UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INTERUNIDADES BIOENGENHARIA

FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS

INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

**OS EFEITOS DO ULTRA-SOM TERAPEUTICO NO
TRATAMENTO DAS LESÕES POR ESMAGAMENTO
DO NERVO CIÁTICO DE RATOS**

VANESSA VILELA MONTE RASO

RIBEIRÃO PRETO

2002

**OS EFEITOS DO ULTRA-SOM TERAPEUTICO NO
TRATAMENTO DAS LESÕES POR ESMAGAMENTO
DO NERVO CIÁTICO DE RATOS**

VANESSA VILELA MONTE RASO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades (Escola de Engenharia de São Carlos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e Instituto de Química de São Carlos) da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Bioengenharia.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Cláudio Henrique Barbieri

Ribeirão Preto
2002

FICHA CATALOGRÁFICA

MONTE RASO, VANESSA VILELA

Os Efeitos do Ultra-Som Terapêutico nas Lesões por Esmagamento do Nervo Ciático em Ratos / Vanessa vilela Monte raso. -- São Carlos, 2002.

Dissertação (Mestrado) -- Interunidades Bioengenharia - Escola de Engenharia de São Carlos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e Instituto de Química de São Carlos - Universidade de São Paulo, 2002.

Área: Bioengenharia.

Orientador: Prof. Dr. CLÁUDIO H. BARBIERI.

1.Ultra-Som. 2.Lesão por Esmagamento. 3.Nervo Ciático. 4.Ratos. I.Título

**Em primeiro lugar preciso agradecer a DEUS, pois dELE é a responsabilidade
de tudo que tem acontecido em minha vida.**

Aos meus pais e irmãos também tenho que dividir este mérito, pelo amor
e ensinamentos de vida , que jamais aprenderei em escola alguma.

Ao Milton e Dani pelo incentivo e alegria sempre ao meu lado.

Agradecimento Especial

Ao Prof. Dr. Cláudio Henrique Barbieri, pela orientação segura, correção criteriosa, pelo seu caráter e valor como professor. Agradeço por todas as oportunidades e pelos ensinamentos.

O mestre que caminha à sombra do templo, rodeado de discípulos, não dá de sua sabedoria, mas sim de sua fé e de sua ternura.

Se ele for verdadeiramente sábio, não vos convidará a entrar na mansão de seu saber, mas vos conduzirá antes ao limiar de vossa própria mente.

Gibran Khalil Gibran

Agradecimentos Especiais

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

Ao Prof. Nilton Mazzer, do Departamento de Biomecânica, Medicina e Reabilitação do Aparelho Locomotor, e a Fisioterapeuta Marisa C. R. Fonseca, minha homenagem especial, pela amizade, pelos ensinamentos de como ser um bom profissional, sem deixar a vaidade tomar conta do pessoal.

Aos técnicos do Laboratório de Bioengenharia Chico e Luis Henrique, pessoas que tornaram muito importantes, bons amigos, sempre muito gentis e solícitos a qualquer hora.

Aos amigos do Laboratório de Bioengenharia, Prof. José Batista Portugal Paulin, Dr. Carlos Alberto Moro, Dr. Antônio Carlos Shimano e Maria Terezinha de Moraes, pelo carinho e amizade.

À Profa. Valéria Paula Sassoli Fazan, pela disponibilidade, paciência e ajuda na avaliação das lâminas.

Ao Prof. Amilton Antunes Barreira, pela acolhida no Laboratório de Neurologia Aplicada e Experimental.

Aos técnicos e funcionários do Laboratório de Neurologia, Cristina e Vanessa, pela colaboração e paciência, à secretária Silvana, ao estatístico Cássio pela valiosa colaboração na análise dos dados.

Ao técnico Renato do Laboratório de Neurologia, pela amizade e ajuda inestimável no desenvolvimento deste trabalho e na contagem das fibras nervosas.

Ao Eng. Marcelo Selli, pela ajuda ao ceder e ensinar-me o manuseio de seu programa para avaliação do Índice Funcional do Ciático.

As secretárias do Departamento de Biomecânica, Medicina e Reabilitação do Aparelho Locomotor da FMRP-USP, Sras. Fátima, Elisangela e Rose, pela paciência e colaboração em todos os momentos.

As secretárias do Programa de Pós-graduação Interunidades Bioengenharia, no Laboratório de Bioengenharia da Escola de Engenharia de São Carlos, Sra. Janete e Marielza, pela colaboração.

Ao Prof. Picado e ao Dr. Chade, pelas valiosas sugestões na Banca de minha qualificação.

Aos amigos pós-graduandos Vitor, Paulo de Tarso, Eloísa, Rita, Djalma, Cristina, Betinha, Carmem, que se tornaram grandes amigos e companheiros, vivendo, sentindo, aprendendo juntos e nos engrandecendo nessa jornada.

Não poderia deixar de agradecer especialmente ao amigo Marquinho, pelos seus ensinamentos de matemática, física e informática, e pela atenção, amizade e paciência.

A (BIOSET –Indústria de Tecnologia Eletrônica Ltda), especialmente ao Sr. Antônio José Bucalon e ao Sr Júlio César Bucalon, pela colaboração e orientações sobre o aparelho de Ultra-som.

E a todas as pessoas que estiveram direta ou indiretamente ligadas ao desenvolvimento deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	I
LISTA DE TABELAS	II
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	III
LISTA DE SÍMBOLOS.....	IV
RESUMO	V
ABSTRACT	VI
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Generalidades do nervo periférico	1
1.2 Lesão nervosa por esmagamento.....	3
1.3 Avaliação funcional da regeneração nervosa.....	4
1.4 O ultra-som terapêutico:	11
1.4.1 <i>O ultra-som no reparo do tecido nervoso</i>	<i>16</i>
1.5 Objetivo.....	20
2 MATERIAL E MÉTODOS	21
2.1 Animal e grupos experimentais	21
2.2 Anestesia e procedimento cirúrgico	21
2.3 Ultra-sonoterapia	26
2.4 Análise funcional da marcha	28
2.4.1 <i>Impressão das pegadas.....</i>	<i>28</i>
2.4.2 <i>Técnica de avaliação do IFC</i>	<i>31</i>
2.5 Análise histológica e morfométrica	33
2.6 Análise estatística	35
3 RESULTADOS	36
3.1 Generalidades.....	36

3.2	Análise Funcional da Marcha (IFC)	36
3.3	Análise Histológica.....	39
3.4	Análise Morfométrica das Fibras Nervosas	42
4	DISCUSSÃO	44
5	CONCLUSÕES	51
	ANEXOS	52
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Representação esquemática dos parâmetros medidos para calcular o Índice Funcional do Ciático (IFC). N: Normal; E: Experimental (operada); TS: Abertura total dos dedos (1° ao 5°); IT: Abertura dos dedos intermediários (2° ao 4°); PL: Comprimento da pegada.....	7
FIGURA 2 – Procedimento cirúrgico. Abordagem do nervo ciático e, delimitação por um ponto de sutura (monofilamento de polipropileno azul 6-0, Prolene, Ethicon®) do início da região a ser esmagada (A); Ponto de sutura (B).	24
FIGURA 3 – Esmagamento do nervo ciático. Posicionamento do nervo no acessório da máquina (A); Esmagamento do nervo (B); Posicionamento do animal na máquina (C).	25
FIGURA 4 - Tratamento com Ultra-som: Aparelho de Ultra-som terapêutico, com o cabeçote especial de 1,35 cm (A). Ilustração de um animal recebendo tratamento com Ultra-som na face lateral da coxa, sobre a região onde foi produzida a lesão nervosa (B).....	27
FIGURA 5 - Registro das pegadas na passarela. Vista geral da passarela (A). Pegadas registradas (B).....	30
FIGURA 6 - Visualização do programa utilizado, CELLI (1995).....	32
FIGURA 7 - Variação temporal do Índice Funcional do Ciático nos Grupos 1 e 2. .	38
FIGURA 8 - Aspecto morfológico normal típico (AI e AII). Degeneração <i>Walleriana</i> (seta); bainha de mielina com espessura fina (cabeça de seta) (BI). Sprouting (seta), bainha de mielina fina (cabeça de seta) e presença de vasos (canto superior esquerdo) (BII). Nota-se um grande número de fibras com bainha de mielina com espessura fina e algumas fibras de pequeno calibre (CI). Núcleos arredondados de célula de Schwann (*), sprouting (seta), muitas fibras de pequeno diâmetro (cabeça de seta) e presença de vasos (CII). (régua 10µm)....	41
FIGURA 9 - Gráfico dos valores médios da densidade de fibras mielínicas do nervo ciático dos Grupos 1 (controle) e 2 (tratado).	43

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Comportamento do Índice Funcional do Ciático (IFC) dos Grupos 1 (Controle) e 2 (ultra-sonoterapia), nos vários períodos de observação.	38
TABELA 2 – Densidade de fibras mielínicas das porções proximal, média e distal do nervo ciático dos grupos controle e tratado.	42

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

SNP	-Sistema nervoso periférico
IFC	-Índice funcional do ciático
SFI	-Sciatic functional index
TOF	-“To other foot”, ou distância ao pé oposto
PL	-“Print length”, ou comprimento da pegada
TS	-“Total spread”, ou distância linear transversal do 1º ao 5º dedo
IT	-“Intermediate toes”, ou distância linear transversal do 2º ao 4º dedo
N	-Normal
E	-Experimental
MHz	-Mega Hertz
VCN	-Velocidade de condução nervosa
W/cm ²	-Watts por centímetro quadrado
Et al	-Colaboradores
USP	-Universidade de São Paulo
mg	-miligramas
ml	-mililitros
g	-gramas
Kg	-quilograma
N	-Newton
Ltda	-limitada
M	-molar/moles

LISTA DE SÍMBOLOS

% -Porcentagem

°C -Graus Celsius

RESUMO

Foi realizado um estudo experimental da influência do ultra-som terapêutico na regeneração do nervo ciático submetido a esmagamento controlado, em ratos. Foram empregados no estudo 20 ratos da linhagem Wistar, de peso médio em torno de 250 g, divididos em dois grupos, conforme o tipo de procedimento realizado: 1) somente esmagamento, dez ratos; e 2) esmagamento e irradiação com ultra-som, 10 ratos. Sob anestesia, o nervo ciático era exposto na coxa direita do animal e esmagado com um dispositivo especialmente idealizado e confeccionado para essa finalidade, com uma carga fixa de 15 Kg, por 10 minutos, num segmento de 5 mm proximal à sua bifurcação. A irradiação com o ultra-som pulsado (1:5, frequência de 1 MHz, intensidade de 0.4 W/cm^2 , duração de 2 minutos) era iniciada já no primeiro dia pós-operatório e realizada por dez dias consecutivos. Os resultados foram avaliados pela análise funcional da impressão plantar dos animais obtidas numa pista de marcha e determinação do Índice Funcional do Ciático (De Medinaceli e Bain, Mackinnon e Hunter), e pela morfometria, através do cálculo da densidade de fibras nervosas, após sacrifício dos animais no 21º dia pós-operatório. Os resultados foram submetidos a análise estatística e mostraram que, nas condições do trabalho, o ultra-som acelerou a regeneração do nervo, demonstrável com significância no 21º dia pós-operatório.

Palavras chave: Regeneração de nervo periférico; nervo ciático de ratos; lesão por esmagamento; ultra-som terapêutico; índice funcional do ciático; densidade de fibras nervosas.

ABSTRACT

An experimental study of the influence of therapeutic ultrasound on the regeneration of the sciatic nerve submitted to controlled crush injury was carried out in rats. Twenty female Wistar rats weighing 250 g on average were used and distributed in two groups according to the procedure: 1) crush injury only, ten rats; 2) crush injury followed by ultrasound irradiation, ten rats. Under general anesthesia the sciatic nerve was exposed on the right thigh and crushed with a device especially devised and built for that purpose, with a 15 kg constant load for 10 minutes, affecting a 5 mm-long segment of the nerve proximal to its bifurcation. Pulsed ultrasound irradiation (1:5, 1 MHz frequency, 0.4 W/cm^2 intensity, 2 minutes duration) was started the day after the operation and repeated for ten consecutive days. The results were evaluated by functional footprint analysis and determination of the Sciatic Functional Index (DeMedinaceli's and Bain, Mackinnon and Hunter's methods) at weekly intervals, and by morphometry (nerve fiber density) of the resected sciatic nerve after killing the animals on the 21st postoperative day. Results were submitted to statistical evaluation and showed that, in the conditions of the study, ultrasound accelerated nerve regeneration, as demonstrated with significance on the 21st postoperative day.

Key words: Peripheral nerve regeneration; sciatic nerve of rats; crush injury; therapeutic ultrasound; sciatic functional index; nerve fiber density.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Generalidades do nervo periférico

Os nervos periféricos são alvos constantes de lesões de origem traumática que também afetam outros tecidos, como esmagamento, compressão, estiramento, avulsão e secção parcial e total, que resultam na parada da transmissão de impulsos nervosos e, por conseguinte, na perda ou diminuição da sensibilidade e motricidade no território inervado (OGARD & STOCKERT, 1994; AZZE & MATTAR Jr., 2000).

Inúmeras alterações nervosas e musculares ocorrem em consequência da lesão de um nervo periférico. Embora os nervos periféricos se regenerem, restaurando as funções nervosas perdidas, sabe-se que a recuperação funcional raramente é completa e perfeita, às vezes apesar da aplicação de técnicas sofisticadas de reconstrução (MENDONÇA, 2000).

Existem vários fatores que influenciam na regeneração da fibra nervosa lesada, como a natureza e o nível da lesão, período de denervação, tipo e diâmetro da fibra nervosa. Fibras de diâmetro e funções diferentes (motoras, sensitivas e simpáticas) se regeneram com velocidades diferentes, o mesmo ocorrendo com as fibras de diferentes troncos nervosos. Outros fatores, como a idade do paciente, a intercorrência de agentes químicos, temperatura e variações individuais também interferem na velocidade de regeneração de um nervo periférico (SUNDERLAND, 1985).

Quando um nervo periférico é intensamente lesado, a porção do nervo distal à lesão sofre mudanças degenerativas. Augusto Waller, já em 1850, demonstrou que um processo degenerativo progressivo se instala no coto distal do nervo lesado, incluindo a degradação da substância axonal e a atrofia dos envoltórios da fibra nervosa. No coto proximal também ocorre uma degeneração da substância axonal, que é fagocitada por macrófagos e pelas células de Schwann, e esse processo envolve uma extensão variável da fibra nervosa, sendo proporcional à gravidade da lesão e ao diâmetro da fibra. Esse processo é conhecido como degeneração walleriana, dele resultando o tubo neural vazio, preparado para receber o novo axoplasma produzido pelo corpo celular do neurônio, que já é o início do processo de regeneração (SPENCE, 1991).

A regeneração axonal ocorre, então, pelo transporte intra-axonal do material sintetizado no corpo celular, 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 a regeneração nervosa se efetive, 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, 1988¹ *apud* MENDONÇA, 2000).

¹ PARIZOTO, N.A. (1988). *Estudo da influência da estimulação elétrica, do carbacol e da ligadura do nervo ciático de rato sobre a recuperação funcional após axotomia*. Ribeirão Preto. 87p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo.

1.2 Lesão nervosa por esmagamento

A regeneração nervosa periférica observada em estudos experimentais apresenta aspectos controversos, particularmente porque nem sempre há uma correlação clara entre os resultados dos parâmetros histológicos, morfométricos e eletrofisiológicos. Os fenômenos envolvidos na regeneração podem ser estudados através de vários modelos experimentais, mas o modelo da lesão por esmagamento tem a vantagem de não envolver as variáveis introduzidas na lesão por secção seguida de sutura. MIRA (1979) realizou estudos quantitativos da variação do número e diâmetro das fibras nervosas durante o processo de regeneração, após lesão por esmagamento do nervo ciático, em ratos, analisando os resultados entre 10 a 720 dias após a lesão nervosa. Demonstrou que o número de fibras nervosas mielinizadas em regeneração retornou ao normal já na quarta semana, o que ocorreu somente no segundo mês no caso da secção seguida de sutura imediata.

O modelo de lesão por esmagamento tem sido adotado por vários autores, que enfatizam o fato de o esmagamento preservar pelo menos em parte a estrutura do nervo, facilitando a regeneração, e de não haver necessidade de realizar a sutura, que implica no treinamento prévio com as técnicas microcirúrgicas e na disponibilidade de instrumental e material adequados, em geral de alto custo (GRAGG & THOMAS, 1964; DE MEDINACELI; FREED; WYATT, 1982; BAIN; MACKINNON; HUNTER, 1989; BRIDGE; BALL; MACKINNON et al., 1994; MENDONÇA, 2000).

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 200 mmHg, 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 axonotmese, sem diferenças estatisticamente significativas entre os grupos, e que o método era confiável e reprodutível. Entretanto, a pressão aplicada não era medida.

No nosso meio, OLIVEIRA; MAZZER; BARBIERI et al. (2001) estudaram a regeneração do nervo ciático após lesões por esmagamento com cargas controladas de 100 g, 500 g e 15.000 g, numa máquina de ensaios. Avaliaram os resultados por meio da análise das impressões da marcha (Índice Funcional do Ciático) e da morfometria dos nervos e demonstraram que a recuperação funcional e morfológica foram proporcionais à gravidade da lesão e que houve correlação entre ambos os tipos de avaliação, afirmando que apenas a avaliação funcional, que não requer o sacrifício do animal, fornece informações suficientes sobre a regeneração do nervo lesado.

1.3 Avaliação funcional da regeneração nervosa

Em condições experimentais, a recuperação das lesões nervosas periféricas é estudada principalmente através de técnicas de eletrofisiologia, histologia e morfometria. Embora os parâmetros eletrofisiológicos e morfológicos sejam úteis, é

importante conhecer o grau de recuperação funcional que eles implicam. As avaliações funcionais são relativamente fáceis de se empregar em humanos, mas são praticamente impossíveis em animais, o que motivou a busca por técnicas de avaliação funcional em condições experimentais.

Trabalhando com lesões do nervo fibular de coelhos, GUTMANN & GUTMANN (1942) demonstraram que a perda da capacidade de espalhar os dedos é um parâmetro confiável para avaliar o grau de lesão, bem como para seguir sua recuperação. Seu método, todavia, era muito rudimentar e não permitia quantificar nem uma coisa, nem outra.

DE MEDINACELI; FREED; WYATT (1982) desenvolveram um método quantitativo, confiável e reprodutível da condição funcional do nervo ciático de ratos, para a avaliação do grau de lesão e da recuperação, denominado de Índice Funcional do Ciático (IFC; em inglês, Sciatic Functional Index, ou SFI). O método está baseado na medida de parâmetros pré-estabelecidos nas impressões da pata traseira dos animais, obtidas em quando os animais caminhavam sobre tiras de filmes virgens de radiografia. Os animais eram treinados a andar em uma passarela de 43 cm de comprimento por 8,7 cm de largura, que terminava em uma casinha onde eles se abrigavam. Depois de bem treinados, era colocada uma tira de filme radiográfico no piso da passarela e as patas traseiras do animal eram molhadas em líquido revelador. Ao caminhar, o animal deixava as impressões da pata traseira no filme, que era imerso em líquido fixador em seguida, com o que as impressões se tornavam permanentes. Quatro parâmetros foram medidas nessas pegadas e as comparações entre os lados lesado (experimental) e intacto (normal) permitiram estabelecer o índice funcional do ciático (IFC), que é uma expressão percentual do normal.

Todos os parâmetros eram medidos do mesmo modo na pata normal (N) e na lesada, ou experimental (E). A distância ao pé oposto (TOF) é a medida ortogonal entre as pontas dos dedos mais longos de ambos os pés, que representa o comprimento de uma passada. O comprimento da pata (PL) é a distância entre os dois pontos mais extremos da pegada, no sentido longitudinal, que é sempre maior na pata lesada. O espalhar total dos dedos (TS) é a distância entre os dois pontos mais extremos da pegada, no sentido transversal, devendo coincidir com a marca dos dois dedos mais extremos, e o espalhar dos dedos intermediários (IT) é a distância entre os dois dedos intermediários; ambos são menores na pata lesada (FIGURA 1).

FIGURA 1 – Representação esquemática dos parâmetros medidos para calcular o Índice Funcional do Ciático (IFC). N: Normal; E: Experimental (operada); TS: Abertura total dos dedos (1º ao 5º); IT: Abertura dos dedos intermediários (2º ao 4º); PL: Comprimento da pegada.

O IFC foi calculado para nervos normais e submetidos a vários tipos de lesão, segundo a fórmula:

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

Onde:

E: Experimental

N: Normal

TOF: "to other foot", ou distância de uma pata à outra.

PL: "print length", comprimento da pata.

TS: "total spread", ou espalhar total dos dedos.

IT: "intermediate toes", ou espalhar dos dedos intermediários.

Os resultados obtidos com esta equação eram a expressão percentual negativa da função normal, em que 0 (zero) corresponde à função normal, ou ausência de deficiência, e -100 (menos cem) corresponde à disfunção total. Os autores afiançaram que o método era confiável e reprodutível, guardando correlação com os métodos convencionais, mas os cálculos, todos manuais, eram muito complicados.

DE MEDINACELI; DERENZO; WYATT (1984) modificaram o método, adicionando recursos de informática e computação, tornando-o mais prático, rápido e fácil.

CARLTON & GOLDBERG (1986) apresentaram os resultados da aplicação de um método semelhante de medida do índice funcional do ciático, introduzindo os índices funcionais do nervo tibial e do fibular. O seu método é semelhante ao de DE MEDINACELI e colaboradores, particularmente quanto aos parâmetros medidos, à exceção da distância de uma pegada à subsequente (TOF). Afirmaram que, embora

houvesse alguma superposição dos dados, era possível avaliar independentemente cada um dos índices.

LOWDON; SEABER; URBANIAK (1988) introduziram o emprego de tiras de papel impregnado com uma solução de azul de bromofenol em acetona, ao invés de tiras de filme radiográfico. O papel tratado com essa substância apresenta a cor amarela, adquirindo a cor azul quando molhado e conservando-a depois de seco. A principal vantagem desse método é seu baixo custo, além do menor risco de escorregões do animal durante sua marcha e da melhor qualidade de imagem.

BAIN; MACKINNON; HUNTER (1989), a partir de uma análise de regressão linear múltipla das variáveis medidas nas impressões da marcha de ratos, com lesões de nervos específicos, modificaram os índices funcionais do ciático (SFI), do tibial (TFI) e do fibular (PFI). As variáveis utilizadas para o cálculo dos fatores de correção dos índices funcionais foram o comprimento da pegada (PL), o espalhar total dos dedos (TS), e o espalhar dos dedos intermediários (IT); a medida da distância de uma pegada a outra (TOF) foi excluída dos cálculos, por ter sido pouco confiável. Desenvolveram as seguintes fórmulas:

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

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

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

Onde:

N: Normal

E: Experimental

PL: Comprimento da pata

TS: Espalhar total dos dedos

IT: Espalhar dos dedos intermediários.

Do mesmo modo que no método de DE MEDINACELI e colaboradores, o resultado dos índices igual a -100 correspondia à disfunção total dos respectivos nervos, e igual a 0 (zero), ao nervo normal.

SELLI (1998) desenvolveu um programa de computador (*software*) para analisar a impressão das pegadas de ratos a partir dos métodos anteriormente propostos. A partir da captura das imagens das pegadas pela sua digitalização por meio de um *scanner*, o programa realiza todos os cálculos, fornecendo os resultados dos índices funcionais, armazenando-os e permitindo a análise comparativa posterior.

OLIVEIRA; MAZZER; BARBIERI et al., (2001) avaliaram a recuperação morfológica e funcional do nervo ciático em ratos, calculando os índices funcionais do ciático, do tibial e do fibular pelos métodos anteriormente mencionados, empregando o programa de computador (*software*) desenvolvido por SELLI (1998). Utilizaram-se das impressões da marcha obtidas em tiras de papel impregnadas com o azul de bromofenol. Demonstraram que as mudanças histológicas e morfométricas estavam relacionadas ao grau de lesão inicial e que a taxa de recuperação funcional do nervo lesado era diretamente relacionada à carga inicial. Concluíram que a perda

funcional, resultante das lesões por esmagamento do nervo ciático de rato, pode ser facilmente monitorizada pelo Índice Funcional do Ciático.

MENDONÇA (2000) realizou um estudo sobre a influência da estimulação elétrica na regeneração do nervo ciático submetido à lesão por esmagamento, em ratos. A recuperação funcional foi avaliada através do índice funcional do ciático, em intervalos semanais até o 21º dia pós-operatório, quando os animais eram sacrificados para estudo morfométrico do nervo. Concluiu que a estimulação elétrica direta de baixa intensidade acelera a regeneração nervosa após o esmagamento e que o IFC é um método confiável para avaliar a recuperação nervosa, uma vez que seus resultados apresentam correlação com os do estudo morfométrico.

1.4 O ultra-som terapêutico:

O ultra-som é uma irradiação não-ionizante que tem uma série de aplicações médicas e não-médicas. Tirante os recursos térmicos e cinéticos, foi o primeiro agente físico armado a ser empregado para o tratamento fisioterápico de uma série de doenças traumáticas e adquiridas, as pesquisas sobre ele remontando ha mais de 40 anos. Durante este período, considerável quantidade de trabalhos laboratoriais foram realizados para estudar os seus efeitos sobre os tecidos biológicos (DYSON, POND, JOSEPH et al., 1968; MCDIARMID & BURNS; 1987; HARR, 1987; KITCHEN & PARTRIDGE, 1990; MAXWELL, 1992; HARR, 1998; HARR, 1999)

O ultra-som é uma forma de energia mecânica que consiste da vibração de alta frequência. Propaga-se na forma de ondas de frequência inaudível pelo ouvido humano e requer um meio para se propagar (KITCHEN & PARTRIDGE, 1990), provocando oscilações das partículas do meio em que se propagam (FIURINI &

LONGO, 1996; HARR, 1987). É empregado tanto com finalidade diagnóstica como terapêutica, sendo que a frequência média para diagnóstico varia de 5 a 20MHz, e para terapia, de 0,75 a 3MHz (FIURINI & LONGO, 1996). No referente ao emprego terapêutico, as frequências mais altas (3MHz) são absorvidas mais rapidamente, tornando-as mais específicas para o tratamento de tecidos superficiais, ao passo que as frequências menores (1MHz) penetram mais e devem ser usadas para tecidos mais profundos (DOCKER, 1987).

O ultra-som pode ser produzido na forma de ondas contínuas e pulsadas. No modo contínuo, não ocorre interrupção na propagação da energia para o tecido, que causa um aquecimento dos tecidos (efeito térmico). Já no modo pulsado, ocorrem interrupções periódicas na propagação da energia, que resultam na redução do aquecimento do tecido, embora com mesmo nível de estímulo mecânico; desse modo, são potencializados os efeitos não térmicos do ultra-som sobre os tecidos (DOCKER, 1987).

Para obtenção dos efeitos térmicos em nível fisiológico, a elevação de temperatura induzida pela absorção da energia do ultra-som no tecido deve ser mantida entre 40° e 45°, durante cinco minutos (DYSON, 1987). Os efeitos fisiológicos do aquecimento pelo ultra-som podem ser resumidos em aumento da atividade metabólica, aumento do fluxo sanguíneo com conseqüente melhora da cicatrização, aumento da extensibilidade do tecido colágeno, diminuição da rigidez articular, da dor e do espasmo muscular e produção de resposta inflamatória discreta, incluindo o aumento temporário do fluxo sanguíneo (DYSON, 1987; HARR, 1999). A quantidade de calor absorvido depende da natureza do tecido (tecidos que contêm proteínas se aquecem mais rapidamente), do grau de vascularização tecidual, do

tamanho e profundidade da área tratada, do tipo de onda (contínua ou pulsada), frequência e intensidade do ultra-som, e do tempo de aplicação.

Os efeitos fisiológicos não térmicos do ultra-som são produzidos, basicamente, pelo movimento imposto ao tecido pelas ondas mecânicas do ultra-som, constituindo-se na micromassagem e na cavitação (KITCHEN & PARTRIDGE, 1990). A micromassagem é resultante do fluxo e do microfluxo acústicos, ou corrente acústica, definida como sendo a circulação de fluídos induzida pela radiação ultra-sônica (HOOGLAND, 1986). A cavitação é a formação de cavidades ou bolhas de gás ou vapor no interior dos fluídos, como resultado das mudanças de pressão no campo acústico, induzidas pelas ondas do ultra-som; ela pode ser estável ou transitória, sendo que esta última pode desintegrar tecidos e produzir radicais livres. A micromassagem é benéfica, mas a cavitação pode ter efeitos maléficos. A cavitação produzida por ondas pulsadas é benéfica, tendo efeito antiinflamatório e de aumento do fluxo sanguíneo; já a produzida por ondas contínuas pode lesar os tecidos. Essas alterações resultam de mudanças no gradiente de concentração de moléculas e íons junto á membrana celular, influenciando na sua absorção e alterando a concentração de potássio e cálcio (HARR, 1999).

A maioria das lesões tratadas pelos fisioterapeutas envolvem os tecidos moles e o reparo destes tecidos se dá em três estágios: inflamação aguda, proliferação e remodelagem. DYSON (1987) relata que o tratamento por ultra-som pode ser particularmente efetivo se aplicado dentro de poucas horas após a lesão, no estágio inflamatório precoce do processo de reparo, devido á liberação de histamina e de outros agentes quimiotáxicos, atraindo leucócitos polimorfonucleares e monócitos para o sítio da lesão.

RAMIREZ; SCHWANE; McFARLAND et al. (1997) relatam que os efeitos do ultra-som podem ser acentuados nos estágios iniciais do reparo. Este fato foi evidenciado pelo aumento da síntese de colágeno em culturas de fibroblastos submetidos à lesão da matriz extracelular com collagenase, seguida da exposição ao tratamento precoce com o ultra-som. Durante a fase de proliferação, que se inicia por volta de três dias após a lesão, a proliferação de fibroblastos e células endoteliais pode ser facilitada pelo uso do ultra-som (DYSON, 1987; MAXWELL, 1992).

Os efeitos biofísicos do ultra-som são dependentes, dentre outros fatores, da intensidade e frequência de aplicação; doses muito baixas não terão efeito e doses muito altas poderão ser lesivas aos tecidos que se pretende tratar (YOUNG & DYSON, 1990). Entretanto, não há uma definição das intensidades corretas de aplicação do ultra-som (McDIARMID & BURNS, 1987), mas alguns autores são concordes em afirmar que altas intensidades podem interferir no processo de cicatrização (ENWEMEKA, RODRIGUEZ, MENDONSA et al., 1990; DYSON, POND, JOSEPH et al., 1968). As baixas intensidades são usadas para obter efeito terapêutico de analgesia e melhora do reparo tecidual (McDIARMID & BURNS, 1987). HAAR (1999) relata que a aplicação de intensidades mais baixas e o ultra-som pulsado vêm sendo utilizados para minimizar seus efeitos térmicos e maximizar seus efeitos não térmicos. De modo geral, os efeitos não térmicos do ultra-som se dão com dosagens baixas, ao passo que as dosagens altas produzem mais efeitos térmicos (DYSON, 1987).

Existem vários estudos sobre os efeitos do ultra-som na regeneração tecidual. DYSON; POND; JOSEPH et al. (1968) realizaram estudo experimental sobre a aplicação do ultra-som terapêutico na regeneração de lesões cutâneas produzidas na

orelha de coelhos. Os animais foram divididos em grupos que receberam dosagens diferentes de ultra-som, no modo pulsado e no contínuo. O protocolo de tratamento constou do início no 14º dia após a produção da lesão e aplicação três vezes por semana, até que se completasse a regeneração (por volta de 49 dias). Os melhores resultados foram obtidos no grupo tratado com o ultra-som pulsado (ciclo de 2:8), de 3 MHz de frequência e intensidade de $0,5 \text{ W/cm}^2$, por 21 dias. Os autores concluíram que, nas condições do estudo, o ultra-som pode ter importante papel nas fases iniciais do processo de reparo tecidual e que depois do 35º dia de tratamento com a mesma dosagem, as diferenças entre os grupos não foram significativas, o que ficou ainda mais evidente aos 49 dias.

ROBERTS; RUTHERFORD; HARRIS (1982) investigaram a influência do ultra-som terapêutica na cicatrização de tendões flexores, em coelhos. Irradiaram tendões recém suturados com ultra-som pulsado na intensidade de $0,8 \text{ W/cm}^2$ e frequência de 1 MHz, por cinco minutos, durante 30 dias. Demonstraram grande diminuição da resistência mecânica à tração, inclusive com rupturas espontâneas dos tendões, sugerindo grande precauções no uso desse recurso durante o processo de cicatrização inicial, e sugerindo novas pesquisas.

MENEZES; VOLPON; SHIMANO (1999) investigaram os efeitos do ultra-som terapêutico na reparação de lesões musculares em coelhos. Produziram uma lesão por esmagamento no músculo reto das coxas direita e esquerda de 26 coelhos e, três dias após a lesão, iniciaram o tratamento com o ultra-som pulsado (1:5, 1MHz, $0,5 \text{ W/cm}^2$) em aplicações de cinco minutos, durante dez dias consecutivos, somente numa das coxas; o músculo contra-lateral serviu como controle e sofreu apenas esmagamento. Três dias após o término do tratamento os animais foram sacrificados

e os músculos ressecados e submetidos a ensaios de tração, tendo sido demonstrado que os músculos tratados foram mais resistentes à ruptura, com diferenças significativas na deformação máxima, carga e deformação no limite de proporcionalidade, e na energia absorvida na fase de deformação elástica (resiliência). Sugeriram que a aplicação do ultra-som terapêutico nas lesões musculares agudas contribui para melhorar a reparação da lesão muscular aguda.

Por outro lado, não há concordância na literatura acerca dos parâmetros físicos mais adequados para o tratamento de cada tipo de lesão, o que faz com que os profissionais desenvolvam suas próprias idéias. Por isso, é importante que o clínico tenha o maior conhecimento possível acerca da biologia do processo de cicatrização, reparo das feridas e do modo como os agentes físicos interagem com o meio biológico (YOUNG, 1998).

1.4.1 O ultra-som no reparo do tecido nervoso

MADSEN & GERSTEN (1961) investigaram as alterações impostas pela irradiação com ultra-som na velocidade de condução do nervo ulnar, em humanos normais. Demonstraram que a velocidade de condução diminuiu com intensidades entre 0,88 a 1,28 W/cm², aumentando (0,8%) com a intensidade de 1,92 W/cm², ao mesmo tempo que a temperatura do tecido subcutâneo aumentou muito pouco (0,5°C). O aquecimento do tecido subcutâneo era maior quanto menor a área irradiada, acarretando aumento da velocidade de condução do nervo. Até a intensidade de 2 W/cm², a relação entre a intensidade e a temperatura era praticamente linear; acima disso, a temperatura diminuía, provavelmente devido à

vasoconstrição. No grupo controle (uso do cabeçote de ultra-som, sem energia), houve diminuição da temperatura do subcutâneo e da velocidade de condução.

ZANKEL (1966) investigou os efeitos da compressão, da crioterapia e do ultra-som terapêutico sobre a velocidade de condução do nervo ulnar. Em relação a este último, demonstrou que sua aplicação sobre o nervo no nível do cotovelo não produziu nenhuma alteração. Já sua aplicação no nível do antebraço, nas intensidades de 1 W/cm^2 por 10 minutos ou 2 W/cm^2 por 5 minutos, produziu significativa redução da velocidade.

FARMER (1968) realizou um estudo sobre a influência do ultra-som terapêutico na velocidade de condução do nervo ulnar (VCN), em humanos. Assim, fazia as medidas antes e após a aplicação do ultra-som no nervo ulnar entre o cotovelo e o punho. Relatou um aumento significativo da velocidade de condução após irradiação ultra-sônica de 0,5 e 3 W/cm^2 de intensidade, por 5 minutos, e uma significativa diminuição da velocidade com irradiação de 1, 1,5 e 2 W/cm^2 de intensidade. Embora a temperatura não tenha sido medida, o aumento da velocidade de condução foi atribuído em parte aos efeitos térmicos do ultra-som e sua diminuição, aos efeitos mecânicos.

CURRIER; GREATHOUSE; SWIFT (1978) estudaram a influência do ultra-som na velocidade de condução nervosa, correlacionando com a temperatura. A velocidade de condução foi medida pela eletroneurografia do ramo cutâneo do nervo radial em ambos os antebraços de cinco indivíduos sem história pregressa de problemas neurológicos; a temperatura foi medida com um termistor subcutâneo. O ultra-som contínuo foi aplicado por cinco minutos, na dose de $1,5 \text{ W/cm}^2$ e frequência de 1 MHz, sobre a área do nervo radial. As medidas foram realizadas

antes e logo após a aplicação do ultra-som, tendo sido demonstrado que a temperatura aumentou no local de passagem do nervo, acarretando diminuição do tempo de latência da condução (aumento da velocidade), embora a amplitude e duração do potencial de ação nervoso não tivessem mudado significativamente.

HALLE; SCOVILLE; GREATHOUSE (1981) realizaram uma investigação sobre os efeitos da irradiação ultra-sônica e do aquecimento superficial sobre a velocidade de condução do nervo radial superficial no antebraço de indivíduos normais. As temperaturas foram medidas no subcutâneo com um termistor em agulha. Conforme o grupo, os indivíduos foram submetidos a tratamento com o ultra-som contínuo (1 W/cm^2 , 1 MHz) por cinco a 20 minutos, ou somente expostos à luz infravermelha. As medidas da latência sensitiva eram tomadas a cada $0,3^\circ\text{C}$ de aumento da temperatura do subcutâneo, até que ela atingisse um aumento de $1,2^\circ\text{C}$. Demonstraram que nem a combinação de estímulo mecânico com o térmico do ultra-som, nem o puramente térmico da luz infravermelha causaram diminuição da latência de condução do nervo.

HONG; LIU; YU (1988) estudaram o efeito da irradiação com o ultra-som terapêutico no tecido nervoso, após lesão experimental por compressão, em ratos albinos. Os nervos tibiais de ambas as patas de cada animal eram submetidos a compressão mecânica, entre o joelho e o tornozelo. O tratamento com o ultra-som ($0,5 \text{ W/cm}^2$ e 1 W/cm^2 , 1 MHz) era iniciado cinco dias após a lesão, com a aplicação sobre a área da lesão, em apenas um dos membros, por um minuto, três vezes por semana. Foram medidas a latência motora distal, a velocidade de condução motora e a amplitude do potencial de ação muscular composto evocado, antes e imediatamente após a lesão, e cada duas ou três semanas depois. Demonstraram que a recuperação

dos parâmetros, com exceção da latência, foi significativamente mais rápida nos nervos tratados na intensidade de 0,5 W/cm² do que nos controles. Com a intensidade de 1 W/cm² a recuperação do potencial de ação muscular composto evocado foi mais lenta, sem mudanças significativas dos outros parâmetros. Concluíram que a ultra-sonoterapia com doses baixas pode facilitar a recuperação das neuropatias de compressão, mas com doses altas pode ter efeitos adversos.

MOORE; GIECK; SALIBA et al. (2000) investigaram a influência do tratamento com o ultra-som nas latências distais do nervo mediano em humanos. Variando os parâmetros do ultra-som (intensidade de 1 W/cm², frequências de 1 e 3 MHz, onda contínua ou pulsada (50%), tempo de aplicação de 8 minutos), conforme o grupo, e medindo a temperatura do tecido subcutâneo e as latências motora e sensitiva distais do nervo antes e durante o tratamento (2, 4, 6 e 8 minutos), concluíram que as alterações das latências estavam mais relacionadas aos efeitos térmicos do ultra-som do que aos efeitos não térmicos ou mecânicos.

MOURAD; LAZAR; CURRA et al. (2001) analisaram os efeitos do ultra-som terapêutico sobre a regeneração do nervo ciático de ratos, empregando vários tipos de tratamento, com mudança dos parâmetros intensidade, frequência e duração. A lesão produzida era um esmagamento na porção média do nervo e o tratamento era conduzido por 30 dias, com aplicações em três dias por semana. Demonstraram que o melhor protocolo de aplicação do ultra-som foi o de intensidade de 0,25 W/cm², frequência de 2,25 MHz e tempo de aplicação de 1 minuto e que, com esses parâmetros, a aplicação transcutânea de ultra som acelerou a recuperação do nervo.

1.5 Objetivo

O objetivo deste trabalho foi o de analisar a influência do tratamento com o ultra-som terapêutico, precocemente aplicado, na regeneração do nervo ciático submetido a lesão por esmagamento, através da avaliação da recuperação funcional e do estudo histo-morfométrico do nervo, em ratos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Animal e grupos experimentais

O trabalho experimental foi desenvolvido no Laboratório de Bioengenharia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Foram utilizados 20 ratos machos adultos da linhagem Wistar, com peso corporal variando entre 300 e 350 gramas, fornecidos pelo Biotério Central da Prefeitura do Campus da USP de Ribeirão Preto e mantidos em gaiolas coletivas com cinco animais em cada uma, com dieta a base de ração-padrão do biotério e água *ad libitum*.

Os ratos foram divididos em dois grupos, conforme o tipo de procedimento realizado:

Grupo 1 (controle): 10 ratos submetidos somente à lesão por esmagamento, sem tratamento com o ultra-som.

Grupo 2: 10 ratos submetidos à lesão por esmagamento, em seguida tratados com aplicações diárias do ultra-som pulsado (1:5, ou 20%) na intensidade de 0,4 W/cm², frequência de 1 MHz durante 2 minutos.

2.2 Anestesia e procedimento cirúrgico

Os ratos foram inicialmente pesados, para cálculo da dose de anestésico, e colocados na passarela de marcha para aprendizado. Tão logo tivessem aprendido a

caminhar na passarela, era realizado o registro da impressão pré-operatória das pegadas das patas traseiras, que serviria para a medida do índice funcional do ciático normal. Posteriormente, eram identificados e anestesiados com uma associação de Ketamina (Ketamina 5%) com Xilazina (Xilasina a 2%), na proporção 1:4, aplicando-se 0,13 ml para cada 100 g de peso corporal. Era feita, então, a tricotomia da face lateral da coxa direita do animal, que era posicionado em decúbito lateral esquerdo e fixado à mesa operatória, com o membro pélvico direito para cima. A anti-sepsia era realizada com solução de álcool-iodado a 20%.

O nervo ciático era abordado através de uma incisão cutânea longitudinal retilínea, na face lateral da coxa, indo desde o trocanter maior até o joelho. O espaço entre os músculos quadríceps e glúteos era desenvolvido por dissecação romba e o nervo era identificado desde sua emergência, na borda inferior do glúteo maior até sua bifurcação, no joelho (FIGURA 2). Um ponto de sutura (Prolene 6/0, Ethicon®) era passado no epineuro cerca de 3 mm distalmente à emergência do nervo, como modo de identificar o local de realização do esmagamento (FIGURA 2). O nervo ciático era, então, esmagado, utilizando-se para isso um dispositivo portátil, capaz de produzir uma carga estática de 15.000 g (FIGURA 3). Esse dispositivo foi especialmente desenvolvido para substituir a máquina de ensaio utilizada em trabalhos semelhantes anteriores e tornar o processo de esmagamento do nervo mais fácil e rápido. Consta, basicamente, de um cilindro impulsionado por uma mola de pressão regulável que imprime a lesão por esmagamento do nervo, o qual permanece apoiado em uma base. O dispositivo era periodicamente calibrado, com o auxílio de uma célula de carga, não tendo sido registradas quedas da pressão da mola em nenhuma das calibrações.

O esmagamento era realizado numa porção intermediária do nervo, distalmente ao ponto de sutura previamente passado no epineuro, com a carga de 15.000 g incidindo num segmento de 5 mm de comprimento, por 10 minutos (FIGURA 3).

FIGURA 2 – Procedimento cirúrgico. Abordagem do nervo ciático e, delimitação por um ponto de sutura (monofilamento de polipropileno azul 6-0, Prolene, Ethicon[®]) do início da região a ser esmagada (A); Ponto de sutura (B).

FIGURA 3 – Esmagamento do nervo ciático. Posicionamento do nervo no acessório da máquina (A); Esmagamento do nervo (B); Posicionamento do animal na máquina (C).

Após o esmagamento, o nervo ciático era cuidadosamente destacado do acessório e deixado em seu trajeto de origem. Os músculos e a pele eram aproximados e suturados com pontos simples de fio monofilamento de nylon 5/0 (Ethicon®). A ferida era lavada com solução anti-séptica (álcool-iodado a 20%) e aspergida com uma substância repelente (Lepecid®), não tendo sido aplicado nenhum curativo. Antibioticoterapia era feita pela aplicação de uma dose intramuscular única de uma associação de Penicilina e Estreptomicina.

2.3 Ultra-sonoterapia

A ultra-sonoterapia era realizada com um equipamento de ultra-som clínico portátil, modelo SONACEL® PLUS III série 1050 (BIOSET – Indústria de Tecnologia Eletrônica Ltda), regulado para onda pulsada, na frequência de 1MHz e intensidade de 0,4 W/cm². O cabeçote de aplicação foi especialmente confeccionado para aplicação em pequenas áreas, com diâmetro de 1,35 cm.

Os animais do Grupo 2 (tratado) eram submetidos à aplicação do ultra-som diariamente (FIGURA 4), por dez dias consecutivos a partir do primeiro dia pós-operatório, durando 2 minutos cada aplicação.

FIGURA 4 - Tratamento com Ultra-som: Aparelho de Ultra-som terapêutico, com o cabeçote especial de 1,35 cm (A). Ilustração de um animal recebendo tratamento com Ultra-som na face lateral da coxa, sobre a região onde foi produzida a lesão nervosa (B).

2.4 Análise funcional da marcha

A análise funcional da marcha foi realizada segundo o método de BAIN; MACKINNON; HUNTER (1989), as impressões da marcha sendo obtidas pelo método de LOWDON; SEABER; URBANIAK (1988), em tiras de papel impregnado com azul de bromofenol.

2.4.1 Impressão das pegadas

Inicialmente era preparada a solução de azul de bromofenol, diluindo-se a forma anidra desse sal (Sigma[®]) a 1% em acetona absoluta. Folhas de papel sulfite eram mergulhadas nessa solução e deixadas para secar, permanecendo na cor laranja. Depois de escurridas e secas, as folhas eram cortadas em tiras de 43 cm de comprimento e 8,7 cm de largura (as mesmas dimensões da passarela), envolvidas em filme plástico e estocadas em local seco e escuro, para não entrarem em contato com umidade.

Na fase pré-operatório, os animais aprenderam a caminhar na passarela de madeira disponível para esse fim, fechada nas laterais e dotada de um casinhola no final, para servir de abrigo, e confeccionada conforme modelo de DE MEDINACELI; FREED; WYATT (1982). Depois de aprenderem a caminhar na passarela, eram colhidas as impressões das pegadas da marcha normal dos ratos; no período pós-operatório, as impressões eram colhidas a intervalos semanais, no 7º, 14º e 21º dias. Para a obtenção das impressões das pegadas, as patas traseiras dos animais eram embebidas com detergente comum; desse modo, a umidade das patas tornava as impressões da cor azul escuro. As tiras de papel com as impressões das

pegadas eram deixadas secar, guardadas em filme plástico para evitar umidade e posteriormente analisadas, com o auxílio do programa de computador especialmente desenvolvido para esse fim, no Laboratório de Bioengenharia da FMRP (SELLI, 1998). Depois da obtenção da última impressão da pegada , os animais eram sacrificados para ressecção dos nervos ciáticos, destinados ao estudo morfométrico (FIGURA 5).

FIGURA 5 - Registro das pegadas na passarela. Vista geral da passarela (A). Pegadas registradas (B).

2.4.2 Técnica de avaliação do IFC

As impressões das pegadas foram digitalizadas com um *scanner* e introduzidas no programa de computador, que permite a identificação, análise das imagens segundo os parâmetros previamente selecionados e armazenagem dos dados. Uma vez instalada a impressão da pegada no programa, os parâmetros analisados eram medidos simplesmente clicando o cursor do *mouse* nos pontos correspondentes a cada parâmetro, na seqüência pré-determinada (FIGURA 6). Os parâmetros medidos foram o comprimento da pegada (PL, ou print length), a abertura total dos dedos, do 1° ao 5° (TS, ou total spread of toes) e a abertura dos dedos intermediários, do 2° ao 3° (IT, ou intermediate toes), como sugerido por BAIN; MACKINNON; HUNTER (1989). Uma vez registrados os parâmetros, o programa calculava automaticamente o valor do Índice Funcional do Ciático (IFC), que era também automaticamente armazenado em arquivo, de forma a possibilitar a análise das curvas de regeneração em função do tempo.

O IFC é negativo, ou seja, o normal é igual a zero (0), significando ausência de disfunção do nervo, enquanto que a disfunção total é igual a menos cem (-100), significando completa disfunção, de modo que quanto mais próximo de zero melhor a função.

FIGURA 6 - Visualização do programa utilizado, CELLI (1995).

2.5 Análise histológica e morfométrica

Todo o processo de análise histológica e morfométrica foi realizado no Laboratório de Neurologia Aplicada e Experimental do Departamento de Neurologia Psiquiatria e Psicologia Médica da FMRP-USP.

No 21º dia pós-operatório, os ratos foram sacrificados e o nervo ciático novamente abordado, através da mesma incisão usada no procedimento inicial. Inicialmente, o nervo era embebido com uma solução de glutaraldeído a 25% em cacodilato de sódio a 0,025 M, por dois minutos, para fixar o nervo e manter suas características morfológicas. Em seguida, o nervo era seccionado proximal e distalmente, ressecando-se um segmento de 2 cm, compreendendo a zona da lesão por esmagamento, sendo colocado sobre uma lâmina de parafina e dividido em três segmentos menores: o segmento proximal, desde a secção proximal até o ponto de sutura passado no epineuro, o segmento médio, correspondente à zona da lesão, e o segmento distal, correspondente ao restante do nervo. Estes segmentos eram colocados separadamente em frascos contendo a mesma solução fixadora., e colocados em geladeira a cerca de 6°C, por um período de oito a 12 horas, depois do que o material era lavado em solução isotônica de cacodilato de sódio e pós-fixado em tetróxido de ósmio a 2%, por oito horas. Depois disso, o material era novamente lavado em solução-tampão isotônica de cacodilato de sódio, desidratado em soluções aquosas de etanol de concentração crescente, de 25% a 100%, e mergulhado em solução de óxido de propileno puro, por 15 minutos, após o que era passado por bateria de mistura de óxido de propileno e resina de inclusão de concentração

crescente desta última (3:1 e 1:3, respectivamente), por 15 minutos cada banho, sendo por último mergulhado no banho de resina pura.

Em seguida, os segmentos eram incluídos em resina epóxi (EPON 812) dentro de um molde, e colocados em estufa por 48 horas para polimerização. Depois da polimerização, eram cortadas secções de 0,5 μm de espessura, que eram colocados nas lâminas de vidro com água, deixadas em placa aquecedora de platina por duas a três horas e, em seguida, corados com azul de toluidina a 1%.

A análise morfométrica foi feita em todos os segmentos do nervo e constou do cálculo da densidade de fibras (número de fibras/ mm^2). Primeiramente, foram selecionados os melhores cortes dos nervos, pela microscopia de pequeno aumento, descartando os cortes de má qualidade, nos quais o processo de medida dos parâmetros pudesse ser prejudicado. Os critérios de seleção dos cortes foram a integridade da morfologia do nervo, particularmente do perineuro, qualidade da coloração, ausência de artefatos de técnica (rachaduras, dobras). Depois, utilizando o *software* de análise morfométrica KS400 v. 2.0, os fascículos eram capturados com uma câmera de vídeo (JVC - TK1270) acoplada a um microscópio de transmissão de luz (Axiophoto Zeiss), no qual o aumento era ajustado para ser o maior possível para que cada fascículo do nervo fosse inteiramente capturado dentro de um quadro de imagem. Isso feito, era obtida a área fascicular (μm^2), circundando o perineuro pela sua borda interna com o cursor do *mouse*. Na sequência eram capturados quadros com objetiva de 100 X e optovar de 1,6 X, o que garantia um aumento suficiente para realizar a contagem das fibras. Desta forma, eram capturados 100% da área de cada fascículo para análise.

As imagens eram armazenadas em disco flexível e submetidas a uma nova análise, que realizava a contagem do número de fibras de cada fascículo do nervo, do que resultava a densidade fascicular de fibras. Por fim, de posse das densidades fasciculares de fibras, obtinham-se o número médio e a densidade média de fibras do nervo em estudo.

2.6 Análise estatística

A análise estatística foi realizada para a comparação dos resultados do IFC e da análise morfométrica. Para a análise estatística do IFC foi aplicado o teste *t de Student*, com nível de significância de 5%, utilizando o programa *SigmaStat*® v.2.03. Os resultados da morfometria (densidade média de fibras) foram analisados através do teste não paramétrico de Mann-Whitney, com nível de significância de 5%.

3 RESULTADOS

3.1 Generalidades

Os animais toleraram bem a anestesia e o procedimento cirúrgico. No início do experimento, ocorreu deiscência de cicatriz e infecção local em alguns ratos, problema que foi solucionado com a introdução da antibioticoterapia rotineira, em dose única, imediatamente após o procedimento cirúrgico e aplicação do repelente, o qual evitava o ataque por moscas.

De início, os animais não se apoiavam sobre a pata operada, apresentando o pé caído e adução total dos dedos, como resultado da grave lesão por esmagamento. Eles gradualmente recuperaram a capacidade de fazer apoio sobre o membro operado e espalhar os dedos.

3.2 Análise Funcional da Marcha (IFC)

Foram analisadas e medidas 80 impressões de pegadas. Na fase pré-operatória, os valores médios do IFC foram de $-4,88$ (variação: $8,23$ a $-19,69$) para o Grupo 1 (controle) e de $-6,83$ (variação: $7,01$ a $-17,08$) para o Grupo 2 (tratado), não tendo havido diferença significativa entre ambos ($p=0,655$), lembrando que todos os animais estavam, ainda, intactos. No 7º dia pós-operatório, o IFC foi $-98,16$

(variação: -82,54 a -115,79) para o Grupo 1, e -100,98 (variação:-78,97 a -111,99) para o Grupo 2, as diferenças entre ambos não tendo sido significantes ($p=0,582$).

No 14º dia pós-operatório o IFC foi de -79,50 (variação: -59,83 a -96,41) para o Grupo 1 e -59,21 (variação:-84,16 a -40,78) para o Grupo 2, as diferenças entre ambos sendo significantes ($p=0,02$). Finalmente, no 21º dia pós-operatório o IFC médio foi de -44,00 (variação: -21,61 a -57,10) para o Grupo 1, e de -26,78 (variação:-14,99 a -49,60) para o Grupo 2, as diferenças entre ambos sendo igualmente significantes ($p=0,002$) (TABELA 1 e FIGURA 7).

A análise por grupo mostrou que o IFC subiu de -98,2 na primeira semana, para -79,5 na segunda e -44 na terceira, no Grupo 1, o que significou uma melhora de 55% entre a primeira medida e a última. No Grupo 2, o IFC subiu de -101 na primeira semana, para -59,21 na segunda e -26,68 na terceira, o que significou uma melhora de 73% entre a primeira e a última medida.

TABELA 1 – Comportamento do Índice Funcional do Ciático (IFC) dos Grupos 1 (Controle) e 2 (ultra-sonoterapia), nos vários períodos de observação.

<i>Rato</i>	<i>Pré-Operatório</i>		<i>7 dias - PO</i>		<i>14 dias - PO</i>		<i>21 dias - PO</i>	
	<i>Controle</i>	<i>U.S.</i>	<i>Controle</i>	<i>U.S.</i>	<i>Controle</i>	<i>U.S.</i>	<i>Controle</i>	<i>U.S.</i>
R1	-14,80	-17,02	-82,54	-102,55	-59,83	-84,16	-39,73	-26,11
R2	8,23	-17,08	-100,26	-98,15	-96,41	-73,45	-57,10	-49,60
R3	-1,31	-11,13	-89,83	-101,51	-85,01	-58,91	-40,43	-20,99
R4	-8,44	7,01	-115,79	-115,18	-89,72	-40,78	-44,95	-17,29
R5	-5,55	-9,99	-95,39	-108,16	-76,39	-72,70	-51,56	-25,85
R6	-19,69	1,22	-87,21	-78,97	-82,10	-44,47	-21,61	-14,99
R7	15,33	-2,20	-93,86	-107,93	-78,08	-60,39	-45,92	-15,43
R8	-1,16	-3,19	-110,71	-84,53	-80,35	-52,69	-43,22	-38,37
R9	-9,61	0,04	-96,05	-111,99	-77,16	-58,41	-52,52	-19,74
R10	-11,81	-16,00	-109,97	-100,78	-69,98	-46,17	-42,92	-39,44
Média	-4,88	-6,83	-98,16	-100,98	-79,50	-59,21	-44,00	-26,78
D. P.	10,58	8,56	10,93	11,49	10,13	14,06	9,66	11,82

FIGURA 7 - Variação temporal do Índice Funcional do Ciático nos Grupos 1 e 2.

3.3 Análise Histológica

Foram analisados, ao microscópio de luz, cortes semifinos (0,5 μ m de espessura) corados pelo azul de toluidina a 1%.

3.3.1-Grupo 1 (*animais com lesão e não tratados*)

No segmento proximal à lesão, as fibras mielínicas de grande e pequeno diâmetro mostravam o aspecto morfológico normal e típico, com bainha de mielina de espessura proporcional ao diâmetro do axônio, regular e uniforme (FIGURA8-AI). Eram observados, ainda, fibroblastos, vasos capilares e áreas endoneurais ocupadas por fibras amielínicas. Já no segmento correspondente ao local da lesão, foram observadas fibras em franca degeneração *walleriana* (FIGURA 8-BI, seta) e fibras de diâmetro em geral menor que o normal, com bainha de mielina proporcionalmente fina em relação ao diâmetro do axônio (FIGURA 8-BI, cabeça de seta), sugerindo processo de desmielinização. Por fim, no segmento distal à lesão, foram observadas algumas fibras de pequeno calibre, ausência de figuras de degeneração *walleriana* e muitas fibras com bainha de mielina fina (FIGURA8-CI).

3.3.2- Grupo 2 (*animais com lesão e tratados*)

No segmento proximal à lesão foram observadas as mesmas características descritas para o grupo controle (FIGURA8-AII). No segmento correspondente ao local da lesão, além das fibras com bainha de mielina fina (FIGURA 8-BII, cabeça de seta), também figuras de brotamentos axonais, ou “sprouting” (FIGURA 8-BII, seta). No segmento distal à lesão, foram observados muitos núcleos de células de

Schwann com o aspecto reacional de franca atividade de síntese (FIGURA 8-CII, *), figuras de brotamento axonais (FIGURA 8-CII, seta) e muitas fibras de pequeno diâmetro (FIGURA 8-CII, cabeça de seta).

FIGURA 8 - Aspecto morfológico normal típico (AI e AII). Degeneração *Walleriana* (seta); bainha de mielina com espessura fina (cabeça de seta) (BI). Sprouting (seta), bainha de mielina fina (cabeça de seta) e presença de vasos (canto superior esquerdo) (BII). Nota-se um grande número de fibras com bainha de mielina com espessura fina e algumas fibras de pequeno calibre (CI). Núcleos arredondados de célula de Schwann (*), sprouting (seta), muitas fibras de pequeno diâmetro (cabeça de seta) e presença de vasos (CII). (régua 10µm).

3.4 Análise Morfométrica das Fibras Nervosas

A análise morfométrica das fibras nervosas regeneradas, ou da densidade de fibras, foi efetuada nos segmentos proximal, médio e distal do nervo ciático de todos os animais de cada grupo (TABELA 2 e FIGURA 9).

TABELA 2 – Densidade de fibras mielínicas das porções proximal, média e distal do nervo ciático dos grupos controle e tratado.

<i>Porção do nervo</i>	<i>Grupo</i>	<i>Média (Fibras/mm²)</i>	<i>Desvio Padrão (Fibras/mm²)</i>	<i>Mediana (Fibras/mm²)</i>
<i>Proximal</i>	Controle	21268,1	8309,8	18116,5
	Tratado	16526,4	1739,3	16730,5
<i>Média</i>	Controle	20848,3	10018,5	19184,5
	Tratado	16014,4	1891,0	16015,0
<i>Distal</i>	Controle	11003,7	3115,6	11128,0
	Tratado	14065,2	4210,5	13934,0

A densidade média de fibras no segmento proximal foi de 21.268,1 fibras/mm² no Grupo 1 e de 16.526,4 fibras/mm² no Grupo 2, não tendo havido diferenças estatisticamente significantes entre os grupos (p=0,17).

A densidade média de fibras no segmento médio foi de 20.848,3 fibras/mm² no Grupo 1 e de 16.014,4 fibras/mm² no Grupo 2, igualmente sem diferença estatisticamente significativa entre os grupos (p=0,29).

No segmento distal, a densidade média de fibras foi de 11.003,7 fibras/mm² para o Grupo 1, e de 14.065 fibras/mm² para o Grupo 2 (FIGURA 8), com diferença estatisticamente significativa entre os grupos (p=0,05).

FIGURA 9 - Gráfico dos valores médios da densidade de fibras mielínicas do nervo ciático dos Grupos 1 (controle) e 2 (tratado).

4 DISCUSSÃO

O ultra-som terapêutico é empregado para o tratamento fisioterápico de um grande número de doenças do sistema músculo-esquelético, mas muito pouco parece estar estabelecido quanto ao seu emprego para o tratamento de lesões dos nervos periféricos. Todavia, existem algumas evidências na literatura de que ele possa ter algum efeito na regeneração dos nervos lesados, tendo sido esse o motivo do presente trabalho. MADSEN & GERSTEN (1961), por exemplo, não puderam estabelecer nenhuma razão para a diminuição da velocidade de condução nervosa observada após a aplicação do ultra-som; em contrapartida, FARMER (1968) atribuiu a diminuição velocidade de condução nervosa aos efeitos mecânicos do ultra-som, enquanto que MOORE; GIECK; SALIBA et al. (2000) concluíram que as alterações das latências estavam mais relacionadas aos efeitos térmicos do ultra-som do que aos efeitos mecânicos.

Todavia, SMORTO & BASMAJIAN (1972)² *apud* CURRIER; GRETHOUSE; SWIFT (1978) afirmaram que a diminuição da velocidade de condução nervosa não poderia ser atribuída a nenhum efeito do ultra-som, mas meramente a um efeito da mudança de temperatura por ele induzida. CURRIER; GRETHOUSE; SWIFT (1978) demonstraram que a temperatura aumentou no local da passagem do nervo onde o ultra-som foi aplicado, acarretando a diminuição do

² SMORTO, M. P. & BASMAJIAN, J. G. (1972). Clinical electroneurography: Introduction to nerve conduction tests. Baltimore, Williams & Wilkins, p.204.

tempo de latência, que implica num aumento da velocidade, embora a amplitude e a duração do potencial de ação nervoso não tenham mudado.

HALLE; SCOVILLE; GRETHOUSE (1981) demonstraram que nem a combinação dos efeitos mecânicos com os térmicos do ultra-som, nem o efeito puramente térmico da luz infravermelha, eram capazes de causar a diminuição da latência de condução do nervo.

Do ponto de vista da possível ação do ultra-som sobre a regeneração nas neuropatias por compressão, HONG; LIU; YU (1988) concluíram que a ultra-sonoterapia com baixas intensidades de aplicação pode facilitá-la, mas as altas intensidades podem ter efeitos adversos. Igualmente, MORAD; LAZAR; CURRA et al. (2001) demonstraram que a aplicação transcutânea do ultra-som acelerou a recuperação do nervo.

Assim, pela análise das diversas publicações pertinentes é evidente que os resultados da ultra-sonoterapia para a regeneração nervosa são diferentes e até conflitantes. Tal fato pode ser explicado pelas diferenças nos parâmetros de aplicação empregados, sabendo-se hoje que a alta intensidade tem efeitos adversos, pois favorece os efeitos térmicos do ultra-som em detrimento dos não térmicos ou mecânicos. De fato, a julgar pelos dados da literatura, não é possível sistematizar os parâmetros de utilização do ultra-som, porque os relatos não são conclusivos quanto aos seus efeitos fisiológicos e terapêuticos, nem quanto ao mecanismo de ação no reparo do nervo periféricos (FARMER, 1968; CURRIER; GREATHOUSE; SWIFT, 1978; HONG; LIU; YU, 1988), embora MOURAD; LAZAR; CURRA et al. (2001) tenham sugerido que os melhores efeitos ocorreram com a intensidade de 0,25 W/cm² e frequência de 2,25 MHz, em aplicações de 1 minuto.

Por outro lado, HONG; LIU; YU (1988) consideraram baixa a intensidade de $1,0 \text{ W/cm}^2$, de utilização freqüente na prática clínica em humanos, salientando que as doses usadas em estudos experimentais com animais provavelmente não produziram os mesmos efeitos em humanos. Além disso, os nervos lesados podem ter uma reação diferente daquela dos nervos intactos, podendo ser mais sensíveis à condução térmica induzida. Os autores relatam que novos estudos devem ser desenvolvidos com cobaias, antes que um protocolo terapêutico completo possa ser estabelecido.

Outro ponto de controvérsia é quanto ao animal empregado nos estudos experimentais de investigação da estimulação ou indução da regeneração de nervos periféricos, particularmente o rato, devido à grande capacidade de regeneração rápida e espontânea deste animal. Neste trabalho, o rato foi escolhido por ser um animal de baixo custo, fácil manuseio e cuja estrutura dos nervos periféricos é semelhante à dos humanos, mesmo sob microscopia eletrônica, o que favorece estudos de natureza morfológica. Por outro lado, o estudo proposto foi de curto prazo, até a terceira semana depois de produzida a lesão, confiando no fato de que nessa fase a regeneração espontânea ainda não é avançada.

O nervo ciático foi igualmente eleito porque sua estrutura é muito semelhante à dos nervos periféricos de humanos, com vários fascículos e densa irrigação sangüínea. Entretanto, ele é um nervo muito calibroso, dotado de vários milhares de fibras nervosas, o que torna a análise morfométrica muito trabalhosa. A lesão por esmagamento foi escolhida por preservar a estrutura de sustentação do nervo e não necessitar de reparo cirúrgico que, ao mesmo tempo que requer treinamento cirúrgico especial, introduz variáveis de difícil controle na análise dos resultados. Além disso, a opção pelo esmagamento permitiu padronizar a intensidade da lesão produzida,

provavelmente sem grandes variações entre os animais. OLIVEIRA; MAZZER; BARBIERI et al. (2001) demonstraram, num estudo experimental com o nervo ciático de ratos, que a gravidade da lesão por esmagamento é proporcional à carga aplicada, que a regeneração após o esmagamento está relacionada diretamente à gravidade da lesão inicial e que a função motora retorna ao normal ou próximo disso no prazo de 60 dias, mesmo nas lesões produzida por carga de 15 kg, aplicada por 10 minutos, que foram os parâmetros escolhidos para o presente trabalho. Essa carga produz uma lesão grave do nervo, provavelmente do tipo 4 de Sunderland, mas foi adotada porque o presente estudo foi idealizado para desenvolvimento no curto prazo, quando as possíveis mudanças nos parâmetros de avaliação no grupo tratado pudessem ser mais facilmente identificadas; considerando a rápida recuperação funcional espontânea dos ratos, no prazo mais longo as diferenças poderiam ser mais difíceis de serem identificadas.

De modo geral, os métodos de avaliação da regeneração nervosa em situações experimentais não vão muito além da histologia, com ou sem morfometria, e da eletrofisiologia, quando seria desejável que se avaliasse a função. Entretanto, avaliar a função recuperada é relativamente fácil em humanos, mas praticamente impossível em animais. Todavia, o IFC introduzido por DE MEDINACELI e colaboradores (1982, 1984) e aperfeiçoado por BAIN e colaboradores (1986) oferece a possibilidade de se fazer uma avaliação quantitativa, embora global, da função recuperada, com a vantagem de não ser um método invasivo, ser de baixo custo e prescindir do sacrifício do animal, o que permite estudos longitudinais em prazo longo. SELLI (1998) aprimorou o método de avaliação do IFC, desenvolvendo um programa de computação que torna mais fácil as medidas dos parâmetros, sua

armazenagem e interpretação, fornecendo ainda o IFC segundo os vários métodos existentes (DE MEDINACELI e colaboradores, BAIN e colaboradores e CARLTON & GOLDBERG). O método de avaliação do IFC empregado neste estudo foi o proposto por BAIN e colaboradores, que provou ser capaz de avaliar a condição funcional do nervo ciático, fornecendo um valor numérico da função, passível de análise estatística e confiável, conforme comprovado nos estudos de OLIVEIRA; MAZZER; BARBIERI et al. (2001).

Cabe comentar que, pelo método proposto por SELLI (1998) e utilizado em trabalhos anteriores pelo mesmo grupo de pesquisadores (OLIVEIRA; MAZZER; BARBIERI et al., 2001), as impressões das pegadas eram digitalizadas com um *scanner* e analisadas no monitor do computador para a realização das medidas dos parâmetros. Nesse ponto, observou-se que o passo mais difícil é distinguir os pontos correspondentes a cada parâmetro, na primeira e na segunda semanas, pois as impressões das pegadas estavam muito deturpadas pela seqüela da lesão, com os animais pisando com os dedos em completa adução, falseando e às vezes quase impossibilitando as medidas. Esse fato demandou tempo até que o pesquisador desenvolvesse a habilidade em reconhecer cada ponto, mas com certeza não resultou em erro de interpretação, mesmo porque a seqüela apresentada pelos animais correspondia a uma completa disfunção, como é esperado na primeira e na segunda semanas.

Embora haja discordância, a densidade de fibras nervosas é um parâmetro adequado para o estudo do nervo lesado e da sua regeneração. Contudo, ela depende da área da secção transversa do nervo em estudo, que pode ser modificada por fatores indesejáveis e artefatos de técnica. Assim, do mesmo modo que o edema aumenta o

diâmetro do nervo e, conseqüentemente, sua área de secção transversa, a preparação do segmento de nervo para as análises 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 histo-morfometria, mostraram indícios de regeneração das fibras nervosas já com 21 dias da lesão, fenômeno semelhante ao descrito por MIRA (1979), que observaram aumento das fibras mielinizadas em torno da segunda semana, e por MENDONÇA (2000), que observou aumento do número de fibras de pequeno diâmetro na terceira semana. No grupo tratado (2), no segmento correspondente ao local da lesão foram observados, além das fibras com bainha de mielina fina, brotamentos axonais sugerindo que o ultra-som alterou a morfologia do nervo lesado, prevenindo a degeneração ou acelerando o processo de reparo, mas, não houve diferença estatística na densidade de fibras. No segmento distal à lesão, foram observados muitos núcleos de célula de Schwann com evidente atividade de síntese, mais brotamentos axonais e muitas fibras de pequeno diâmetro; nesse segmento, as diferenças entre os grupos foram significantes, sugerindo que o ultra-som alterou a morfologia do nervo, com possíveis reflexos na sua função.

Por outro lado, a avaliação do IFC mostrou que houve melhora funcional mais rápida e acentuada no grupo tratado (2), que evoluiu 73% entre o 7º. e o 21º. dias, enquanto que no grupo controle a evolução foi de 55% no mesmo período, o

que é um dado incontestável no que refere à melhora funcional superior no grupo tratado. Considerando os períodos de avaliação, as diferenças entre os grupos foram significantes somente no 14º e no 21º dias, sugerindo que os possíveis efeitos benéficos do ultra-som sobre a regeneração do nervo ciático necessitam de alguns dias (pelo menos duas semanas) para se fazerem notáveis. Os dados da avaliação do IFC mostraram, assim, estreita correspondência com aqueles da morfometria, que mostrou diferenças significantes entre os grupos somente no período mais tardio.

Demonstrado esse fato, resta saber porque a irradiação ultra-sônica aplicada no local acelera a regeneração do nervo periférico, quando esse processo é dependente principalmente da resposta neuronal, que interessa mais o corpo celular do que o axônio. Pode-se levantar aqui a hipótese de que o ultra-som acelera, na realidade, somente a regeneração axonal, refazendo mais precocemente o tubo neural, de modo que os obstáculos à progressão do novo axoplasma seriam removidos mais precocemente. Também seria válido pensar na possibilidade de que a irradiação ultra-sônica estimularia a liberação de mediadores químicos ou quimiotáticos que estimulariam a produção mais acelerada do axoplasma. Entretanto, esses não passam de questionamentos que poderão ser esclarecidos somente com novas investigações. A contribuição do presente trabalho vem apenas demonstrar que o ultra-som tem influência positiva na regeneração dos nervos periféricos lesados, nas condições em que foi realizado.

5 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho sugerem que a aplicação precoce do ultra-som, com os parâmetros empregados (pulso 1:5, frequência de 1 MHz, intensidade de $0,4 \text{ W/cm}^2$ e duração de 2 minutos), melhora o processo de regeneração nervosa após lesão por esmagamento do nervo ciático de ratos, produzidas pela aplicação de uma carga de 15 Kg por 10 minutos, conforme observado nas avaliações funcional e morfométrica.

ANEXOS

Anexo A – Tabela do valor absoluto de fibras e da densidade de fibras mielínicas encontradas nas porções proximal, média e distal do nervo ciático do grupo controle.

TABELA A - Valor absoluto de fibras e da densidade de fibras mielínicas encontradas nas porções proximal, média e distal do nervo ciático do grupo controle

<i>Rato</i>	<i>Proximal</i>		<i>Média</i>		<i>Distal</i>	
	<i>nº fibras</i>	<i>dens</i>	<i>nº fibras</i>	<i>dens</i>	<i>nº fibras</i>	<i>dens</i>
1	7634	15674	2465	22358	3154	9243
2	14682	39841	5094	36788	3854	6327
3	6037	13501	10777	18249	7441	13979
4	13940	32036	9075	11091	8079	11206
5	7329	16973	4847	13295	7505	13465
6	7644	15887	8037	15030	7274	9699
7	8415	17200	6168	39695	10724	16495
8	6551	19033	3672	20927	2577	11487
9	9637	21267	7379	10930	6000	11050
10	6642	21269	13057	20120	6078	7086
<i>Média</i>	8851,1	21268,1	7057,1	20848,3	6268,6	11003,7
<i>Desv. Pad.</i>	3055,9	8309,8	3283,8	10018,5	2501,3	3115,6
<i>Mediana</i>	7639,0	18116,5	6773,5	19184,5	6676,0	11128,0

Anexo B – Tabela do valor absoluto de fibras e da densidade de fibras mielínicas encontradas nas porções proximal, média e distal do nervo ciático do grupo tratado.

TABELA B - Valor absoluto de fibras e da densidade de fibras mielínicas encontradas nas porções proximal, média e distal do nervo ciático do grupo tratado.

<i>Rato</i>	<i>Proximal</i>		<i>Média</i>		<i>Distal</i>	
	<i>nº fibras</i>	<i>dens</i>	<i>nº fibras</i>	<i>dens</i>	<i>nº fibras</i>	<i>dens</i>
1	6220	15840	9005	18058	6622	10565
2	8229	18403	8704	17157	9239	13751
3	6372	16935	10300	14918	6815	9068
4	6970	17257	6808	14401	6607	13805
5	7465	18202	3907	11960	3542	14063
6	10831	16525	2361	16012	2059	14401
7	9991	16526	5895	16015	5161	11680
8	7316	18214	6979	17966	8315	14406
9	7985	14266	7267	17642	460	24847
10	8367	13096	10626	16015	3238	14066
<i>Média</i>	7974,6	16526,4	7185,2	16014,4	5205,8	14065,2
<i>Desv. Pad.</i>	1483,0	1739,3	2646,5	1891,0	2819,8	4210,5
<i>Mediana</i>	7725,0	16730,5	7123,0	16015,0	5884,0	13934,0

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AZZE, R.J.; MATTAR JR., R. (2000). Lesões dos Nervos Periféricos. In: PARDINI JR., A.G. *Traumatismos da mão* 3rd Ed. Rio de Janeiro, Medsi.

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

BEHSE, F. (1990). Morphometric studies on the human sural nerve. *Acta Neural Scandinavica, Supplementum*, n.132, p.1-38.

BRIDGE, P.M.; BALL, D.J.; MACKINNON, S.E.; NAKAO, Y.; BRANDT, K., HUNTER, D.A.; HERTL, C. (1994). Nerve crush injuries: A model for axonotmesis. *Experimental Neurology*, v.127, p.284-290.

CARLTON, J.M.; GOLDBERG, N.H. (1986). Quantitative integrated muscle function following reinnervation. *Surgical Forum*, v.37, p.611-612.

CURRIER, D.P.; GREATHOUSE, D; SWIFT, T. (1978). Sensory nerve conduction: Effect of ultrasound. *Arch Phys Med Rehabil*, v.59, p.181-185.

DAHLIN, L.B.; RYDEVIK, B. (1991). Pathophysiology of nerve compression. In: GELBERMAN, R. H. *Operate nerve repair and reconstruction*. Philadelphia. J. B. Lippincott Company. v. 2, p.847-863.

De MEDINACELI, L.; FREED, W.J.; WYATT, R.J. (1982). An index of the functional conduction of rat sciatic nerve based on measurements made from walking tracks. *Exp Neurol*, v.77, p.634-643.

De MEDINACELI, L.; DERENZO, E.; WYATT, R.J. (1984). Rat sciatic functional index data management system with digitized input. *Comp Biom Res*, v.17, p.185-192.

DOCKER, M.F. (1987). A review of instrumentation available for therapeutic ultrasound *Physiotherapy*, v.73, n.4, p.154-155.

DYSON, M. (1987). Mechanisms involved in therapeutic ultrasound. *Physiotherapy*, v.73, n.3, p.116-20.

DYSON, M.; POND, J.B.; JOSEPH, J.; WARWICK, R. (1968). The stimulation of tissue regeneration by means of ultrasound. *Clin. Sci.*, v.35, p.273-85.

ENWEMEKA, C.S.; RODRIGUEZ, O.; MENDOSA, S. (1990). The biomechanical effects of low-intensity ultrasound on healing tendons. *Ultrasound in Medicine and Biology*, v.16, n.8, p.801-807.

FARMER, W.C. (1968). Effect of intensity of ultrasound on conduction of motor axons. *Phys Ther*, v.48, p.1233-1237.

FIURINE JR., N.; LONGO, G. J. (1996). *Ultrasom*. Amparo-SP/Relatório técnico KLD-Biosistemas equipamentos eletrônicos LTDA.

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

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

HALLE, JS; SCOVILLE,CR; GREATHOUSE,DG. (1981). Ultrasound's effect on conduction latency of superficial radial nerve in man. *Phys Ther*, v.61, p.345-350.

HARR, G.T. (1987). Basic Physics of Therapeutic Ultrasound. *Physiotherapy*. v.73, n.3, p.110-120.

HARR, G.T. (1998). Princípios Eletrofísicos. In KITCHEN, S ; BAZIN, S. *Eletroterapia de Clayton*. 10nd Ed. São Paulo. Ed Manole. Cap.1, p.3-30.

HARR, G.T. (1999). Therapeutic ultrasound. *European Journal of Ultrasound*. V.9, p.3-9.

HOOGLAND, R. (1986). *Manual de terapia ultrasônica*. ENRAF NONIUS.

HONG, C.Z.; LIU, H.H.; YU J. (1988). Ultrasound thermotherapy effect on the recovery of nerve conduction on experimental compression neuropathy. *Arch Phys Med Rehabil*, v.69, p.410-414.

KITCHEN, S.S.; PARTRIDGE, C.J. (1990). A review of therapeutic ultrasound. *Physiotherapy*, v.76, n.10, p.593-699.

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*, v.24, p.279-281.

MADSEN, PW; GERSTEN, JW. (1961). The effect of ultrasound on conduction velocity of peripheral nerve. *Arch Phys Med Rehabi.*, v.42, p.645-649.

MAXWELL, L. (1992). Therapeutic ultrasound: its effects on the cellular and molecular mechanisms of inflammation and repair. *Physiotherapy*, v.78, n.6, p.421-426.

McDIARMID, D.T.; BURNS, P.N. (1987). Clinical application of therapeutic ultrasound. *Physiotherapy*, v.73, n.4, p.155-162.

MENDONÇA, A.C. (2000). *Estudo da regeneração do nervo ciático de rato submetido a estimulação elétrica após lesão por esmagamento*. Ribeirão Preto. 68p
Dissertação (Mestrado)-Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.Universidade de São Paulo.

MENEZES, D.F.; VOLPON, J.B.; SHIMANO, A.C. (1999). Aplicações de ultra-som terapêutico em lesão muscular experimental aguda. *Rev. Bras. Fisiot*, v.4, n.1, p.27-31.

MIRA, J.C. (1979). Quantitative studies of the regeneration of rat myelinated nerve fibers: variations in the number and size of regenerating fibres after repeated localized frezings. *J. Anat.*, v.129, n.1, p.77-93.

MOORE, J.H.; GIECK, J.H.; SALIBA, E.N.; PERRIN, D.H.; BALL,D.W.; McCUE, F.C. (2000). The biophysical effects of ultrasound on median nerve distal latencies. *Electromyogr Clin Neurophysiol*, v.40, n.3, p.169-180.

MOURAD, P.D; LAZAR, D.A; CURRA, F.P; MOHR, B.C; ANDRUS,K.C; AVELINO, A.M; McNUTT, L.D; CRUM, L.A; KLIOT, M. (2001). Ultrasound accelerates functional recovery after peripheral nerve damage. *Neurosurgery*, v.48, n.5, p.1136-1140.

OGARD, W.K; STOCKERT, B.W. (1994). Neuropatias Periféricas. In: UMPHRED, D.A. *Fisioterapia neurológica*. 2nd Ed. São Paulo, Manole. Cap.12, p.331-344.

OLIVEIRA, E.F.; MAZZER, N.; BARBIERI, C.H.; SELLI, M. (2001). Correlation between functional index and morphometry to evaluate recovery of the rat sciatic nerve following crush injury: experimental study. *Journal of reconstructive Microsurgery*, v.17, n.1, p.69-75.

RAMIREZ. A.; SCHWANE, J.A.; McFARLAND, C.; STARCHER, B. (1997). The effect of ultrasound on collagen synthesis and fibroblast proliferation in vitro. *Medicine and Science in Sports exercise*, v.29, n.3. p.326-332, Mar.

ROBERTS, M.; RUTHERFORD, J.H.; HARRIS, D. (1982). The effect of ultrasound on flexor tendon repairs in the rabbit. *The Hand*, v.14, n°1, p.17-20.

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

SPENCE, A.P. (1991). *Anatomia humana Básica*. São Paulo, Manole. Cap.15, p.419-443. Sistema Nervoso Periférico.

SUNDERLAND, S. (1985). *Nerve and Nerve Injure*. 2nd Ed. Churchill Livingstone, London (Clássico)

YOUNG, S. (1998). Terapia por ultra-som. In: KITCHEN, S., BAZIN, S. *Eletroterapia de Clayton*. 10nd Ed. São Paulo. Ed Manole. Cap.15, p. 235-258.

YOUNG, S.R.; DYSON, M. (1990). Effect of therapeutic ultrasound on the healing of full. *Ultrasonics*, v.28, p.175-180.

ZANKEL, H.T. (1966). Effect of physical agents on motor conduction velocity of the ulnar nerve. *Arch Phys Med Rehabil.*, v.49, p.787-792.