao 4º (Toe Spread), e a abertura dos dedos intermediários, 2º e 3º (Intermediate Toes) (FIGURA 5). As impressões das pegadas de cada animal foram obtidas antes da operação, para servir de controle, e depois desta, com 7, 14 e 21 dias, quando os animais foram

sacrificados para extração dos nervos ciáticos e processamento para o estudo morfométrico.

As impressões das pegadas eram digitalizadas através da cópia num *scanner* e introduzidas no programa de SELLI, que permite a captura, identificação e análise das imagens, possibilitando, inclusive, a aplicação de outros métodos de avaliação do IFC (DE MEDINACELI, FREED & WYATT, 1982; DE MEDINACELI, DERENZO & WYATT, 1984; CARLTON & GOLDBERG, 1986), bem como dos Índices Funcionais do Tibial e do Peroneiro (BAIN; MACKINNON & HUNTER, 1989). Uma vez instalada a imagem da pegada no monitor, os parâmetros analisados eram medidos, bastando para isso que o cursor do *mouse* seja clicado nos pontos pré-determinados na seqüência correta. O programa calculava e fornecia, então, de imediato, o valor do Índice, que também era por ele armazenado.

FIGURA 4- Fotografia de um animal caminhando na passarela, estando suas impressões plantares já evidentes, em azul.

FIGURA 5 - Representação esquemática das medidas realizadas para calcular o Índice Funcional do Ciático (IFC). E: Experimental (pata operada); N: Normal (pata oposta); TS: Abertura total dos dedos (1° ao 5°); IT: Abertura dos dedos intermediários (2° ao 4°); e PL: Comprimento da pegada.

FIGURA 6- Programa utilizado para realizar as medidas do IFC (SELLI,1998)

2.5 - Análise Histológica e Morfométrica

O processo de análise histológica e morfométrica, desde a preparação do material até a análise dos resultados, foi realizado no Laboratório de Neurologia Aplicada e Experimental da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

Todos os animais foram sacrificados no 21º dia pós-operatório, por inalação de éter anestésico, e os nervos ciáticos foram removidos pela mesma incisão operatória inicial, no seu comprimento total, ou seja, da sua emergência no nível do trocanter maior até a bifurcação dos ramos tibial e fibular. Em seguida, foram fixados em glutaraldeído a 2,5% em água, com tampão PB a 0,1 M, por duas horas. Uma vez fixado o nervo, um segmento de cerca de 5 mm de comprimento foi removido da sua porção distal, começando a 3 mm da lesão. Esse segmento foi novamente fixado e lavado com tampão PB 0,1 M, sendo mantido em geladeira.

Os segmentos assim obtidos foram pós-fixados em tetróxido de ósmio a 2%, por 12 horas, sendo posteriormente lavados em tampão cacodilato isotônico e mantidos em geladeira; em seguida, foram desidratados em solução de álcool de 25% à 100%, respectivamente, e incluídos em resina plástica (EPON-812) por 72 horas a 60°C.

Foram, então, obtidos cortes semifinos (0,5 µm de espessura), corados com parafenilenodiamina a 1%. Os cortes foram analisados em um microscópio de luz ZEISS Axiophoto, onde primeiramente foi realizada a escolha do campo para captura da imagem (magnificação: 2,5obj. x 1,6opt. x 0,5 cam.). A captura das imagens foi feita com o auxílio dos seguintes equipamentos: Microscópio de luz ZEISS

Axiophoto, Microcomputador IBM-PC, câmera de vídeo JVC, platina motorizada ZEISS e mesa de recursos fotográficos acoplada ao microscópio.

Os parâmetros avaliados foram a densidade de vasos sanguíneos, a área fascicular média (razão entre somatória das áreas fasciculares e o número de fascículos), a densidade média de fibras (razão entre a somatória das densidades de cada fascículo e o número de fascículos) e a razão G (razão entre o diâmetro mínimo do axônio e o diâmetro mínimo da fibra).

Capturada a imagem dos fascículos e utilizando uma ferramenta do *software* KS400 V2.0 (Measure Interactive), era medida a área de cada fascículo (área fascicular), circundando a borda interna do seu perineuro com auxílio do *mouse*. Com esses dados era calculada a área fascicular média.

Em seguida, foi realizada a captura de quadros seqüenciais de imagens do interior dos fascículos, utilizando-se a moldura (*frame*) da mesa de recursos fotográficos para a marcação desses quadros (magnificação: 100obj. x 1,6opt. x 0,5cam.). Estas imagens foram arquivadas com uma identificação seqüencial, sendo depois processadas com auxílio do *software* KS 400 V2.0, para ajustes e medida de cada fibra. Foi, então, realizada a contagem das fibras e o cálculo da sua densidade (contagem total de fibras/área total ocupada pelas fibras), para cada fascículo, que forneceu os dados para o cálculo da densidade média das fibras. Finalmente, estes dados obtidos foram analisados pelo aplicativo SigmaPlot, que permite uma apresentação gráfica dos dados de forma científica.

2.6- Análise estatística

A análise estatística foi realizada para comparação dos resultados do IFC e da análise morfométrica.

No caso do IFC, com os valores obtidos, foi determinado o índice médio de cada grupo, em cada período. Para análise dos resultados foi utilizado a análise de variância (ANOVA), utilizando o teste de KRUSKAL-WALLYS (comparações múltiplas não-paramétricas: LSD- Diferença mínima significativa) considerando o nível de significância de 5 % ($p \leq 0,05$). O coeficiente de correlação de SPEARMAN (r) foi considerado para detectar possível correlação entre os períodos e o IFC, nos grupos 2 e 4.

Para avaliação dos resultados da morfometria, a análise estatística foi realizada através da comparação simultânea entre os quatro grupos experimentais e seus respectivos intervalos, utilizando o teste não-paramétrico de KRUSKAL-WALLYS, com nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$).

3-RESULTADOS

3.1 – Generalidades

No início do experimento alguns ratos morreram, quando ainda eram mantidos em gaiolas coletivas, o que propiciou o canibalismo, com uns devorando as patas operadas dos outros. Esse problema foi resolvido com a manutenção posterior em gaiolas individuais. Outros morreram devido a infecção, problema solucionado com a administração rotineira de antibiótico em dose única imediatamente após o ato operatório. Problemas dessa natureza não mais se repetiram até o final do experimento. De modo geral, os ratos toleraram bem o procedimento cirúrgico e a presença do circuito implantado no espaço subcutâneo próximo à sua coluna vertebral.

3.2 - Análise Funcional da Marcha (IFC)

No total, foi feito o estudo de 168 impressões da pegada, que incluiu o registro pré-operatório e aos 7, 14 e 21 dias de pós-operatório. Nos grupos considerados de controle (1 e 3), o IFC manteve-se estável próximo à normalidade,

em torno de -10, não tendo havido perda funcional. Já nos grupos com lesão (2 e 4), o IFC esteve em torno de -100 na medida obtida no 7º dia, significando perda funcional completa. No 14º dia P.O., o IFC médio obtido nos grupos 2 e 4 foi respectivamente $-88,9 \pm 7,4$ e $-72,6 \pm 12,7$, e no 21º dia P.O., foi respectivamente $-50,5 \pm 5,3$ e $-16,0 \pm 11,1$, diferença esta que foi estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$) (FIGURA 7/ TABELA 1).

O coeficiente de correlação de SPEARMAN (r), obtido na comparação entre os grupos 2 e 4, mostrou a existência de uma correlação positiva estatisticamente significativa ($p < 0,001$) entre o IFC e os dias após a cirurgia.

FIGURA 7- Variação temporal do Índice Funcional do Ciático. Grupo 1 (◆): sem lesão e sem estímulo; grupo 2 (□): com lesão e sem estímulo; grupo 3 (△): sem lesão e com estímulo; e grupo 4 (●): com lesão e com estímulo

TABELA 1- Comportamento médio e mediano do Índice Funcional do Ciático e suas respectivas variações, desvio padrão e intervalo inter-quartilico, para cada grupo e período de coleta.

Período		Pré				7 dias PO				14 dias PO				21 dias PO			
Grupos	(n)	M	DP	MD	IIQ	M	DP	MD	IIQ	M	DP	MD	IIQ	M	DP	MD	IIQ
G1	9	-9,4	15,5	-8,9	13,0	-4,4	12,3	-6,7	8,2	-8,3	11,2	-10,0	8,1	-11,6	7,0	-8,0	5,0
G2	10	-10,2	7,8	-10,0	4,5	-97,2	4,1	-97,7	2,6	-88,6	7,8	-90,5	4,1	-50,5	5,6	-48,7	3,4
G3	10	-3,0	16,6	-3,7	12,3	-15,7	14,3	-11,0	10,7	-10,7	9,3	-9,6	8,3	-8,0	11,5	-11,3	9,0
G4	13	-5,2	9,3	-4,9	5,5	-91,9	8,4	-93,4	6,6	-72,6	13,2	-72,2	12,1	-16,0	11,6	-19,5	4,6

M: média

DP: desvio padrão

MD: mediana

IIQ: intervalo inter-quartilico

3.3- Análise Histológica

Foram analisados os cortes semifinos (0,5 μ m de espessura) corados pelo parafenilenodiamina a 1%, obtidos nos diferentes grupos, cujos resultados estão relacionados a seguir.

3.3.1- Grupo 1 (Sem lesão e sem estímulo)

Neste grupo de controle, as fibras mielínicas de grande e pequeno diâmetro mostram o aspecto morfológico normal típico, com a bainha de mielina de espessura proporcional ao diâmetro, regular e uniforme (FIGURA 8).

FIGURA 8- Notam-se fibras mielínicas de grande e pequeno diâmetro sem alterações morfológicas (100obj. x 1,6 opt. x 0,5cam.).

3.3.2- Grupo 2 (Com lesão e sem estímulo)

Neste grupo, foram observadas fibras em franca degeneração *walleriana* (seta- 1) e fibras mielínicas com bainhas de mielina proporcionalmente muito finas (seta- 2) em relação ao diâmetro axonal, o que sugere remielinização (FIGURA 9). Foi observado, ainda, um grande número de fibras sem bainha de mielina. O número e o diâmetro dos vasos intraneurais foi nitidamente menor que os observados nos grupos submetidos à estimulação elétrica.

FIGURA 9- Nota-se um grande número de fibras mielínicas e amielínicas de pequeno diâmetro (100obj. x 1,6opt. x 0,5cam.).

Seta 1 – Degeneração *walleriana*

Seta 2 – Bainha de mielina com espessura fina

3.3.3- Grupo 3 (Sem lesão e com estímulo)

Neste grupo, também considerado de controle, foram observadas fibras mielínicas de grande e pequeno diâmetro, com aspecto morfológico normal típico (FIGURA10). Os vasos intraneurais estavam aumentados em número e diâmetro.

FIGURA 10- Notam-se fibras mielínicas de grande e pequeno diâmetro sem alterações morfológicas e a presença de um vaso intraneural (seta) (100obj. x 1,6opt. x 0,5cam.).

3.3.4- Grupo 4 (Com lesão e com estímulo)

Em todos os animais deste grupo, foi observada grande quantidade de fibras mielínicas com as respectivas bainhas proporcionalmente mais finas em relação ao diâmetro axonal, do que nos grupos de controle. Foram observados, ainda, um grande número de fibras amielínicas e fibras em franca degeneração *walleriana*, bem como em processo de atrofia axonal. (FIGURA 11-A)

Observamos também alteração no formato das células de Schwann, estas células são responsáveis pela formação da bainha de mielina, quando maduras são achatadas e alongadas, com núcleo oval central e citoplasma denso em relação ao axônio adjacente. Quando o nervo é lesado, as células de Schwann são ativadas: formam cordões que dão suporte aos axônios em regeneração, sofrem rápida divisão celular e apresentam características das células de Schwann imaturas com citoplasma claro e núcleo arredondado. Devido ao processo de divisão celular, o número de núcleos de células de Schwann observado em cortes transversais de nervos é maior que o observado nos nervos normais.

Estas características de ativação das células de Schwann foram observadas nos animais deste grupo.

Quanto ao diâmetro das fibras nervosas, de modo geral, este era reduzido em relação as fibras dos grupos de controle, mas o número de fibras neste grupo foi o mais elevado em relação a todos os demais.

Chamou a atenção neste grupo, a presença de vasos intrafasciculares e interfasciculares, em número e com diâmetro maior do que o observado nos demais grupos (FIGURA 11-C).

FIGURA 11-A- Notam-se fibras mielínicas e amielínicas de pequeno diâmetro (100obj. x 1,6 opt. x 0,5 cam.).

Seta 1 - Fibras em processo de degeneração *walleriana*

Seta 2 - Atrofia axonal (Célula de Schwann com núcleo arredondado)

Seta 3 - Bainha de mielina com espessura fina

FIGURA 11-B – Exemplo de fascículo do grupo 2 mostrando número reduzido de capilares quando comparado aos fascículos do grupo 4 (10obj. x 1,25opt. x 0,5cam.)

FIGURA 11-C – Nota-se a presença de vasos endoneurais e interfasciculares em maior número e diâmetro que o observado nos demais grupos (10obj. x 1,25opt. x 0,5cam.)

FIGURA 11-D – Detalhe em maior aumento do vaso capilar endoneural do fascículo representado na figura 11-C (40obj. x 1,6opt. x 0,5cam.)

FIGURA 11-E – Detalhe em maior aumento do vaso capilar interfascicular do nervo representado na figura 11-C (20obj. x 1,25opt. x 0,5cam.)

3.4- Análise Morfométrica das Fibras Mielínicas

A análise morfométrica das fibras nervosas regeneradas foi efetuada em cerca de 60% dos espécimes de cada grupo, devido a perda de parte do material, e a média dos valores encontrados em cada grupo foi utilizada na análise estatística. São apresentados em seguida os valores referentes a cada grupo.

3.4.1- Grupo 1 (Sem lesão e sem estímulo)

A densidade das fibras mielínicas variou de 13.117 a 22.192 fb/mm² (média: 16.148 fb/mm²) e o diâmetro variou de 1,40 a 12,43 µm. Foi observada uma distribuição normal da densidade das fibras, mas com densidade maior de fibras mielínicas com os diâmetros entre 3,0 e 3,5 µm. A razão G apresentou, também, distribuição normal, com pico entre 0,55 e 0,60 (FIGURA 12/ TABELA 2).

3.4.2- Grupo 2 (Com lesão e sem estímulo)

A densidade das fibras mielínicas variou de 11.647 a 18.253 fb/mm² (média: 15.669 fb/mm²) e o diâmetro variou de 1,40 a 7,54 µm, com predomínio de fibras entre 3,0 e 3,5µm e visível desvio à esquerda, conforme se observa no histograma, caracterizando uma tendência a um padrão unimodal de regeneração. Já a razão G mostrou desvio à direita, com pico entre 0,65 e 0,75 (FIGURA 13/ TABELA 2).

3.4.3- Grupo 3 (Sem lesão e com estímulo)

A densidade das fibras mielínicas variou de 13.202 a 19.101 fb/mm² (média: 16.782 fb/mm²) e o diâmetro variou de 1,47 a 11,66 µm. A distribuição da densidade das fibras apresentou-se bimodal, com densidade maior de fibras mielínicas com diâmetros entre 6,50 e 7,50µm. A razão G apresentou distribuição normal, com pico entre 0,55 e 0,60 (FIGURA 14/ TABELA 2).

3.4.4- Grupo 4 (Com lesão e com estímulo)

Neste grupo, a densidade variou de 14.923 a 24.525 fb/mm² (média: 20.294 fb/mm²), com diâmetro variando entre 1,45 e 6,81 µm. Notou-se, também, desvio à esquerda, mas a densidade das fibras foi maior que nos grupos anteriores, com picos entre 3,0 e 3,5µm, o que sugere aumento na remielinização. A razão G mostrou-se desviada à direita, com pico entre 0,70 e 0,75 (FIGURA 15/ TABELA 2).

Na análise estatística, foi feita a comparação simultânea entre os quatro grupos experimentais, através do teste não-paramétrico de KRUSKAL-WALLYS, que demonstrou diferenças estatisticamente significativas entre as densidades das fibras nervosas, para os diferentes intervalos de diâmetro das fibras. No grupo 4, houve maior concentração de fibras de menor diâmetro, particularmente nos intervalos 3,0 - 3,5 µm ($p<0,001$) e 4,0 - 4,5 µm ($p=0,001$), em comparação com os outros grupos, diferenças que foram estatisticamente significativas. Fibras de maior

diâmetro foram mais numerosas também nos grupos 1 e 3, diferindo significativamente dos grupos 2 e 4. No grupo 3, houve maior concentração de fibras entre 6 e 10,5 μm de diâmetro ($p < 0,001$), diferindo significativamente de todos os outros grupos.

Quanto à razão G, houve comportamento similar nos grupos 1 e 3, sendo que não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos até o intervalo 0,45 - 0,50. No intervalo 0,50 - 0,65, os grupos sem lesão (2 e 3) apresentaram valores mais elevados que os grupos lesados (2 e 4); e no intervalo 0,70 - 0,90 estes valores se inverteram, passando os grupos lesados (2 e 4) a apresentarem valores mais elevados que os grupos sem lesão (1 e 3). Nas duas comparações realizadas foram observadas diferenças significativas ($p < 0,001$).

Nos grupos 2 e 4 foi observado um grande número de fibras com razão G acima de 0,75, indicativo de um processo de desmielinização. No grupo 4 observou-se ainda, grande número de fibras com razão G abaixo de 0,4, indicativo de um processo de atrofia axonal, que não foi evidenciado no grupo 2.

Quanto aos vasos sangüíneos, foram mais numerosos nos grupos com estimulação elétrica (268,4 vasos/ mm^2 e 245,83 vasos/ mm^2 , respectivamente nos grupos 3 e 4), do que nos grupos sem estimulação (157,14 vasos/ mm^2 e 159,0 vasos/ mm^2 , respectivamente nos grupos 1 e 2), mas as diferenças não foram estatisticamente significativas ($p = 0,16$).

TABELA 2 – Variação dos principais dados morfométricos obtidos para cada um dos grupos

	GRUPO 1	GRUPO 2	GRUPO 3	GRUPO 4
Dens	13.117 - 22.192	11.647 - 18.253	13.202 - 19.101	14.923 - 24.525
D.ax.	1,40 - 12,43	1,40 - 7,54	1,47 - 11,66	1,45 - 6,81
Pico	3,0 – 3,5	3,0 – 3,5	6,5 – 7,5	3,0 – 3,5
G Pico	0,55 – 0,60	0,65 – 0,75	0,55 – 0,60	0,70 – 0,75

Dens : Densidade das fibras mielínicas (fb/mm²)

D.ax. : Diâmetro mínimo dos axônios mielínicos (µm)

Pico : Intervalo de classe de maior densidade das fibras mielínicas (µm)

G Pico: Intervalo de classe de maior porcentagem de fibras mielínicas

FIGURA 12- Histograma da distribuição e da Razão G das fibras miélinicas de acordo com o diâmetro do nervo ciático nos ratos do Grupo 1

FIGURA 13- Histograma da distribuição e da Razão G das fibras mielínicas de acordo com o diâmetro do nervo ciático nos ratos do Grupo 2

FIGURA 14- Histograma da distribuição e da Razão G das fibras mielínicas de acordo com o diâmetro do nervo ciático nos ratos do Grupo 3

FIGURA 15- Histograma da distribuição e da Razão G das fibras miélinicas de acordo com o diâmetro do nervo ciático nos ratos do Grupo 4

4 – DISCUSSÃO

A grande capacidade de regeneração espontânea dos nervos periféricos do rato tornam sua escolha como animal de experimentação controversa, para investigações sobre a estimulação ou indução da regeneração nervosa. Entretanto, esse animal ainda é dos mais freqüentemente utilizados, pelas vantagens que oferece, visto ser de relativamente fácil manuseio e baixo custo, além de apresentar as estruturas nervosas periféricas semelhantes às dos humanos, o que favorece estudos de natureza morfológica. Esse foi, então, o motivo da escolha do rato para a presente investigação, além do que o experimento foi planejado para análise dos resultados no curto prazo, quando as diferenças entre os possíveis efeitos da estimulação elétrica pudessem ser mais facilmente detectadas ou fossem mais exuberantes.

Quanto ao nervo ciático, provavelmente o mais empregado em investigações experimentais, é de fácil acesso cirúrgico, através de planos bem definidos, que permitem uma exposição de quase a totalidade do seu comprimento, desde a emergência por baixo do músculo piriforme até sua bifurcação próximo ao joelho, o que dá um comprimento de cerca de 2,5 a 3 cm. Ainda mais, sua estrutura é muito semelhante à dos nervos de humanos, com vários fascículos e densa irrigação sangüínea.

A velocidade de regeneração pode ser avaliada em praticamente qualquer tipo de lesão do nervo periférico, mas para os propósitos deste trabalho pareceu que a

lesão por esmagamento era a mais adequada, pois uma lesão por secção seguida de sutura introduziria uma variável de difícil controle, que é a sutura microcirúrgica, que requer treinamento especial. Já com a lesão por esmagamento, foi possível padronizar a intensidade de lesão produzida, o que permitiu antever um comportamento semelhante em todos os animais, evitando as variáveis decorrentes da técnica utilizada na sutura. A lesão em si foi realizada numa máquina universal de ensaios, dotada de uma célula de carga de alta precisão para cargas até 200 kg e de um dispositivo que permitia a compressão num segmento restrito de 5 mm do nervo ciático, pelo período que se julgou necessário, de 10 minutos. Esses parâmetros guardam relação com o que ocorre na prática clínica, como p. e. nos acidentes automobilísticos (CHEN; SEABER; GLISSON et al., 1992). A intensidade da carga aplicada, de 15.000 g, produz uma lesão intensa no nervo, sem destruir sua estrutura de sustentação, conforme demonstrado por OLIVEIRA (1995).

Conforme os dados apresentados na TABELA 1, pudemos evidenciar que os desvios padrões do IFC para os animais dos grupos com esmagamento apresentaram-se menores que os apresentados pelos animais sem esmagamento. Esses dados sugerem que o nosso método apresenta-se bastante adequado em produzir a lesão, sendo portanto de alta confiabilidade para o estudo proposto.

Outro aspecto importante, passível de escolha, foi o dos métodos de avaliação dos resultados. Os principais métodos de avaliação da regeneração dos nervos periféricos, em investigações experimentais, são os estudos morfológicos e morfométricos e a eletroneuromiografia, empregados isoladamente ou associados e já consagrados na literatura. Mais recentemente, surgiram os estudos funcionais, como o Índice Funcional do Ciático, proposto por DE MEDINACELI; FREED;

WYATT (1982), DE MEDINACELI; DERENZO; WYATT (1984) e aperfeiçoado por BAIN; MACKINNON; HUNTER (1989), que têm a vantagem de não serem invasivos e não requererem o sacrifício do animal, ao mesmo tempo que quantificam o grau de regeneração útil do nervo lesado. O método aqui empregado, de BAIN; MACKINNON; HUNTER (1989), ao mesmo tempo em que fornece um valor numérico à função, passível de análise estatística, traduz com precisão o que ocorre com o nervo lesado, em termos de regeneração morfológica, sendo-lhe diretamente proporcional, como demonstrou OLIVEIRA (1995). Disso resulta que esse índice é muito confiável. Neste trabalho, foi utilizado um programa de computador (*software*) desenvolvido especialmente para essa finalidade por SELLI (1998), que torna o método muito mais fácil de aplicar do que aquele original, descrito por DE MEDINACELI e colaboradores. As impressões das pegadas dos animais eram digitalizadas e armazenadas no programa; os parâmetros a serem avaliados eram medidos, simplesmente clicando o cursor do *mouse* em cada um dos pontos pré-estabelecidos, na sequência também pré-estabelecida. O programa, então, automaticamente efetuava os cálculos, fornecendo e armazenando o resultado do índice escolhido.

A fórmula utilizada para o cálculo do IFC foi aquela descrita por BAIN; MACKINNON; HUNTER (1989), que desconsidera a medida da distância entre as pegadas (TOF), utilizada nos trabalhos anteriores de DE MEDINACELI e colaboradores, por considerarem-na um fator impreciso e gerador de erros. De fato, alguns testes realizados neste trabalho, com a introdução daquele parâmetro, mostraram grandes variações nos valores do IFC, que não condiziam com o grau de recuperação clínica avaliada por outros parâmetros.

Embora haja discordâncias, a densidade de fibras nervosas é um parâmetro considerado adequado para o estudo da regeneração de um nervo lesado. Contudo, ela depende da área de secção transversa do nervo em estudo, que pode ser modificada por fatores indesejáveis. Assim, do mesmo modo que o edema aumenta o diâmetro do nervo e, conseqüentemente, sua área de secção transversa, a preparação dos segmentos de nervo para a análise histológica e morfométrica pode introduzir alterações, como a retração, que diminui seu diâmetro e sua área de secção transversa, podendo ambos os fenômenos falsear os resultados (BEHSE, 1990). Por esse motivo, devem ser evitadas comparações entre os resultados obtidos em diferentes trabalhos. Já num trabalho específico, as comparações são apropriadas, porque é empregada a mesma metodologia para todos os grupos, de modo que as alterações exógenas introduzidas são, muito provavelmente, as mesmas.

Os resultados da morfometria mostraram indícios de regeneração das fibras nervosas já com 21 dias da lesão, fenômeno semelhante ao descrito por MIRA (1979), que observou aumento das fibras mielinizadas em torno da segunda semana. Esta regeneração foi observada em ambos os grupos de nervos lesados (2 e 4), com predomínio de fibras nervosas de pequeno diâmetro, com maior densidade de fibras no grupo estimulado (4), em comparação com o grupo não estimulado (2). Outra observação importante, foi o aumento da densidade de fibras de maior diâmetro no grupo não lesado e estimulado (3), em comparação com o grupo não lesado e não estimulado (1), o que sugere que a corrente direta de baixa intensidade altera a morfologia do nervo normal, com possíveis reflexos na sua função.

BORGES; ROBINSON; VANABLE et al. (1989) sugerem que, no momento da lesão do nervo, a membrana celular entra em colapso e ocorrem trocas

iônicas entre o axoplasma e o meio extracelular, com aumento do influxo de íons extracelulares (Na^+ e Ca^+) e perda de íons intracelulares (K^+), ocasionando profundas alterações na composição iônica do axoplasma no local da lesão, que se torna mais positivo. Os constituintes celulares migram em sentido bidirecional, na direção da lesão, ou seja, no segmento proximal do axônio, as mitocôndrias se movem em direção distal, e no segmento distal, em direção proximal. Em ambos os casos, o movimento mitocondrial é da região menos positiva para a mais positiva. A aplicação de corrente elétrica exógena, com o cátodo posicionado distalmente à lesão, aceleraria o processo de reparo, primeiro impedindo o influxo do Ca^+ e limitando o grau de degeneração, e depois, gerando uma contra-corrente dentro do axônio terminal, uma vez que este segmento é altamente permeável ao fluxo de corrente elétrica, devido à menor resistência tecidual. Logo, a corrente exógena se direcionaria no sentido proximal-distal (dentro do axoplasma), opondo-se à corrente endógena, que flui na direção distal-proximal dentro do axônio, preservando desta forma o transporte axoplasmático.

Neste estudo observou-se claramente este retardo no processo de degeneração quando comparamos o grupo que recebeu estímulo(4) com o grupo que não recebeu estímulo (2), onde através da morfometria observamos um grande número de fibras em processo de atrofia axonal no grupo 4 em comparação ao grupo 2.

No entanto, não se sabe ao certo como correntes com intensidades tão baixas conseguem afetar tão amplamente o influxo iônico. Por exemplo, estudo experimental em lampreia mostrou que a densidade da corrente elétrica endógena do axônio, duas horas após a lesão, atinge um pico de $1\text{mA}/\text{cm}^2$, muito superior à

corrente elétrica exógena média aplicada de 10 μ A, que produziu efeito regenerativo na medula espinhal desses animais (BORGENS; ROEDEREP; COHEN (1981).

Trabalhos utilizando estímulo elétrico para acelerar o processo regenerativo de nervos periféricos são unânimes quanto aos resultados benéficos, desde que o cátodo seja aplicado distalmente. Ocorrem, então, aumento da densidade de fibras, do diâmetro das fibras e da espessura da bainha de mielina, aumento do número e do diâmetro dos vasos intraneurais e melhora funcional (IFC) nos grupos estimulados, em comparação aos não estimulados. Entretanto, é importante enfatizar que esses estudos foram realizados em nervos seccionados e suturados. Segundo Mc DEVITT; FORTNER; POMERANZ (1987) e BORGENS; ROBINSON; VANABLE et al. (1989), nas lesões por esmagamento a corrente elétrica não exerceria influência sobre o processo de regeneração dos nervos, mas há necessidade de que novos trabalhos sejam realizados acerca desse tópico, para se extraírem conclusões mais concretas. Em relação à própria estimulação elétrica, os autores concluem que há apenas indícios de que acelere a regeneração dos nervos periféricos em mamíferos, pois os resultados não são conclusivos.

No presente trabalho, observou-se a melhora funcional, através do IFC, e aumento do número de fibras de pequeno diâmetro mais expressivos no grupo estimulado (4) em comparação ao não estimulado (2), mas com valores proporcionalmente menores que aqueles relatados na literatura para ambos os casos. Todavia, há que se levar em consideração que este foi um experimento de curto prazo, assim idealizado porque se imaginou que a fase precoce seria a mais propícia para observar as diferenças entre os grupos. Possível os números seriam mais elevados num experimento de mais longa duração.

No entanto, os resultados mostraram que, já no curto prazo, a estimulação elétrica constante de baixa intensidade efetivamente provocou alterações morfológicas significativas no nervo ciático de ratos, aumentando o número e o diâmetro das fibras regeneradas após a lesão, bem como sua irrigação intraneural, o que se refletiu na melhora funcional mais rápida. Alterações morfológicas semelhantes foram também observadas nos nervos não lesados e estimulados, o que permite concluir que mesmo o nervo intacto é passível de sofrer as influências da estimulação elétrica.

5- CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho permitem concluir que a aplicação de corrente elétrica constante de baixa intensidade acelera a regeneração e retarda a degeneração das fibras mielínicas do nervo ciático de ratos submetidos a esmagamento com carga de 15.000g por 10 minutos, conforme avaliação morfométrica e funcional em condições experimentais controladas. Nas mesmas condições, a corrente elétrica induz alterações morfológicas nos nervos não lesados, com possíveis efeitos sobre a função.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSIMACOPOULUS, D. (1968). Wound healing promotion by the use of negative electric current. *Am. Surg.* 34: 423-431

BAIN, J.R.; MACKINNON, S.E.; HUNTER, R.T.(1989). Functional evaluation of complete sciatic, peroneal, e posterior tibial nerve lesions in the rat. *Plastic and Reconst Surgery*, 83: 129-138

BASSET, C.; LAND, A.; HERRMANN, I. (1968). The effects of electrostatic fields on macromolecular synthesis by fibroblasts in vitro. *J. of Cell Biology* 39: 9A

BASSET, C.A.L.; MITCHELL, S.N.; GASTON, S.R. (1981). Treatment of ununited tibial diaphyseal fractures with pulsing electromagnetic fields. *J. Bone of Surg.* 63 A:511

BEHSE, F. (1990). Morphometric studies on the human sural nerve. *Acta Neurol Scandinavica, Supplementum*, n.132, vol.82

BEVERIDGE, J.A.; POLITIS, M.J. (1988). Use of exogenous electrical current in the treatment of delayed lesions in peripheral nerves. *Plastic and Rec Surg*, Vol.

82, n. 4: 573-577, Oct

BORGENS, R.B.; VANABLE, J.W.; JAFFE, L.F. (1977). Bioelectricity and Regeneration. *J. Exp. Zoo*, 200: 403-416

BORGENS, R.B.; VANABLE, J.W.; JAFFE, L.F. (1979). Small artificial currents enhance xenopus limb regeneration. *Journal Exp. Zoo*, 207: 217-226

BORGENS, R.B.; ROEDERER, E.; COHEN, M.J. (1981). Enhanced spinal cord regeneration in lamprey by applied electric fields. *Science*, Vol.213: 611-617

BORGENS, R.B. (1982). What is the role of naturally produced electric current in vertebrate regeneration and healing? *Int. Rev. of Cytology* 76: 245-298

BORGENS, R.B. et al (1986). Transected dorsal column axons within the guinea pig spinal cord regenerate in the presence of an applied electric field. *The journal of Comparative Neurology*, 250: 168-180

BORGENS, R.B. et al. (1989). Electric field in vertebrate repair. *New York. Alan R. Liss, Inc. Cap 3 e 4*, p.77-170

BORGENS, R.B.; BLIGHT, A.R.; MC GINNIS, M.E. (1990). Functional recovery after spinal cord hemisection in guinea pigs: the effects of applied electric fields. *The journal of comparative Neurology*, 296: 634-653

- BORGES, R.B. (1999). Electrically mediated regeneration and guidance of adult Mammalian spinal axons into polymeric channels. *Neurosci*, Vol.91, 1: 251-264
- BRIDGE, P.M. et al (1994). Nerve crush injuries – A model for axonotmesis. *Exp. Neurol.*, 127: 284-290
- BRIGHTON, C.T. et al (1977). Treatment of nonunion with constant direct current. *Clin Orthop and Rel Research*, 124: 106-123, May
- BRIGHTON, C.T.(1981). Current concepts review the treatment of non-unions with electricity. *The Journal of Bone Surgery*, 63-A: 847-851, Jun
- BRIGHTON, C.T.; POLLACK, S.R. (1985). Treatment of nonunion with a capacitively coupled electrical field. *Journal of Bone and Joint Surgery*, 67-A: 577-585
- BRIGHTON, C.T. et al. (1995). Tibial nonunion treated with direct current, capacitive coupling or bone graft. *Clin Orthop and Rel Research*, 321: 223-234
- CARLTON, J.M.; GOLDBER, N.H.(1986). Quantitating integrated muscle function following reinnervation. *Surgical Forum*, 37: 611-612
- CHEN, L.E. et al. (1992). The Functional recovery of peripheral nerves following defined acute crush injuries. *J. Orthop Reserch*, 10: 657-664

- CHENG,N et al. (1982). The effects of electric currents on ATP generation, protein synthesis and membrane transport in rat skin. *Clin Orthop and Rel Research*, 171: 264-272
- CUNDY, P.J.; PATERSON, D.C. (1990). A ten year review of treatment of delayed union and nonunion with and implanted bone growth stimulator. *Clin Orthop and Rel Research*, 259: 216-222
- DAHLIN, L.B. ; RYDEVIK, B.(1991). Pathophysiology of nerve compression. In: GELBERMAN, R.H. *Operative nerve repair and reconstruction*. Philadelphia. J.B. Lippincott Company. Vol 2, p.847-62
- DE MEDINACELI, L.; FREED, W. J.; WYATT, R. J. (1982). An index of the functional condition of rat sciatic nerve based on measurement made from walking tracks. *Exp. Neurol*, 77: 634-643
- DE MEDINACELI, L.; DERENZO, E.; WYATT, R.J.(1984). Rat sciatic functional index data management system with digitized input. *Comp Biom Res*,17:185-192
- DEVOR, M. et al (1979). Two modes of cutaneous reinnervation following peripheral nerve injury. *J. Comp. Neurology*, 185: 211-220
- FRIEDENBERG, Z.B. et al (1971). Stimulation of fractures healing by direct current in the rabbit fibula. *Journal of Bone and Joint Surgery*, 53-A: 1400-1408

FUENTES, A.E.R.; SOUZA, J.P.M.; PAULIN, J.B.P. (1982-A). Uso da Estimulação Elétrica em pseudoartrose congênita de tíbia. *Rev. Bras. de Ortop.*, Vol.17: 39-46

FUENTES, A.E.R. et al (1982-B). Experimental model of electric stimulation of Pseudarthrosis healing. *Clin. Orthop. And Rel. Research.* 183: 267-275

FUKADA, E.; YASUDA, I. (1957). On the piezoelectric effect of bone. *Journal Phys. Soc. Jpn.* 12: 1158

GAULT, W.R.; GATENS, P.F. (1976). Use of low intensity direct current in management of ischaemic skin ulcers. *Phys. Ther.* 56: 265-269

GORDON, T.; STEIN, R.B. (1982). Time course and extent of recovery in reinnervated motor units of cat triceps surae muscles. *J. Physiol.*, 323: 307-323

GRAGG, B.G.; THOMAS, P.K. (1964). The conduction velocity of regenerated peripheral nerve fibres. *J. Physiol.* 171: 164-175

GUTMANN, E.; GUTMANN, L. (1942). Factors affecting recovery of sensory function after nerve lesions. *Journal Neurol Psychiat*, 5: 117-129

HINKLE, L.; Mc GAIG, C.D.; ROBINSON, K.R. (1981). The direction of growth of differentiating neurones and myoblasts from frog embryos in an applied electric field. *J. Physiol.*, 314:121-135

- JAFFE, L.F.; POO, M. (1979). Neurites grow faster towards the cathode than the anode in a steady field. *Journal Exp. Zoo*, 209: 115-128
- KERNS, J.M. et al.(1986). Effects of D.C. electrical stimulation on nerve regeneration in the rat sciatic nerve. *Anat.Rec.*, 214: 64A
- KERNS, J.M. et al (1987). An experimental implant for applying a DC electrical field do peripheral nerve. *J of Neuroscience Methods*, 19: 217-223
- KERNS, J.M. et al. (1991). Electrical stimulation of nerve regeneration in the rat: the early effects evaluated by a vibrating probe and electron microscopy. *Neuroscience*, Vol. 40, n. 1: 93-107
- LOWDON, I.M.R.; SEABER, A.V.; URBANIAK, J.R. (1988). An improved method of recording rat tracks for measurement of the sciatic functional index of De Medinaceli. *J Neuroscience Meth*, 24: 279-281
- McDEVITT, L.; FORTNER, P.; POMERANZ, B. (1987). Application of weak electric field to the hindpaw enhances sciatic motor nerve regeneration in the adult rat. *Brain Research*, 416: 308-314
- MIRA, J.C. (1979). Quantitative studies of the regeneration of rat myelinated nerve fibres: variations in the number and size of regenerating fibres after repeated localized freezing. *J. Anat.* 129: 77:93

- OLIVEIRA, E.F. (1995). *Estudo experimental da recuperação das lesões do nervo ciático por esmagamento – Análise funcional da marcha e correlação morfométrica*. Ribeirão Preto. 54p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo.
- O'REILLY, R.J. et al. (1981). Can serial scintigraphic studies detect delayed fracture union in man? *Clin. Orthop.* 160:227
- PARIZOTTO, N.A. (1988). *Estudo da influência da estimulação elétrica, do carbacol e da ligadura do nervo ciático do rato sobre a recuperação funcional após axotomia*. Ribeirão Preto. 87p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo.
- POLITIS, M.J.; ZANAKIS, M.F.; ALBALA, B.J. (1988). Mammalian optic nerve regeneration following the application of electric fields. *The Journal of Trauma*, Vol.28, 11: 1548-1552
- POLITIS, M.J.; ZANAKIS, M.F.; ALBALA, B.J. (1988). Facilitated regeneration in the rat peripheral nervous system using applied electric field. *The Journal of Trauma*, Vol. 28, n.9: 1375-1381
- POMERANZ, B.; MULLEN, M.; MARKUS, H. (1984). Effect of applied electrical fields on sprouting of intact saphenous nerve in adult rat. *Brain Research*, 303: 331-336

POMERANZ, B.; CAMPBELL, J. (1993). Weak electric current accelerates motoneuron regeneration in the sciatic nerve of ten-month-old rats. *Research*, 603: 271-278

ROMAN, G.C. et al (1987). Stimulation of sciatic nerve regeneration in the adult rat by low-intensity electric current. *Exp. Neurology*, 98: 222-232

SEDDON, H. (1975). Surgical disorders of the peripheral nerves. 2nd Ed. Churchill Livingstone, Edinburgh (clássico)

SELLI, M. F. (1998). *Desenvolvimento de um método computadorizado para avaliação funcional das lesões de nervos periféricos através da análise da marcha: modelo experimental em ratos*. São Carlos. 70p. Dissertação (Mestrado) – Curso de Pós-Graduação Interunidade Bioengenharia-EESC/FMRP/IQSC - USP

SHEN, N.; ZHU, J (1995). Experimental study using a direct current electrical field to promote peripheral nerve regeneration.. *J. of Reconstructive Microsurgery*, Vol.11, 3: 189-193

STEIN, R.B. et al (1977). Stable long-term recordings from cat peripheral nerves. *Brain Research*, 128: 21-38

SUNDERLAND, S. (1985). Nerve and nerve injuries. 2nd Ed. Churchill Livingstone, London (clássico).

WATSON, T. (1998). Estimulação elétrica para a cicatrização de feridas. In:
KITCHEN, S. ; BAZIN, S. *Eletroterapia de Clayton*. São Paulo. Ed. Manole.
Cap.21, p.312-336

WEISS, D.S.; KIRSNER, R.; EAGLSTEIN, W.H. (1990). Electrical stimulation and
Wound healing. *Arch of Dermatology* , 126: p 222-225

WILFREDA, N.; HOPF, H.C. (1983). Electrical stimulation of regenerating nerve
and its effects on motor recovery. *Brain Research*, 272: 21-25

WOLCOTT, L.E. et al. (1969). Accelerated healing of skin ulcers by electrotherapy.
S. Med. Journal 62: 795-801