

ESCOLA DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE
CLÍNICA CIRÚRGICA

TATIANA PITÁGORAS

**O EMPREGO DA ELETROESTIMULAÇÃO ASSOCIADA À TÉCNICA DE
TUBULIZAÇÃO NA REGENERAÇÃO DO NERVO CIÁTICO DE RATOS WISTAR APÓS
TRANSECÇÃO SEM PERDA DE SUBSTÂNCIA**

Porto Alegre

2018

PÓS-GRADUAÇÃO - *STRICTO SENSU*



Pontifícia Universidade Católica
do Rio Grande do Sul

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO
SUL
ESCOLA DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E CIÊNCIAS
DA SAÚDE
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: CLÍNICA CIRÚRGICA**

TATIANA PITÁGORAS

**O EMPREGO DA ELETROESTIMULAÇÃO ASSOCIADA À TÉCNICA DE
TUBULIZAÇÃO NA REGENERAÇÃO DO NERVO CIÁTICO DE RATOS WISTAR
APÓS TRANSECÇÃO SEM PERDA DE SUBSTÂNCIA**

ORIENTADOR: PROF. DR. JEFFERSON BRAGA SILVA

**PORTO ALEGRE
2018**

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA
SAÚDE
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: CLÍNICA CIRÚRGICA

TATIANA PITÁGORAS

O EMPREGO DA ELETROESTIMULAÇÃO ASSOCIADA À TÉCNICA DE
TUBULIZAÇÃO NA REGENERAÇÃO DO NERVO CIÁTICO DE RATOS WISTAR
APÓS TRANSECÇÃO SEM PERDA DE SUBSTÂNCIA

PORTO ALEGRE
2018

Ficha Catalográfica

P692e Pitágoras, Tatiana Zotti

O emprego da eletroestimulação associada à técnica de tubulização na regeneração do nervo ciático de ratos Wistar após transecção sem perda de substância / Tatiana Zotti Pitágoras . – 2018.

110 p.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde, PUCRS.

Orientador: Prof. Dr. Jefferson Luís Braga da Silva.

Co-orientador: Prof. Dr. Eduardo Goldani.

Co-orientador: Prof. Dr. Luiz Eduardo Schardong Spalding.

1. eletroestimulação. 2. regeneração. 3. lesão de nervos periféricos. 4. tubulização. I. Silva, Jefferson Luís Braga da. II. Goldani, Eduardo. III. Título.

TATIANA PITÁGORAS

“O EMPREGO DA ELETROESTIMULAÇÃO ASSOCIADA À TÉCNICA DE
TUBULIZAÇÃO NA REGENERAÇÃO DO NERVO CIÁTICO DE RATOS WISTAR
APÓS TRANSECÇÃO SEM PERDA DE SUBSTÂNCIA”

Dissertação apresentada como requisito parcial para a
obtenção do grau de mestre em Medicina pelo Programa
de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde da
Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
(PUCRS).

Orientador: Prof. Dr. Jefferson Braga Silva
Orientador externo: Prof. Dr. Luiz Eduardo S. Spalding
Co-orientador: Prof. Dr. Eduardo Goldani

PORTO ALEGRE

2018

Dedico esta dissertação ao meu amado marido, João Fernando, e à minha filha, Maria Fernanda, pelo apoio. Foram suas palavras e suas atitudes que me fortaleceram. Se cheguei até aqui, foi porque estiveram comigo! Obrigada pelo amor incondicional! Não existem palavras que possam descrever minha gratidão. AMO VOCÊS!!!!

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Jefferson Braga Silva pela orientação e acolhida em seu laboratório.

À Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde, pela oportunidade de realizar o curso de Mestrado e pela infra-estrutura disponibilizada.

Aos alunos da Escola de Medicina da PUCRS, Fábio Hermann, Gustavo Guthmann Pesenatto, que auxiliaram nos procedimentos cirúrgicos, sem a participação de vocês, esse projeto certamente não teria chegado ao fim.

A toda equipe do Laboratório de Habilidades Médicas e Pesquisa Cirúrgica da PUCRS. Aos funcionários Bernardo e Thaine, pela cooperação e prestatividade durante a execução deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Luiz Eduardo Spalding pela orientação externa por dividir seus conhecimentos de física, matemática e eletricidade, pela grande ajuda, apoio, compreensão e amizade durante todo o trabalho.

Ao Dr. Wagnes Franceschi e ao Prof. Dr. Hugo Lisboa como incentivadores.

Ao Prof. Dr. Eduardo Goldani pela co-orientação, pela grande ajuda, pelos seus conhecimentos, disponibilidade, apoio, compreensão e amizade durante todo o trabalho. Sem sua ajuda não seria possível a conclusão desta pesquisa.

Ao meu marido João e à minha filha Maria Fernanda, meus maiores incentivadores, pelo grande apoio, amor e carinho. Por me ensinarem a lutar e persistir mesmo nas dificuldades e, principalmente, pela paciência em me aconselhar durante todo este período. Em especial à minha filha que, do alto de seus cinco anos de idade, compreendeu minha ausência e necessidade em me dedicar à pesquisa.

Aos meus pais Aderbal Oliveira Pitágoras (in memoriam) e Carmen Maria Zotti Pitágoras, que sempre me incentivaram a estudar dando o apoio necessário.

Ao Prof. Dr. Mário Bernardes Wagner por sua colaboração com a análise dos dados.

A toda equipe do INTOX e do CeMBE.

À Professora Dra. Maria Martha, pelas contribuições ao projeto.

Ao Prof. Pedro Chagastelles, pelas contribuições para a concretização do projeto.

Ao Professor Dr. Fábio Luiz DalMoro Maito, do laboratório de patologia da Odontologia, que auxiliou na orientação e confecção das lâminas.

À Janaína Pasetti Nunes, do Laboratório de patologia da Odontologia que auxiliou na confecção das lâminas.

À minha querida colega e amiga patologista Simone Márcia dos Santos Machado que me aconselhou e me acolheu.

Ao Biólogo Tiago Lopes que auxiliou na confecção das lâminas e análise histológica.

A todos os familiares e amigos que, de alguma forma, colaboraram para mais esta conquista em minha vida.

A Deus pela força de persistir mesmo com tantos obstáculos e dificuldades.

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

Albert Einstein

SUMÁRIO

RESUMO	XVI
ABSTRACT	XVII
1. INTRODUÇÃO	18
2. REFERENCIAL TEÓRICO	19
2.1. Fisiologia dos nervos periféricos	19
2.2. Classificação das lesões de nervos periféricos	25
2.3. Lesões e reparo de nervos periféricos	29
2.4. Eletroestimulação	35
2.4.1. Eletroestimulador	35
2.4.2. Silicone	41
2.4.3. Metais condutores	44
2.4.4. Estanho	44
2.4.5. Cobre	45
3. JUSTIFICATIVA	46
4. OBJETIVO GERAL	46
4.1. Objetivos específicos	47
5. MATERIAS E MÉTODOS	47
5.1. Delineamento experimental	47
5.2. Cálculo do tamanho da amostra	48
5.3. Animais	48
5.4. Modelo experimental	49
5.5. Grupos de experimentação	50
5.6. Protocolo anestésico	59
5.7. Procedimentos cirúrgicos	59
5.8. Avaliação da recuperação da lesão	62
5.9. Eutanásia	65
5.10. Análise macroscópica	65
5.11. Análise estatística	70
5.12. Aspectos bioéticos	70
6. RESULTADOS	70
6.1. Análise funcional por Teste de Marcha	71

6.2. Análise morfométrica	73
6.2.1. Número de células	73
6.2.2. Área do nervo	75
7. DISCUSSÃO	78
8. CONCLUSÃO	80
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82

LISTA DE ABREVIATURAS

DC – Corrente contínua (do inglês, direct chain)

DDP – Diferença de potencial

EE – Eletroestimulação

EPL – Impressão comprimento pegada experimental (do inglês, Experimental Print Length)

ETS – Abertura dos dedos lado experimental (do inglês, Experimental Toe Spread)

EIT – Dedos intermediários lado experimental (do inglês, Experimental Intermediate Toe)

IP – Intra peritoneal

MEC – Matriz extra-celular

NIT – Dedos intermediários lado normal (do inglês, Normal Intermediate Toe)

NPL – Impressão comprimento da pegada normal (do inglês, Normal Print Length)

NTS – Abertura dos dedos lado normal (do inglês, Normal Toe Spread)

SFI – Índice funcional do ciático (do inglês, Sciatic Functional Índice)

SNC – Sistema nervosa central

SNP- Sistema nervosa periférico

SC – Células se Schwann (do inglês, Schwann Cells)

ST – Sutura e tubo

SUT – Sutura simples (padrão ouro)

LISTA DE SIGLAS

Hz- Hertz

V – Volts

mA – Miliampére

mm – Milímetros

ml – Mililitros

mg – Miligramas

μm^2 – Micrômetro quadrado

cm - Centímetro

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1. Potencial de ação.....	20
FIGURA 2. Via aferente e via eferente.....	21
FIGURA 3. Componentes dos nervos periféricos.....	22
FIGURA 4. Fibra mielínica e amielínica.....	23
FIGURA 5. Condução do estímulo nervoso.....	23
FIGURA 6. Estrutura da fibra nervosa.....	24
FIGURA 7. Vascularização dos nervos periféricos.....	25
FIGURA 8. Classificação dos nervos periféricos por Sunderland.....	28
FIGURA 9. Classificação dos nervos periféricos por Mackinnon.....	29
FIGURA 10. Processo de degeneração e regeneração dos nervos periféricos.....	30
FIGURA 11. Referencial teórico à esquerda, neurônio normal, à direita reação do corpo celular (cromatólise).....	32
FIGURA 12. Degeneração Walleriana.....	33
FIGURA 13. Captação dos dados durante os testes para desenvolvimento do eletroestimulador.....	36
FIGURA 14. Experimento realizado no nervo ciático do frango.....	37
FIGURA 15. Experimento demonstrando traçado da corrente elétrica em um computador.....	37
FIGURA 16. Experimento com gerador de Van De Graaff.....	38
FIGURA 17. Materiais empregados no experimento com o gerador de Va De Graaff.....	39
FIGURA 18. Alinhamento dos fios após aplicação do campo elétrico.....	40
FIGURA 19. Eletroestimulador desenvolvido para a pesquisa.....	41
FIGURA 20. Marcação do tubo antes de cortar, medindo um centímetro de comprimento.....	42
FIGURA 21. Passagem do fio de cobre revestido de estanho em formato de alça no interior do tubo.....	43

FIGURA 22. Tubo para eletroestimulação demonstrando local da solda e ao lado, o local da solda protegido com outro tubo de silicone.....	45
FIGURA 23. Centro de Modelos Biológicos Experimentais (CeMBE – PUCRS)....	49
FIGURA 24. Defeito criado no nervo ciático do rato.....	50
FIGURA 25. Organograma do grupo da eletroestimulação (EE).....	51
FIGURA 26. Organograma do grupo em que foi realizada sutura tubulização.....	51
FIGURA 27. Organograma do grupo em que foi realizada sutura padrão.....	52
FIGURA 28. Instalação do tubo com EE. Fio de cobre estanhado (A), solda de estanho (B), fios de cobre esmaltados (C), curativo externamente na pele (D).....	53
FIGURA 29. Tubo de eletroestimulação no nervo.....	54
FIGURA 30. Eletroestimulador instalado.....	55
FIGURA 31. Grupo Eletroestimulação (EE) – ratos na bancada recebendo EE no pós-operatório imediato.....	56
FIGURA 32. Grupo Sutura e tubulização (ST) – após criação do defeito, aproximação dos cotos com tubo de silicone.....	57
FIGURA 33. Sutura epineural (padrão ouro).....	58
FIGURA 34. Exemplo de sutura epineural grupo sutura padrão (SUT).....	58
FIGURA 35. Local de injeção do anestésico.....	59
FIGURA 36. Marcação de pele para posterior incisão.....	60
FIGURA 37. Ponto de aproximação dos cotos do nervo utilizado para as duas técnicas.....	61
FIGURA 38. Medida das patas de um rato: Pata normal (esquerda) e pata lesada (direita).....	63
FIGURA 39. Passarela do teste de marcha.....	64
FIGURA 40. Grupo ST (tubo de silicone sem eletroestimulação). Nervos após ressecção, preparados e fixados ao papel em sua região proximal.....	65
FIGURA 41. Soltura do nervo dentro do tubo.....	66
FIGURA 42. Grupo EE. Nervos após terem sido ressecados, fixados em formol, podem ser observada a presença de possível regenerado.....	66

FIGURA 43. Peça fixada em formol, grupo SUT. Secção transversal no meio do nervo para envio ao emblocamento e preparação da peça para análise histológica....	67
FIGURA 44. Corte transversal do nervo, demonstrando a distribuição heterogênea tanto da localização, quanto o tamanho do diâmetro das fibras.....	68
FIGURA 45. Imagem capturada de tela com aumento de 200 vezes.....	69
FIGURA 46. Imagem capturada de tela com aumento de 200 vezes.....	69
FIGURA 47. Gráfico do Índice de Função Ciática (SFI).....	72
FIGURA 48. Gráfico da área do nervo.....	75
FIGURA 49. Gráfico do número de células de Schwann.....	78

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Classificações de Seddon e Sunderland de lesões nervosas (Adaptado de SUNDERLAND et al, 1951).....	26
TABELA 2. Dados do eletroestimulador.....	41
TABELA 3. Média (\pm desvio padrão) do Índice de função ciática (SFI) para entre os grupos EE, ST e SUT em três, seis e nove semanas de pós-operatório.....	71
TABELA 4. Média (\pm desvio padrão) do SFI dentro do mesmo grupo em diferentes períodos de tempo, três, seis e nove semanas de pós-operatório.....	72
TABELA 5. Valor médio da área (μm^2) no grupo EE com três, seis e nove semanas.....	73
TABELA 6. Valor médio da área (μm^2) no grupo EE com três, seis e nove semanas.....	73
TABELA 7. Valor médio da área (μm^2) para comparação no grupo SUT com três, seis e nove semanas.....	74
TABELA 8. Área (μm^2) para comparação entre os grupos EE, ST e SUT em três, seis e nove semanas de pós-operatório.....	74
TABELA 9. Valor médio número de células de Schwann para comparação no grupo EE com três, seis e nove semanas.....	75
TABELA 10. Valor médio número de células de Schwann no grupo ST com três, seis e nove semanas.....	76
TABELA 11. Valor médio número de células de Schwann no grupo SUT com três, seis e nove semanas.....	76
TABELA 12. Valor médio número de células de Schwann entre os grupos com três semanas.....	76
TABELA 13. Valor médio número de células de Schwann entre os grupos com seis semanas.....	77
TABELA 14. Valor médio número de células de Schwann entre os grupos com nove semanas.....	77

LISTA DE ANEXOS

ANEXO A – CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA PARA USO DOS ANIMAIS.....	92
ANEXO B – CARTA DE APROVAÇÃO DA DISSERTAÇÃO APÓS AVALIAÇÃO.....	93
ANEXO C – CARTA DE SUBMISSÃO DO ARTIGO CIENTÍFICO EM REVISTA.....	94
ANEXO A – ARTIGO CIENTÍFICO ORIGINAL ENVIADO A REVISTA CIENTÍFICA.....	95

RESUMO

Introdução: Traumatismos por transecção de nervo periférico são comuns e ocorrem, frequentemente, na prática clínica, sendo responsáveis por problemas graves como dor, perda de sensibilidade e motricidade, além de sequelas permanentes. Grandes avanços foram obtidos no tratamento das lesões dos nervos periféricos, devido ao maior conhecimento sobre sua fisiologia e ao desenvolvimento de técnicas como a microcirurgia. Os resultados da estimulação elétrica são encorajadores e sugerem seu uso como alternativa de tratamento. **Objetivo:** Avaliar, *in vivo*, o uso da eletroestimulação (EE) associada à técnica de tubulização sobre o reparo de lesão de nervo ciático, em ratos Wistar. **Materiais e métodos:** Noventa ratos isogênicos da raça Wistar, machos, adultos, pesando entre 200 e 300 gramas de massa corporal, foram divididos em três grupos de 30 ratos (eletroestimulação associada à técnica de tubulização (EE), sutura com tubulização (ST) e sutura padrão (SUT)). Os três grupos foram ainda subdivididos em três grupos com 10 animais, de acordo com o tempo de avaliação (três, seis e nove semanas de pós-operatório). A regeneração foi avaliada através da análise da marcha e análise histológica, em que houve a determinação da área e do número de células de Schwann nas amostras de nervo. **Resultados:** Na avaliação funcional, o grupo que recebeu somente uma EE com 20 Hz e 3V por uma hora apresentou um resultado superior se comparado com os estimulados mais de uma vez. Entretanto, ao se comparar os três diferentes tipos de tratamento ao final das nove semanas, os ratos com sutura padrão apresentaram resultados melhores. Com relação ao número de células, não foi encontrado resultado estatisticamente significativo em nenhum dos grupos. Em relação aos achados relacionados à área do nervo, naqueles submetidos à EE com três semanas, quando comparados aos outros grupos no mesmo período, houve significância, sendo que na comparação dentro do mesmo grupo, aqueles com sutura e tubo com seis semanas, obtiveram um nervo regenerado com área maior.

Palavras chaves: Eletroestimulação, regeneração, lesão nervos periféricos e tubulização.

ABSTRACT

Introduction: Peripheral nerve transection injuries are common and occur frequently in clinical practice and are responsible for serious problems such as pain, loss of sensibility and motor, and permanent sequelae. Great advances were obtained in the treatment of peripheral nerve lesions due to greater knowledge about their physiology and the development of techniques such as microsurgery. The results of electrical stimulation are encouraging and suggest its use as an alternative treatment. **Objective:** To evaluate, in vivo, the use of electrostimulation (EE) associated with the tubulization technique on the repair of sciatic nerve injury in Wistar rats. **Materials and Methods:** Ninety male Wistar isogenic rats weighing between 200 and 300 grams were divided into three groups of 30 rats (electrostimulation associated with the tubing technique (EE), tubing suture (ST) and suture(SUT), which were subdivided into three other groups with ten animals according to the evaluation time, with three, six and nine weeks postoperative. Regeneration was assessed by 'walking track' analysis and histological analysis in which determination of the area and number of Schwann cells in the nerve samples. **Results:** In the functional evaluation, the group that received only one EE with 20 Hz, 3 V for one hour presented a superior result, statistically significant when compared to those stimulated more than once, however when comparing the three different types of treatment at the end of the nine weeks there was statistically significant superiority in the treated with standard suture. Regarding the number of cells, no statistically significant result was found in either group. The findings related to the nerve area, in those submitted to EE at three weeks, when compared to the other groups in the same period, were significant, and in the comparison within the same group, those with suture and tube at six weeks obtained a regenerated nerve with area in a statistically significant way.

Keywords: Electro stimulation, regeneration, peripheral nerve injury and tubulization.

1. INTRODUÇÃO

Traumatismos por transecção de nervo periférico são comuns e ocorrem frequentemente na prática clínica, sendo responsáveis por problemas graves como dor, morbidade, perda de sensibilidade e motricidade, além de outras sequelas, muitas vezes permanentes. Dentre os danos que diminuem de maneira substancial a qualidade de vida de pessoas que por eles são acometidas, estão incluídas a incapacitação física e a perda total ou parcial de suas atividades produtivas. Ocasionalmente, assim, importantes consequências socioeconômicas, como o aumento nas despesas da saúde pública e previdenciária além da incapacitação para exercer suas atividades profissionais (NOBLE *et al.*, 1998; RODRIGUEZ *et al.*, 2004; CHALFOUN *et al.*, 2006; SEBBEN *et al.*, 2011). As técnicas microcirúrgicas refinadas, uma melhor compreensão da fisiopatologia, bem como das bases moleculares da lesão nervosa conduziram a um salto decisivo no campo da neurofisiologia translacional. O reparo do nervo, o enxerto de nervo e a transposição de nervos melhoraram significativamente os resultados funcionais dessas lesões (PANAGOPOULOS *et al.*, 2017).

Atualmente, os procedimentos cirúrgicos mais empregados nos centros de tratamento das lesões dos nervos periféricos são a neurólise, a sutura direta e o enxerto de nervo (nos casos de perda segmentar). No entanto, esses métodos de padrão-ouro para a restauração de tecidos são frequentemente limitados pela falta de disponibilidade de tecido, risco de disseminação da doença, deformidades secundárias e possíveis diferenças na estrutura e no tamanho do tecido (EVANS *et al.*, 2000). Uma técnica que vem sendo vastamente empregada e estudada é a tubulização que pode ser utilizada de diferentes formas, para pequenas e grandes perdas de segmento do nervo periférico quando a extensão da lesão impossibilita a simples reunião dos cotos. O tubo de silicone é usado para a regeneração nervosa obtendo recuperação motora e sensitiva (DAZA *et al.*, 1993; LUNDBORG *et al.*, 1997). Essa técnica é um procedimento cirúrgico em que os cotos nervosos seccionados são introduzidos e fixados dentro de uma prótese tubular objetivando propiciar um ambiente favorável à regeneração. Proporciona, ainda, o direcionamento do crescimento nervoso das extremidades rompidas ou seccionadas, protegendo as fibras nervosas do tecido cicatricial e evitando a formação de neuroma. A tubulização apresenta outra característica interessante: ela pode ser otimizada com acréscimo de fatores regenerativos (SEBBEN *et al.*, 2011). Os condutos também podem ser de materiais biodegradáveis. Quando combinados com biomateriais, seus efeitos se tornam potencializados,

podendo ser incorporados durante a fabricação de tubos sintéticos absorvíveis ou liberados através de minibombas de infusão (DELLON *et al.*, 1988; GORDON E FU, 1997).

Outra técnica que vem sendo pesquisada para tentar melhorar os resultados relacionados à regeneração nervosa é a electroestimulação (EE). O efeito positivo da EE a curto prazo, é mediado através do corpo celular, implicando em um crescimento aprimorado. A eficácia de uma estimulação elétrica de baixa frequência de curto prazo, sugere uma nova abordagem terapêutica para acelerar a regeneração nervosa após a lesão e, por sua vez, melhorar a recuperação funcional (AL-MAJED *et al.*, 2000, IIBRAHIM *et al.*, 2012).

Todos os estudos têm como objetivo trazer melhorias nas taxas de regeneração nervosa, na tentativa de minimizar mudanças na desnervação e melhorar a recuperação funcional (GORDON *et al.*, 2015).

Este estudo teve como objetivo avaliar a existência de alguma vantagem em realizar o tratamento combinado de eletroestimulação proximal e distal, associada à técnica de tubulização, na velocidade e qualidade de regeneração axonal, quando comparado com o uso de sutura e tubulização e com a sutura microcirúrgica direta (padrão ouro).

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Fisiologia do sistema nervoso periférico

O sistema nervoso periférico (SNP) está localizado fora do sistema nervoso central (SNC) e inclui os nervos cranianos, que nascem no encéfalo; os nervos espinhas, que nascem na medula espinhal e os gânglios associados a eles. Os nervos periféricos são estruturas funcionais responsáveis pela união do sistema nervoso central (SNC) com os órgãos efetores, constituídos pela união de fibras nervosas motoras, sensitivas e autonômicas envoltas por tecido conjuntivo ou de sustentação (MACHADO *et al.*, 1998; MURRAY *et al.*, 2005). Esta estrutura é capaz de propagar o potencial de ação através da sua extensão, por meio de um complexo conjunto de canais iônicos de membrana (MURRAY *et al.*, 2005) (Figura 1).

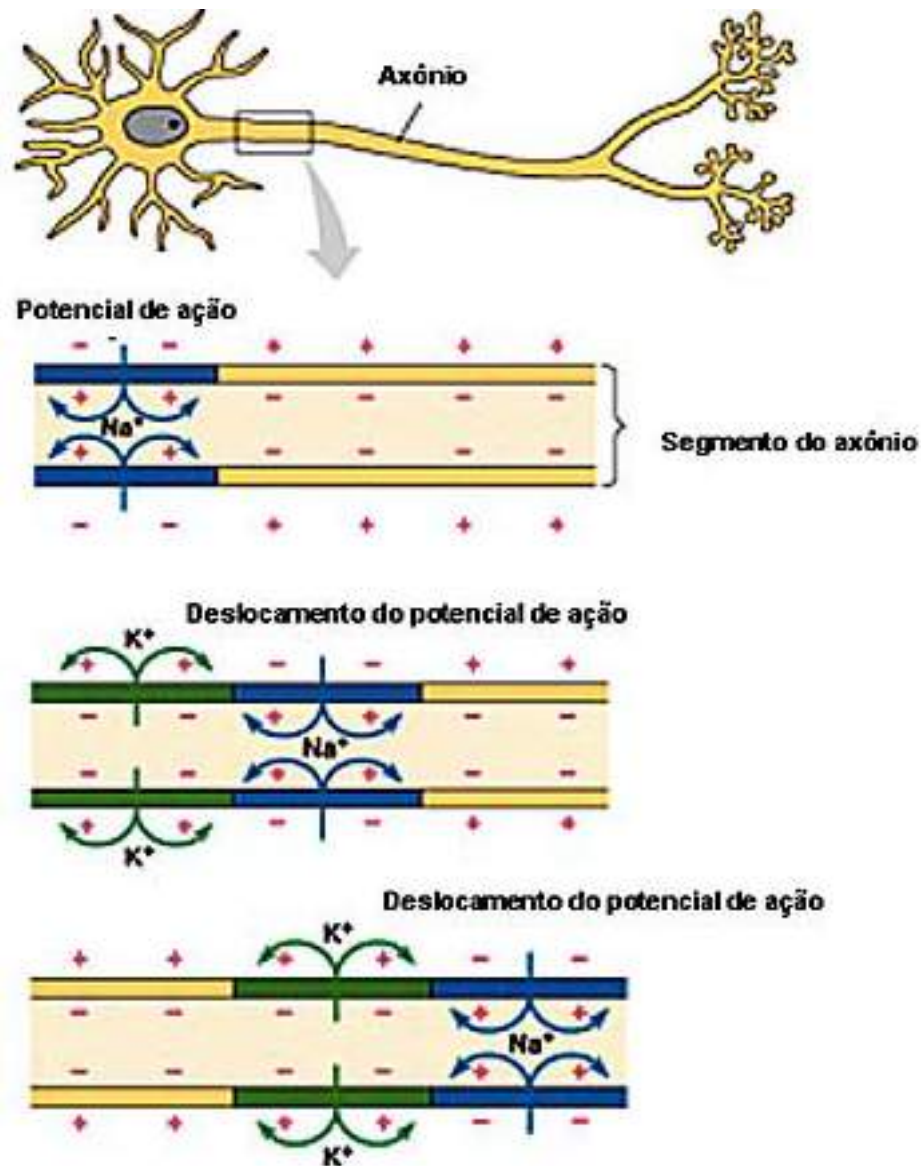


FIGURA 1. Potencial de ação.

Fonte: <http://www.sobiologia.com.br/figuras/Fisiologiaanimal/nervoso11.jpg/>. Acesso em 22 fev 2018.

As informações sensitivas são transmitidas da periferia para o SNC (via aferente), e os sinais motores percorrem o sentido contrário (via eferente) (MACHADO *et al.*, 1998) (Figura 2).

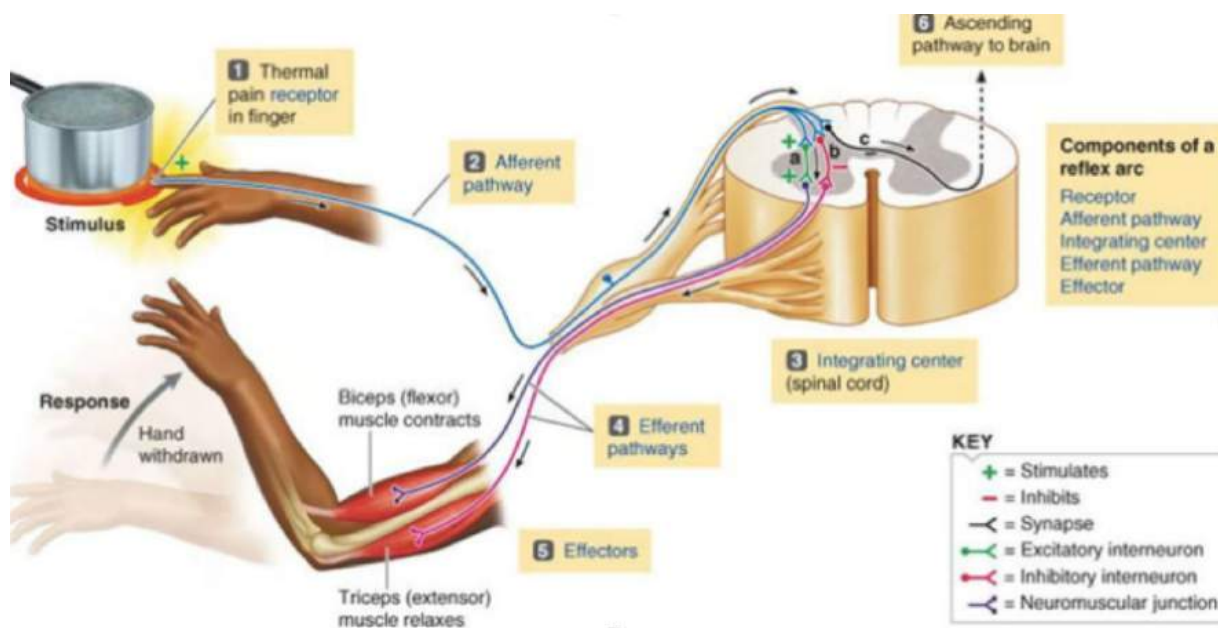


FIGURA 2. 1) O estímulo doloroso do calor ativa o termoreceptor no dedo. 2) os potenciais de ação são gerados na via aferente, que propaga impulsos para a medula espinal. 3) A medula espinal serve como centro de integração. Aqui, o neurônio aferente estimula: a) os interneurônios excitatórios, que estimulam os neurônios motores até o bíceps. b) interneurônios inibitórios, que inibem os neurônios motores no tríceps. c) interneurônios que fazem parte do caminho ascendente para o cérebro. 4) uma via eferente estimula o bíceps a contrair - se. Outra via eferente leva ao relaxamento do tríceps, evitando a excitação e contração desse músculo antagonista. 5) os bíceps e tríceps são efetores. A flexão resultante da articulação do cotovelo puxa a mão para longe do estímulo doloroso. Essa resposta completa o reflexo de retirada. 6) os eventos que ocorrem no cérebro após a chegada do sinal via ascendente, como consciência de dor, armazenamento de memória e assim por diante, estão acima e além do arco reflexo.

Fonte: LEE Y.N. Anatomy and Physiology CNS PNS reflex arc. Dynamic Views Theme, 2012. Powered by blogger. Posted 30th august 2015. Acesso em 20 jan 2018.

Os nervos periféricos são constituídos por três componentes principais, os axônios, as células de Schwann e o tecido conjuntivo (Figura 3). As SCs possuem a importante função de formar a bainha de mielina em torno dos axônios, permitindo que estes tenham isolamento elétrico e proporcionando uma condução do impulso.



FIGURA 3. Componentes dos nervos periféricos.

Fonte: Adaptado de http://beyondhedish.files.wordpress.com/2015/12/myelin_sheath.jpg

Dentre os vários tipos celulares, as células de Schwann (SC) são as principais constituintes do SNP. Essas células migram da crista neural e apresentam como principal função a mielinização dos axônios de forma mais rápida (TATAGIBA *et al.*, 2003; MACKINNON *et al.*, 2006).

O axônio é uma extensão longa e delgada do corpo celular, capaz de transportar informações químicas e elétricas a longas distâncias. As SC estão separadas entre si, ao longo dos axônios, por intervalos destituídos de mielina e parcialmente cobertos por digitações laterais do seu citoplasma. Tais espaços são denominados Nodos de Ranvier (Peters *et al.*, 1976). Segundo sua relação com célula de Schwann, os axônios podem ser classificados de mielínicos e amielínicos. Os axônios mielínicos são recobertos pela bainha de mielina e possuem diâmetro de 2 a 24 milimicra, e axônios destituídos dessa bainha de mielina, são chamados de amielínicos, e possuem um menor diâmetro (de 0,2 a 3,0 milimicra), sendo que sua espessura é proporcional a sua velocidade de condução. Os axônios não-mielinizados estabelecem ligações com as SC por meio de projeções citoplasmáticas que os envolvem total ou parcialmente, sendo agrupados em números que variam de 5 a 25 axônios. Nessa associação com as SC não há bainha de mielina (ALSHADWI *et al.*, 2016, GARTNER *et al.*, 2006; LANDON *et al.*, 1976) (Figura 4).

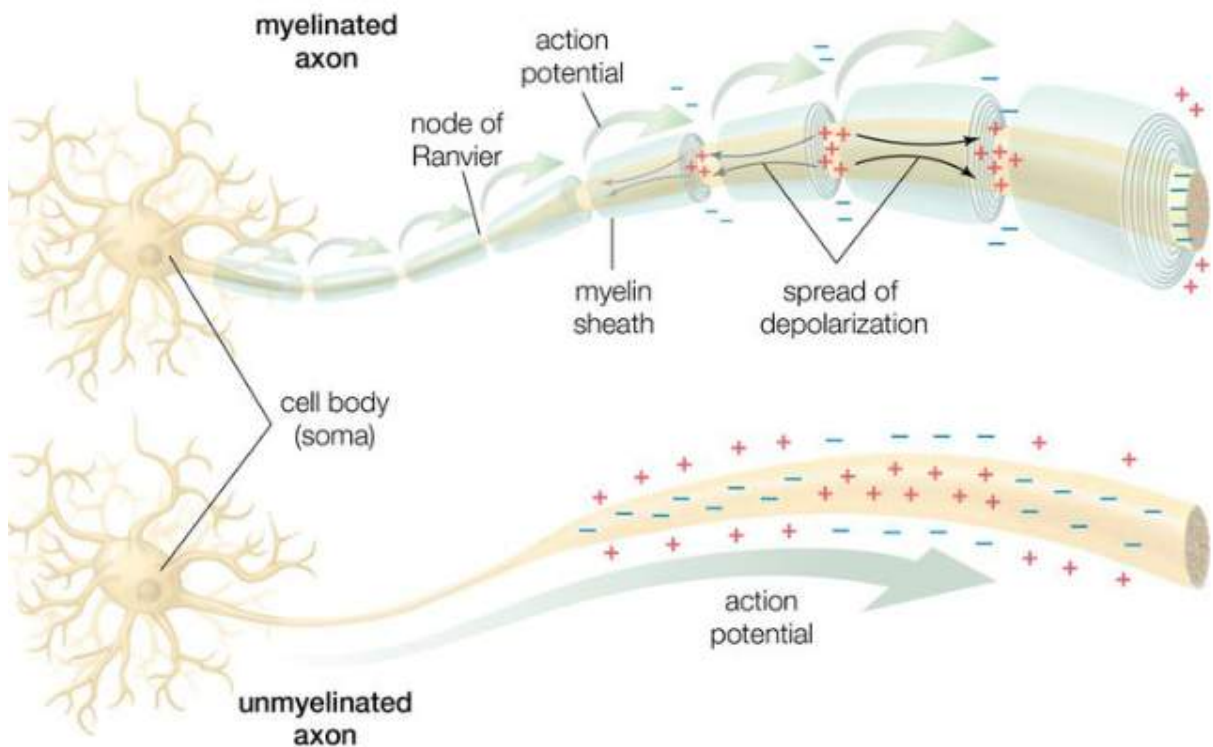


FIGURA 4. Fibra Mielínica e fibra amielínica.

Fonte: The conduction of the action potential across a myelinated and na unmyelinated axon. Encyclopaedia Britannica/UIG/Getty Images. Acesso em 21 fev 2018.

A principal diferença entre o axônio mielinizado e o amielínico é a velocidade de condução do estímulo. A fibra mielínica conduz o estímulo de maneira saltatória, ou seja, mais rápido e a amielínica de maneira linear, portanto mais lento (Figura 5).

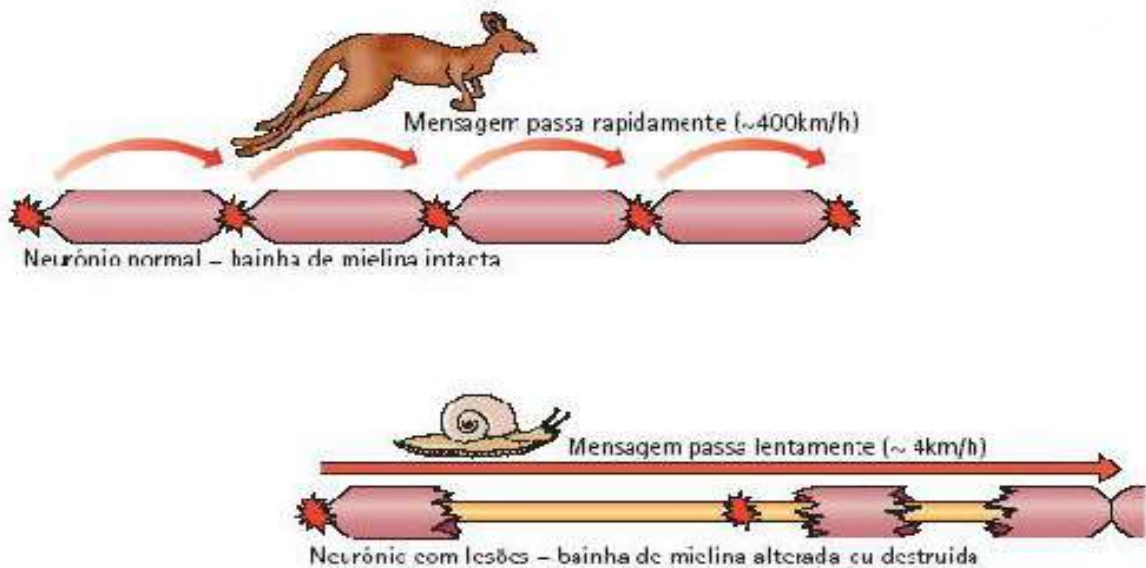


FIGURA 5. Condução do estímulo nervo em diferentes fibras.

Fonte: DORETTO, et al., 1996.

O axônio e a bainha de mielina formam a fibra nervosa e são circundadas por três camadas de tecido conjuntivo. A camada mais externa, formada por tecido conjuntivo colagenoso denso, não-modelado, é denominada como epineuro e possui vasos, fibroblastos e fibras de colágeno tipo I. Ela reveste o nervo periférico como um todo, protegendo os fascículos de traumas externos. A camada média, o perineuro, apresenta células pavimentosas dispostas em camadas concêntricas em relação às fibras nervosas, podendo ser observada a presença de fibras de colágeno tipo I e III. O perineuro cobre individualmente cada feixe de fibra nervosa (fascículos) e é essencial na manutenção da homeostase do nervo, atuando como uma barreira seletiva ao trânsito de substâncias com alto peso molecular. Ele possui função de preservar o microambiente endoneural. A camada mais interna de tecido conjuntivo, que reveste individualmente cada fibra nervosa (axônios), é denominada endoneuro, sendo composta por fibras de colágeno tipo III, dispostas longitudinalmente em relação à fibra nervosa. No endoneuro é possível encontrar células residentes como macrófagos, fibroblastos, capilares, células de Schwann e os nodos de Ranvier, que regulam o microambiente da fibra nervosa e, eventualmente, mastócitos (LUNDBORG *et al.*, 1993; O'DONOVAN *et al.*, 1983; PETERS *et al.*, 1976;). (Figura 6).

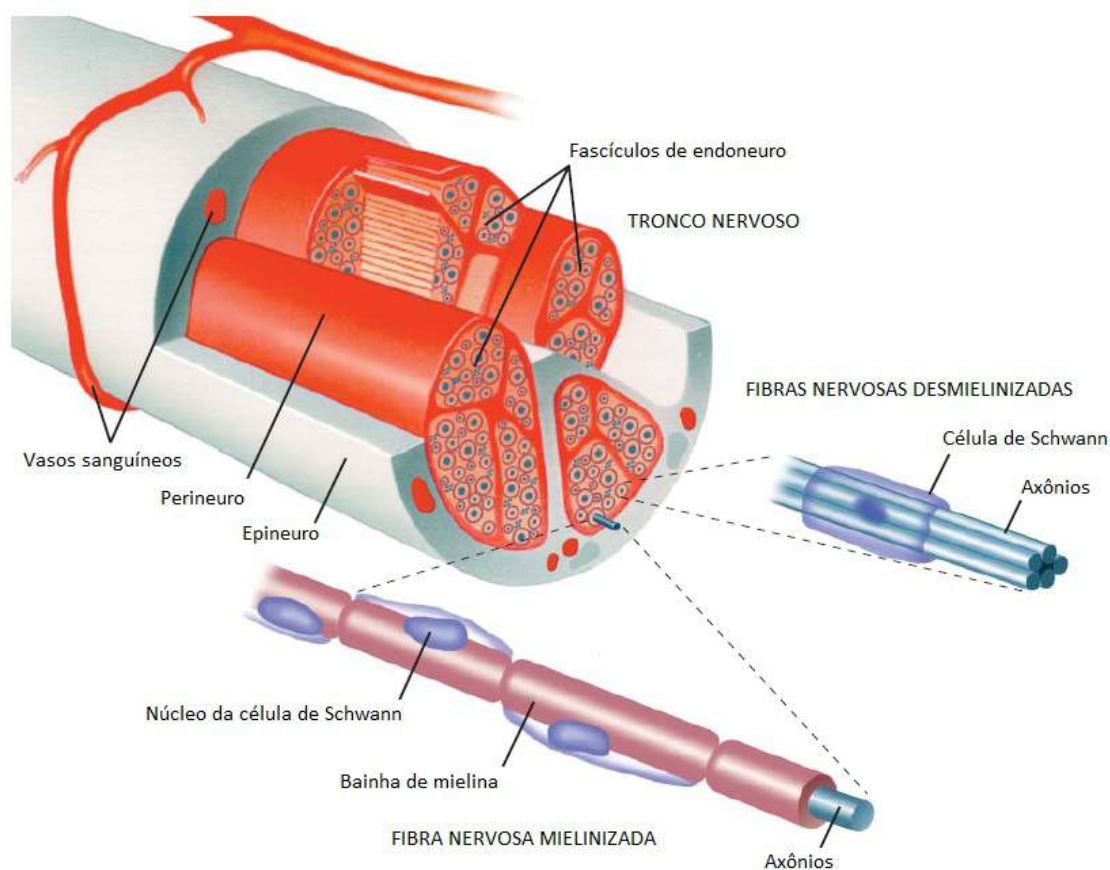


FIGURA 6. Estrutura da fibra nervosa.

Fonte: adaptado de (In depth tutorials information).

A vascularização dos nervos periféricos apresenta-se bem desenvolvida e se origina a partir de veias e artérias vizinhas de grande calibre, bem como dos vasos periosteais e musculares adjacentes. Os ramos desses vasos dividem-se em ascendentes e descendentes e quando alcançam o epineuro, fazem anastomose com o sistema intrínseco. Esse sistema é composto por plexos epineurais, perineurais e endoneurais, juntamente com seus vasos comunicantes (PABARI A., *et al.*, 2010; GOLDANI E. *et al.*, 2012). Possuindo uma grande capacidade de reserva para compensar a mobilização ou lesão dos vasos regionais locais. No epineuro, vasos orientados longitudinalmente exibem um padrão característico, ou seja, os vasos estão presentes em todas as camadas epineurais, assim como entre os feixes fasciculares e camadas profundas do nervo. A importância da vascularização dos nervos periféricos se deve ao fato de seus axônios serem vulneráveis a isquemia, devido a grande distância que existe entre o corpo neuronal e a extensão do axônio (PACHIONI *et al.*, 2006). Essa vascularização, quando afetada, corresponde a um dos tipos de lesão dos nervos periféricos (Figura 7).

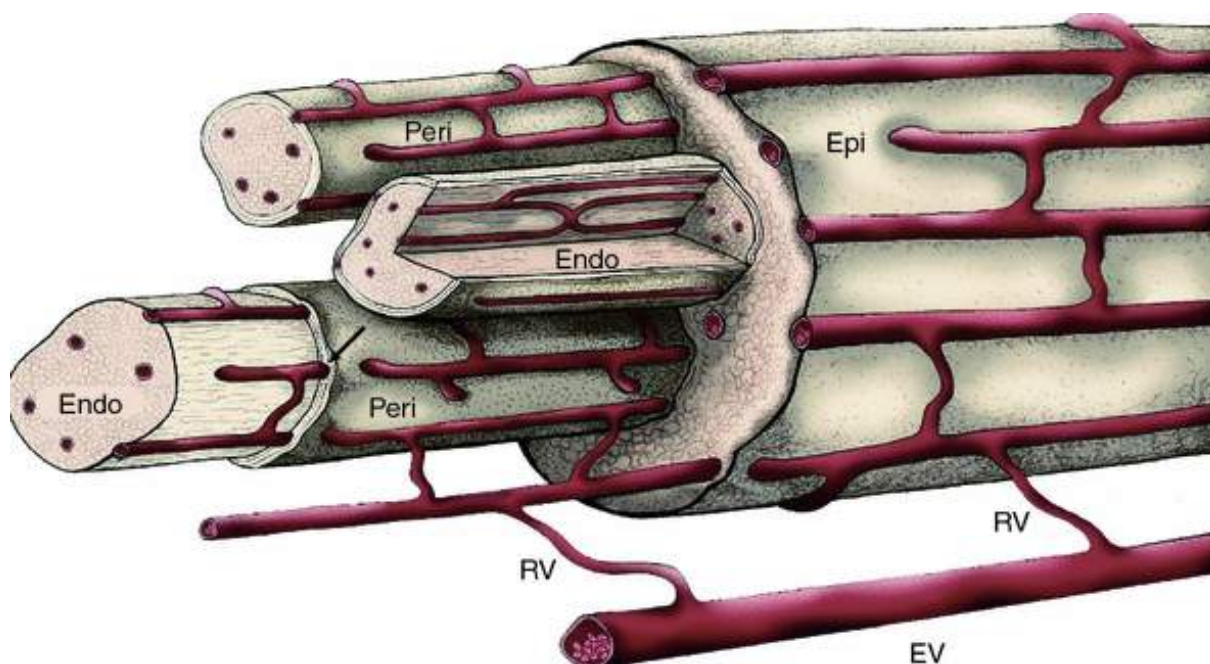


FIGURA 7. Vascularização dos nervos periféricos.

Fonte: Mizisin A.P. *et al.*, 2012.

2.2. Classificação das lesões dos nervos periféricos

O processo de regeneração dos nervos periféricos depende do tempo e do tipo da lesão. Clinicamente, um sistema que correlaciona as mudanças microscópicas que ocorrem após uma lesão nervosa e a sintomatologia do paciente auxiliam na identificação do tipo de lesão. Esses sistemas podem fornecer um prognóstico razoavelmente preciso de um tipo particular de lesão.

Existem dois tipos de classificação que são comumente empregadas para lesão de nervo periférico. Elas foram propostas por Seddon e Sunderland e foram adaptadas por Mackinnon. (MACKINNON *et al.*, 1988; SUNDERLAND, 1951, BRESHAH *et al.*, 2013) (Tabela 1).

TABELA 1. Classificações de Seddon e Sunderland de lesões nervosas (Adaptado de SUNDERLAND *et al.*, 1951).

SEDDON	SUNDERLAND	CARACTERÍSTICAS FISIOPATOLÓGICAS
Neuropraxia	Tipo 1 (primeiro grau)	Dano local na mielina geralmente devido à compressão (desmielinização)
Axonotmese	Tipo 2 (segundo grau)	Perda da continuidade dos axônios; endoneuro, perineuro e epineuro intactos (ótimas circunstâncias para regeneração).
Axonotmese	Tipo 3 (terceiro grau)	Perda de continuidade dos axônios e endoneuro; perineuro e epineuro intactos (arranjo fascicular preservado).
Axonotmese	Tipo 4 (quarto grau)	Perda de continuidade dos axônios, endoneuro; perineuro e fascículos. Epineuro intacto (neuroma em progressão).
Neurotmese	Tipo 5 (quinto grau)	Perda de continuidade de todo o tronco do nervo (rompimento fisiológico completo de todo o tronco do nervo).
Neurotmese	Tipo 6 (sexto grau)	Diferentes graus de lesão em diferentes pontos do mesmo nervo. Combinação dos tipos 2 e 4.

Seddon propôs uma classificação das lesões nervosas em três grandes grupos: neuropraxia, axonotmese e neurotmese. Na neuropraxia, o nervo está intacto, mas não consegue transmitir impulsos. É caracterizada por dano na bainha de mielina, geralmente devido à compressão e alterações vasculares ocorridas no nervo. A continuidade do axônio é preservada e o nervo não passa por degeneração distal. Na axonotmese, o axônio é danificado ou destruído, porém grande parte da estrutura do tecido conjuntivo é mantida. É definida como a perda da continuidade dos axônios com preservação variável dos elementos do tecido conjuntivo do nervo. Na neurotmese, o tronco do nervo é rompido e não há continuidade anatômica. Grande parte da estrutura do tecido conjuntivo é perdida ou severamente distorcida. É o tipo de lesão mais grave equivalente à ruptura fisiológica de todo o nervo. Pode incluir ou não transecção nervosa (BIRCH, 2010).

Posteriormente, Sunderland, entendeu que as lesões axonotméticas (tipo II de Seddon) apresentam prognósticos variáveis e dividiu o grupo da axonotmese de Seddon em três subtipos, dependendo do grau de envolvimento do tecido conjuntivo. Neuropraxia equivale à lesão tipo 1 (primeiro grau) de Sunderland. A recuperação completa após a lesão pode durar de semanas a meses. Na lesão tipo 2 (segundo grau), o endoneuro, o perineuro e o epineuro ainda estão intactos, mas os axônios estão fisiologicamente rompidos. Devido ao fato de o epineuro ainda estar intacto, os axônios regenerativos são direcionados ao longo do seu curso original e uma completa recuperação funcional pode ocorrer. O tempo de recuperação depende do nível da lesão, uma vez que o axônio deve ser regenerado distalmente para o órgão alvo. Na lesão tipo 3 (terceiro grau), o endoneuro também é rompido, mas o perineuro e o epineuro permanecem intactos. A recuperação é incompleta nesse tipo de lesão. Na lesão tipo 4 (quarto grau), somente o epineuro permanece intacto. Lesão neuronal retrógrada e fibrose intrafascicular são intensificadas, o que permite apenas uma recuperação mínima. Esse tipo de lesão exige uma excisão do segmento danificado e reparo cirúrgico ou reconstrução do nervo. A neurotme (partição completa do nervo) é equivalente à lesão tipo 5 (quinto grau) de Sunderland e a recuperação espontânea não ocorre ou é muito ruim. Embora a classificação de Sunderland forneça uma descrição concisa e anatômica da lesão nervosa, a utilidade clínica desse sistema é questionável porque, raramente é possível, através da classificação de Sunderland, classificar com exatidão uma lesão axonotmética com base em dados clínicos e eletromiográficos. O subtipo geralmente é discriminável através do exame histológico da lesão do nervo (O'DONOVAN *et al.*, 1983, COLLI *et al.*, 2003). Muitas lesões não podem ser classificadas em um simples grau. Lesões nervosas combinadas, nas quais todas as fibras são afetadas, mas variando os graus, são comuns entre as lesões de nervos periféricos (BIRCH R. 2010) (Figura 8).

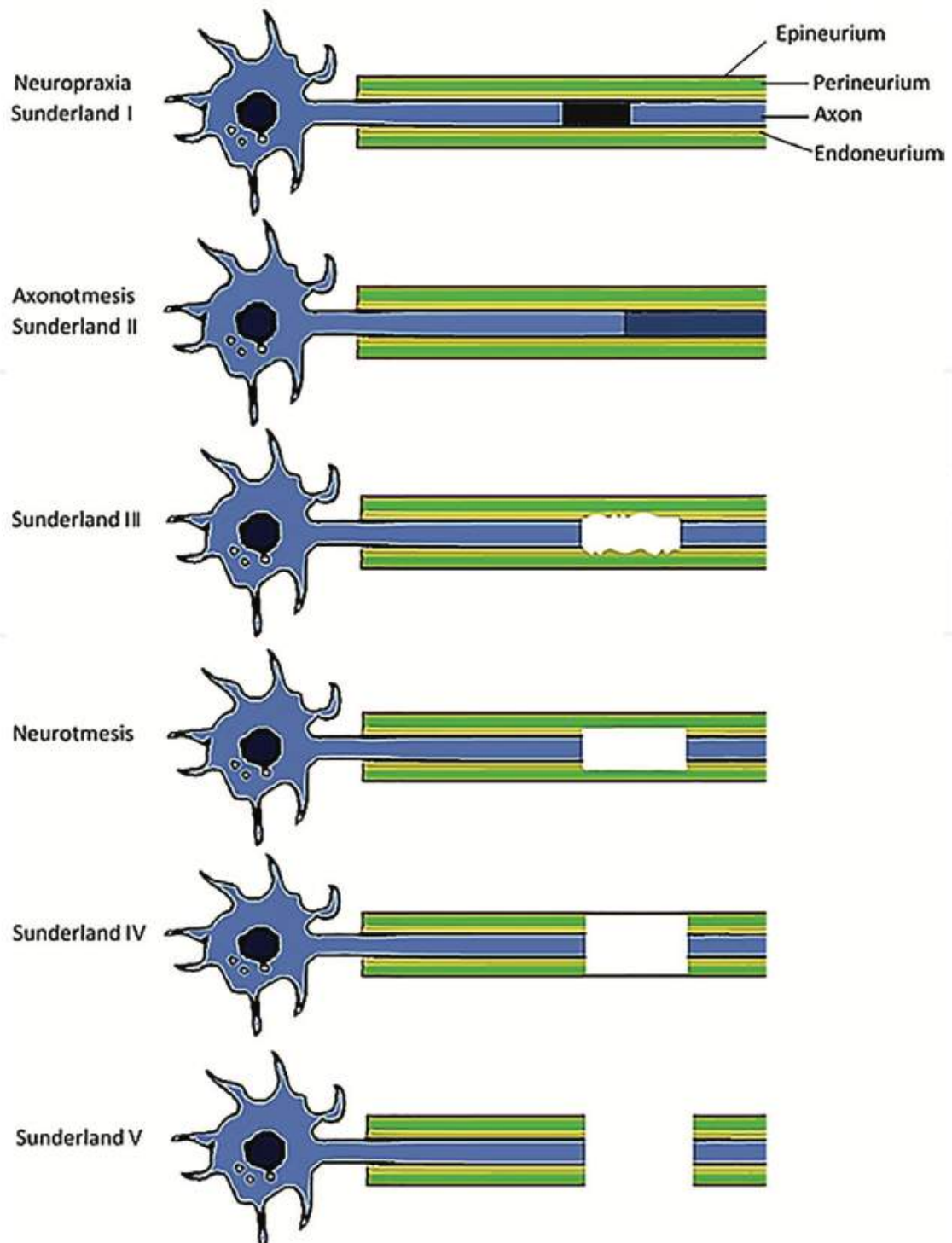


FIGURA 8. Tipos de lesões ocorridas nos nervos periféricos segundo a classificação de Sunderland.

Fonte: ALVITES, et al, 2017.

Mackinnon e Dellon (1988) propuseram um sexto grau para lesões misturadas, com base na evidência de que um único trauma pode ter várias regiões da sessão transversal do nervo de forma variável, causando diferentes graus de lesão em diferentes pontos do mesmo nervo (Figura 9).

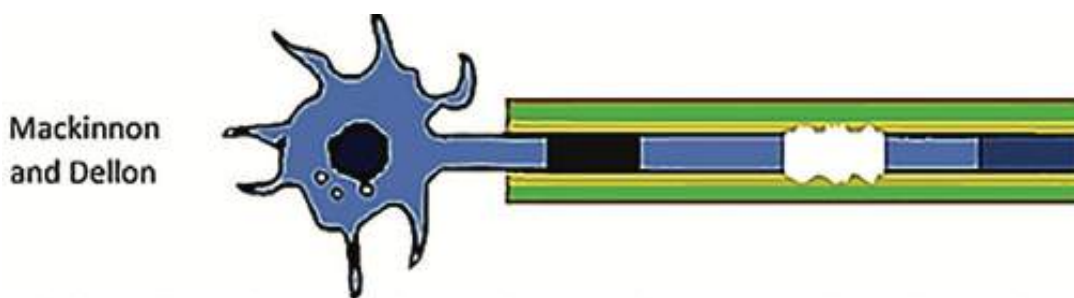


FIGURA 9. Classificação de MACKINNON S. et al, 1988.

Fonte: ALVITES, et al, 2017.

2.3. Lesões e reparos de nervos periféricos

Após uma lesão nervosa, as SC adquirem características proliferativas e fagocíticas, tornando-se vitais no processo de degeneração Walleriana. Em nervos desnervados, essas células alinham-se longitudinalmente formando colunas conhecidas como “bandas de Büngner”, constituindo uma lâmina basal que induz e auxilia o crescimento axonal, por meio de fatores neurotróficos. Além da importante função estrutural, atuando como condutores físicos no direcionamento do crescimento axonal, essas células também servem de interface entre os axônios e a matriz extracelular, sintetizando elementos como proteoglicanas, colágenos e fatores neurotróficos (COLLI *et al.*, 2003) (Figura 10).

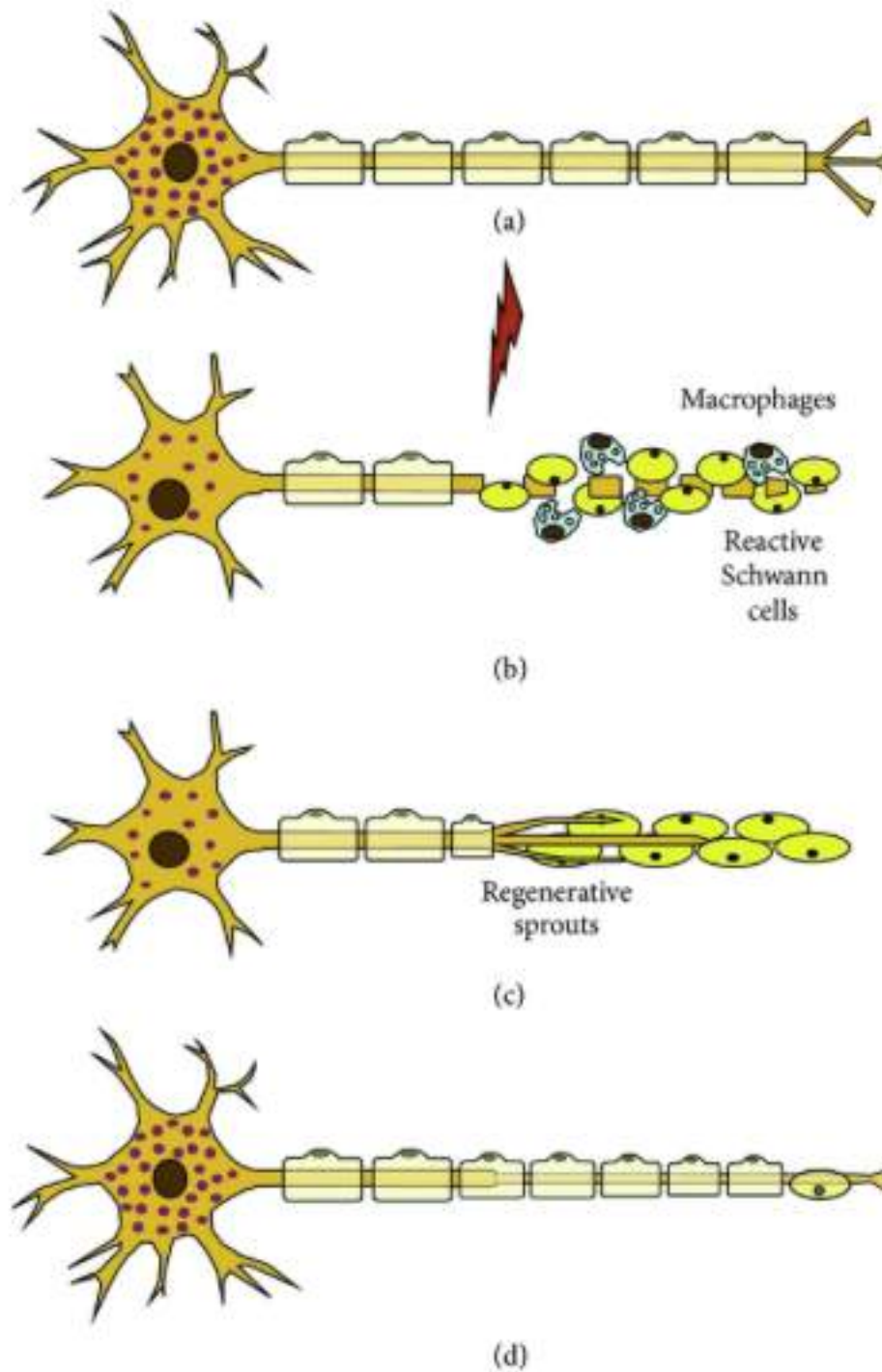


FIGURA 10. Processo de degeneração e regeneração de uma fibra nervosa após uma lesão. Observar o processo de cromatólise no corpo celular, a divisão das células de Schwann e a progressão do cone de crescimento do axônio (b). Divisão das células de Schwann (bandas de Büngner) (c), cones de crescimento e Neurônio regenerado (d).

Fonte: RAMBURRUM et al., 2014.

Entretanto, muitos casos não evoluem satisfatoriamente, principalmente por dois fatores. O primeiro, o coto proximal cresce lentamente, mesmo tendo sido reparado. A taxa de

regeneração é de 1-3 mm/dia. Portanto, há um período de latência de um mês para que todos os axônios ultrapassem o local da lesão e estabeleçam conexões funcionais. O segundo é, o intervalo de tempo que é relativamente curto para se obter a regeneração dos axônios após a secção dos nervos de maneira que não ocorra a desnervação das células de Schwann. A falta das células de Schwann impede a regeneração axonal, o que indica que tais células são imprescindíveis para a ocorrência da regeneração. A desnervação crônica das Células de Schwann reduz dramaticamente a regeneração dos axônios no coto distal do nervo (XU *et al.*, 2014).

A busca do aperfeiçoamento das técnicas de reconstrução demonstra que a união cruzada de fascículos motores com sensitivos é uma das prováveis causas das falhas nas reconstruções dos nervos periféricos. Quando uma fibra motora completar o processo de regeneração através de uma fibra sensitiva, ela não será capaz de atingir seu órgão efector (LOEB *et al.*, 1987, WILLAND *et al.*, 2013; WILLAND *et al.*, 2015).

Quando um nervo periférico é seccionado ou comprimido, sofre mudanças morfológicas conhecidas como cromatólise (GORDON, 2016), ocorrendo uma assimetria axonal e a ruptura de corpos de Nissl que comprometem o retículo endoplasmático rugoso. As mudanças morfológicas refletem a resposta molecular do neurônio de expressão alterada de centenas de genes.

No coto proximal, o corpo celular entra em cromatólise, ou seja, há dissolução dos corpúsculos de Nissl, deslocamento do núcleo para a periferia e aumento do volume do corpo celular. Além disso, há um aumento do retículo endoplasmático rugoso, responsável pela produção de moléculas de reparo (GORDON, 2016) (Figura 11).



FIGURA 11. À esquerda, neurônio normal e, à direita, reação do corpo celular (cromatólise).
Fonte: MATTAR JUNIOR R et. al.,1999.

Nesse processo, as SCs desempenham um papel importante na orientação e suporte dos axônios regeneradores em toda a lesão, bem como dentro e através das bainhas endoneuriais denervadas. A lâmina basal é uma rede tridimensional de proteínas e carboidratos que é considerada uma camada de matriz extracelular (MEC) no endoneuro. Contém moléculas promotoras do crescimento que incluem as glicoproteínas, a laminina e a fibronectina, tal como moléculas inibitórias, sendo a mais conhecida a proteoglicana de sulfato de condroitina (LUBINSKA, 1977). No coto distal ocorre um processo conhecido como degeneração Walleriana. Devido à interrupção do contato com o corpo celular, a ausência de suporte trófico e o aumento da entrada de íons cálcio (Ca^{+2}) nas fibras axoniotomizadas, inicia o processo de degeneração do coto distal com a fragmentação da bainha de mielina e dos axônios. As SC e os macrófagos que são recrutados para o local da lesão, atuam na fagocitose dos fragmentos de mielina e de neurofilamentos dos axônios em degeneração, o que proporciona um microambiente favorável ao crescimento e orientação axonal, fundamental ao processo regenerativo (Figura 12).

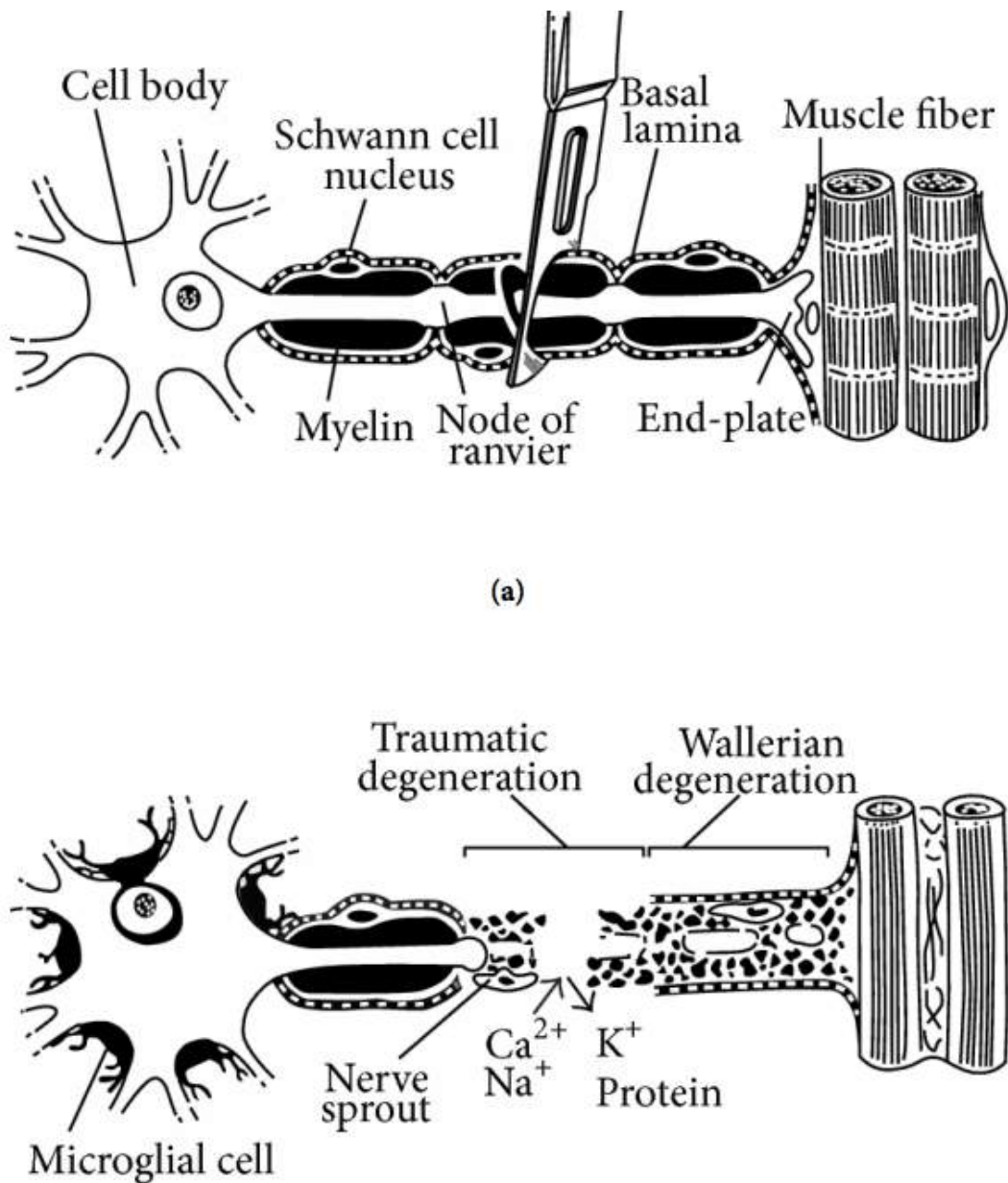


FIGURA 12. Degeneração Walleriana.

Fonte: GRINSELL D., et al,2014.

Após a lesão nervosa, os cotos distal e proximal do nervo sofrem mudanças estruturais e moleculares para iniciar o processo de regeneração que elaboram prolongamentos (GORDON *et al.*,2015; SULAIMAN *et al.*,2013, SINGH B. *et al.*, 2012; SINGH *et al.*, 2012). Muitos desses prolongamentos são perdidos. Todavia aqueles que permanecem, sofrem um processo de alongamento através do coto distal do nervo e constituem as unidades de regeneração. Eles atravessam o segmento lesado por meio de tubos formados pelas células de Schwann, que se proliferam na lesão. Os brotos axonais caminham por essas tubulações, atingem os tubos do

endoneuro no segmento distal (MORRIS *et al.*, 1972). Cada axônio do coto proximal origina vários brotos, porém somente alguns deles encontram o ‘caminho’ correto. Somente esses entram no processo de mielinização. Os demais degeneram ou não se mielinizam. A regeneração axonal progride a uma taxa de 1-3 mm por dia, que corresponde a taxa de transporte dos materiais regeneradores (fatores neurotróficos). O alongamento e a regeneração até o coto distal dependem do crescimento do meio promovido pelas células de Schwann. A perda dos canais das células de Schwann resulta em uma redução da regeneração e na formação de neuromas (HAN *et al.*, 2015).

As SC e os macrófagos que são recrutados para o local da lesão, atuam na fagocitose dos fragmentos de mielina e de neurofilamentos dos axônios em degeneração, o que proporciona um microambiente favorável ao crescimento e orientação axonal, fundamental ao processo regenerativo. No rato, as SCs migram para o local da lesão do nervo e estão desalinhados dentro de um emaranhado de matriz de laminina e fibroectina durante pelo menos 10 dias. Nesse período, os axônios estão crescendo a partir do tronco do nervo proximal, cruzando a linha da sutura de forma assombrada, e, frequentemente, sendo mal direcionados, mesmo para trás no coto proximal. À medida que as glicoproteínas se tornam mais organizadas e as SCs se alinham em paralelo no local e nos túbulos distal do nervo distal, os axônios entram progressivamente nos tubos de endoneuro dos cotos nervosos (BRUSHART *et al.* 1993, 2002, WITZEL *et al.* 2005).

Há casos em que, apesar da grande capacidade regenerativa do SNP, a extensão da lesão impossibilita a simples reunião dos cotos. Uma técnica de reparo disponível e frequentemente empregada nessa situação é a tubulização (BRAGA-SILVA, 1999). A literatura especializada cita numerosas alternativas cirúrgicas passíveis de serem empregadas na reparação de nervo periférico, para cada tipo de lesão. Dentre elas, ressalta-se a neurorafia epineural, a neurorafia fascicular, a neurorafia epineural-fascicular combinada, os enxertos nervosos e tubulização em perdas axonais (SHORES *et al.*, 1996, BRUSHART *et al.*, 2002, GORDON *et al.*, 2009, SINGH *et al.*, 2012).

2.4. Eletroestimulação

2.4.1. Eletroestimulador

Foi desenvolvido um estimulador elétrico para aplicação em nervos periféricos, baseado em estudos anteriores (AL-MAJED *et al.*, 2000, GORDON *et al.*, 2015). Um projeto de equipamento para estimulação de tecidos humanos, com corrente elétrica, deve considerar que uma diferença de potencial (DDP) ou tensão elétrica, ao ser aplicada ao tecido humano, irá produzir um campo elétrico, cujo valor dependerá das características do meio e do valor dessa diferença de potencial. Esse campo elétrico poderá produzir uma corrente elétrica se uma ou mais das seguintes condições estiverem presentes: a) neste meio existir elétrons livres; b) se neste meio existirem íons (associação de átomos com carga elétrica diferente de zero) e se estes íons tiverem mobilidade, c) se o meio for não condutor, será possível a polarização de seus átomos, sendo nesse caso, também necessária a variação da DDP aplicada no decorrer do tempo (tensão variável, ou até mesmo alternada). A passagem da corrente elétrica pelo tecido irá aquecê-lo, sendo necessário, em um projeto dessa natureza, considerar a possibilidade de medir a energia transferida ao tecido até que a equipe se certifique de que as tensões, correntes e tempo de aplicação não produzam danos aos tecidos. Os tecidos humanos reagem de forma diferente em relação à variação de DDP aplicada. Para uma alternância de 60 vezes por segundo (60Hz), os músculos reagem e se contraem, sendo muito difícil o relaxamento da musculatura por vontade própria se a corrente alternada for superior a 25 mA, podendo provocar parada cardíaca.

Considerando-se o exposto acima, o parâmetro utilizado foi o eletroestimulador empregado em procedimentos anestésicos que atinge 6 mA, corrente tolerada pelos pacientes durante a realização do bloqueio anestésico, que é realizado com o paciente acordado. Esse estimulador, de dimensões de 12,2 x 8,3 x 3,4 cm, é útil pela facilidade de alterar parâmetros (pelo computador) e realizar experimentos com tecidos simulados, antes de ser aplicado à cobaia. A aplicação na cobaia é possível, mas, como não é acoplado a ela, cuidados foram necessários na tentativa de não ocorrer o deslocamento dos eletrodos, que foram fixados ao tubo de silicone que, por sua vez, estava fixado no nervo. Ele produziu uma DDP de valor e frequência ajustável pelo pesquisador, bem como foi possível modificar o ciclo de trabalho, que

é o tempo em que a DDP se mantém no valor alto, por exemplo, 5,0 Volts e o tempo que se mantém no valor baixo, por exemplo, zero Volt, dentro da mesma frequência selecionada. A frequência inicial da pesquisa foi de 20 Hz, porque nessa frequência não há danos teciduais indesejáveis e o ciclo de trabalho é 50 %, ou seja, metade do tempo (0,05 segundos). Esses valores foram transferidos para o computador (TELLÓ *et al.*, 2004; CULLEN *et al.*, 2011) (Figura 13).



FIGURA 13. Captação de dados durante testes para desenvolvimento do eletroestimulador.
Fonte: Autor.

Alguns testes foram realizados antes da confecção do aparelho. Primeiramente foi imprescindível definir se a produção de calor ocasionaria queimaduras sobre o nervo. Para isso, foi utilizado o nervo ciático do frango com frequência de 20 Hz e tensão de 3 V (Figuras 14 e 15).

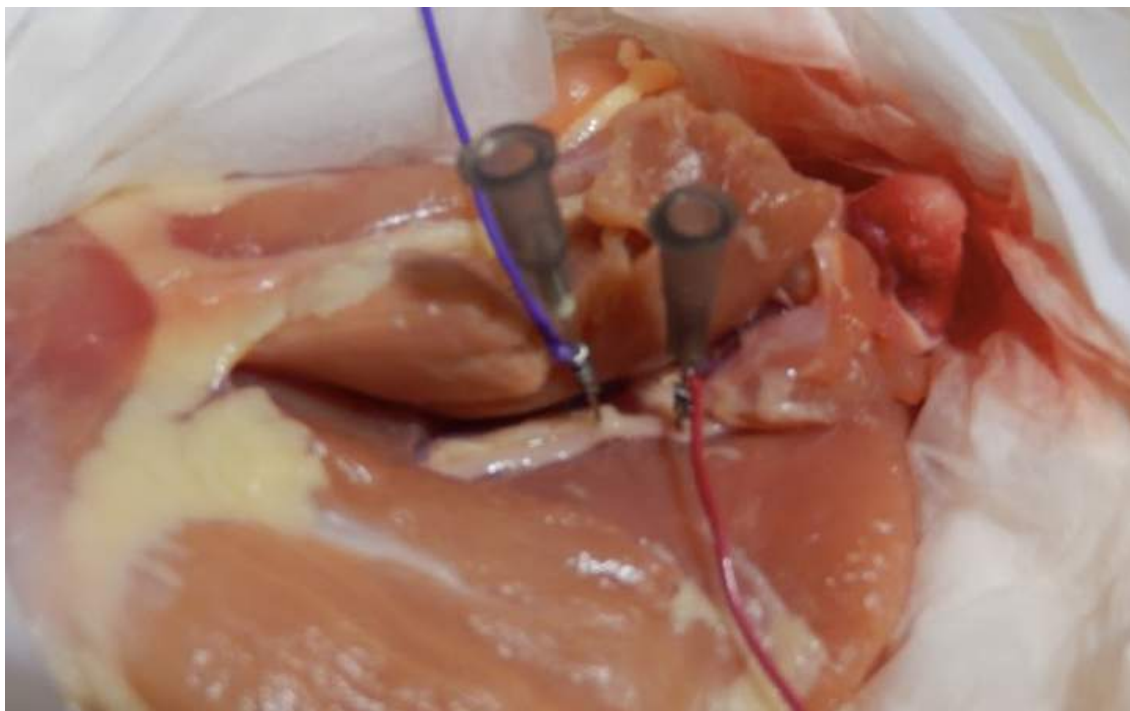


FIGURA 14. Experimento no nervo ciático de frango.

Fonte: Autor.



FIGURA 15. Experimento demonstrando o traçado da corrente elétrica em um computador.

Fonte: Autor

Também foi necessário saber se o resultado da aplicação do campo elétrico produziria o efeito de alinhamento das estruturas. Para isso, foi utilizado o gerador de Van De Graaf, demonstrando visualmente a existência de linhas de força através do mapeamento do campo elétrico gerado pela produção de uma tensão excitando os elétrons podendo ser percebido instantaneamente o alinhamento dos fios quando aplicado o campo.

Esse gerador foi desenvolvido pelo físico norte americano Robert Jemison Van de Graaf, que, em 1929, pensando em conseguir altas tensões, construiu o primeiro modelo de gerador, que acabou por receber o nome de Gerador de Van de Graaf (Figura 16) em sua homenagem. Esse aparelho serve para armazenar cargas elétricas no seu terminal elétrico e ainda tem grande aplicação na física, medicina e indústria. É utilizado nos laboratórios de ensinos médio e superior para demonstração de fenômenos eletrostáticos (SAMPAOLO, 2017). O material utilizado para o experimento foi o gerador de Van De Graaff, bastão de madeira, fios de lã cortados, óleo de rícino, duas conexões elétricas, cuba acrílica cilíndrica e lâmpada (Figura 17).



FIGURA 16. Gerador de Van De Graaff.

Fonte: Autor

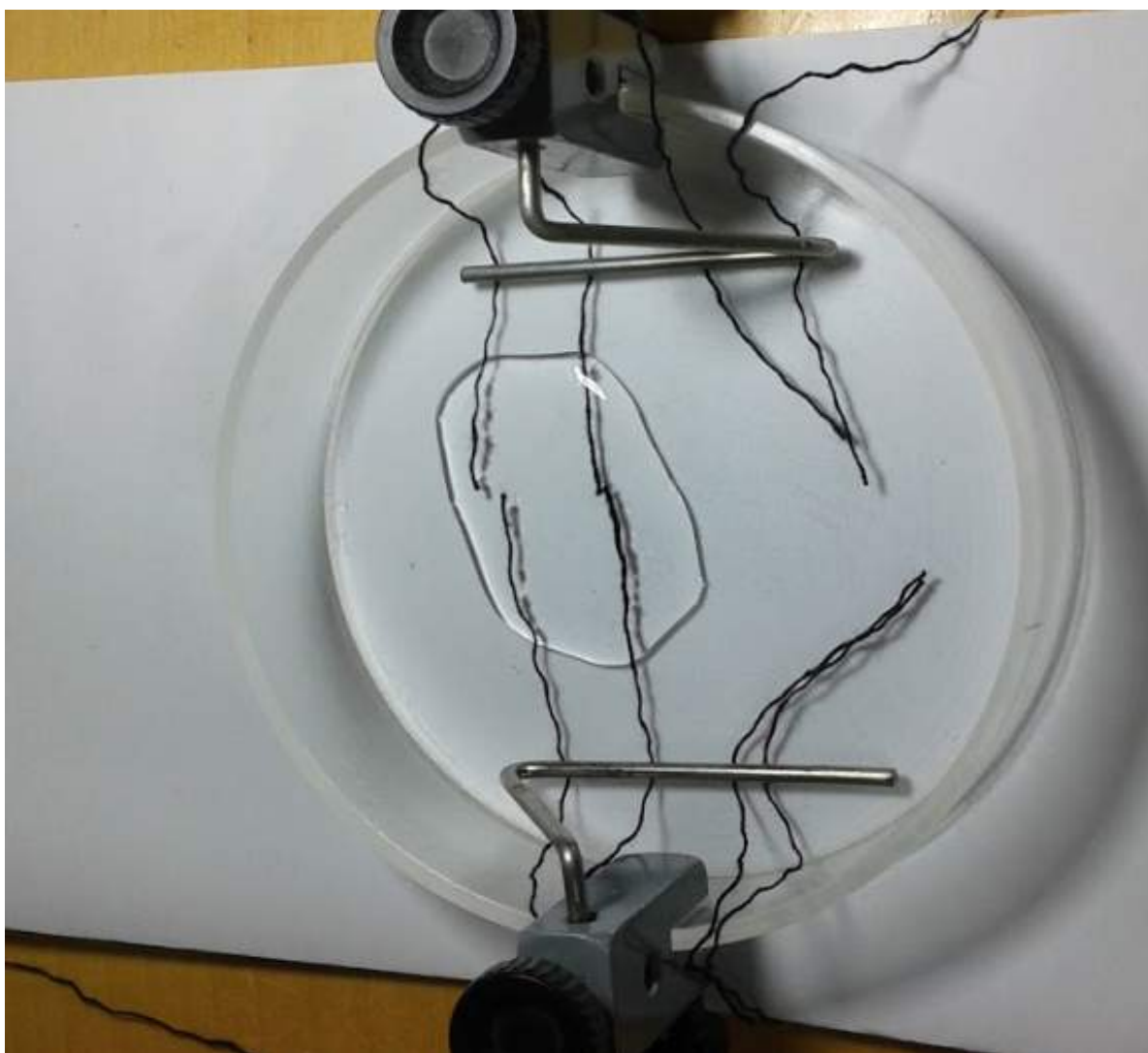


FIGURA 17. Materiais empregados no experimento.

Fonte: Autor.

Dois eletrodos retos foram colocados sobre o vidro de um retroprojeto e neles conexões elétricas foram feitas interligando com o gerador de Van De Graaff. Apoiando-se uma cuba cilíndrica sob os eletrodos, logo após foi colocada uma pequena quantidade de óleo de rícino dentro da cuba, formando uma lâmina de óleo sobre a cuba cilíndrica, após foram colocados fios de lã sobre o óleo existente. Em seguida, o gerador foi ligado apenas pelo tempo necessário para o alinhamento dos fios (Figura 18).



FIGURA 18. Alinhamento dos fios após aplicação do campo elétrico.

Fonte: Autor.

Nesse experimento, o estímulo foi realizado tentando atingir 20 Hz de frequência, 3 Volts de tensão e 1 mA de corrente (AL-MAJED *et al.*, 2000). Ao final de todos os testes, foram desenvolvidos os aparelhos, 13 unidades, que apresentam as seguintes características básicas: A alimentação é feita por uma bateria (pilhas alcalinas descartáveis) correntes ajustáveis de saída: de ZERO a 45 miliampéres (mA), frequências ajustáveis de zero a 99 Hz e tensões de zero a 3,3 volts (V). (Figura 19 e Tabela 2).



FIGURA 19. Eletroestimulador desenvolvido para essa pesquisa.

Fonte: Autor

TABELA 2. Dados do eletroestimulador.

Elementos de análise	Mínimo	Máximo	Resolução	Unidades de medida
Tensão	0	3,3	0,1	Volts
Corrente	0	45	0,1	Miliampéres
Frequência	1	99	1	Hertz
Largura do Pulso	80	25000	10	Microssegundos
Impedância de Saída	23	260	-----	Ohm
Tensão de Operação	3,45	5	-----	Volts
Autonomia de bateria	24	72	-----	Horas

Características do eletroestimulador, modelo desenvolvido baseado em pesquisas experimentais anteriores.

Fonte: Autor

2.4.2. Tubo de silicone:

Como tubo, foi utilizada uma sonda uretral pediátrica de silicone número 6 cortada, medindo 1 cm de comprimento cada. Foi marcado o ponto de introdução dos fios a 0,25 cm de cada extremidade. O diâmetro do tubo era de 2mm externamente e com um lúmen 1,34,

medidos com paquímetro digital, apresentando espaço suficiente para a passagem do nervo ciático do rato e prevendo o crescimento do mesmo com o passar das semanas, na tentativa de evitar sua compressão. (Figura 20).

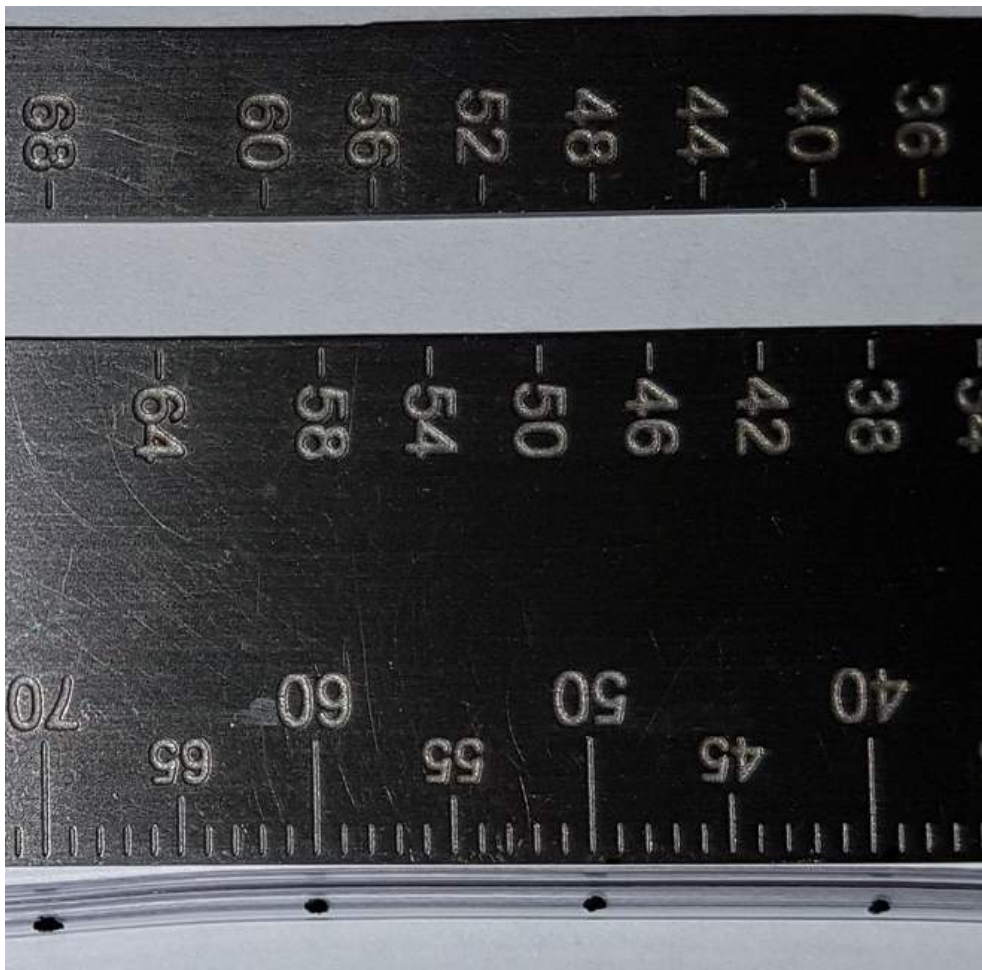


FIGURA 20. Marcação do tubo antes do corte, dividido em tubos de 1 cm.

Fonte: Autor.

Na região externa do tubo, fios de cobre com verniz foram soldados ao fio interno no ponto da solda de estanho. Uma proteção, com fragmento do tubo, foi colocada para evitar a dissipação da energia elétrica e a queima dos tecidos adjacentes e pele (isolante). Esse fio saía através da pele e era conectado ao eletroestimulador. Na porção conectada ao electroestimulador, o verniz do fio foi delicadamente removido para poder transmitir a corrente elétrica. Mesmo não sendo tema dessa pesquisa, para evitar irritação tecidual, foi realizada uma busca na literatura relacionada à biocompatibilidade dos componentes utilizados nesse dispositivo que foi implantado no nervo ciático dos ratos. Os fios para condução da eletricidade eram compostos internamente de cobre estanhado e, por isso, apresentam coloração prateada. A solda no ponto imediatamente fora do tubo de estanho e o fio que se conectara ao electroestimulador, era de cobre envernizado. O fio interno ao tubo foi de 36 AWG (do inglês,

American Wire Gauge, padrão norte americano de medidas) (0,127mm de diâmetro), o fio externo foi de 36 AWG, porém revestido de verniz (Figura 21).

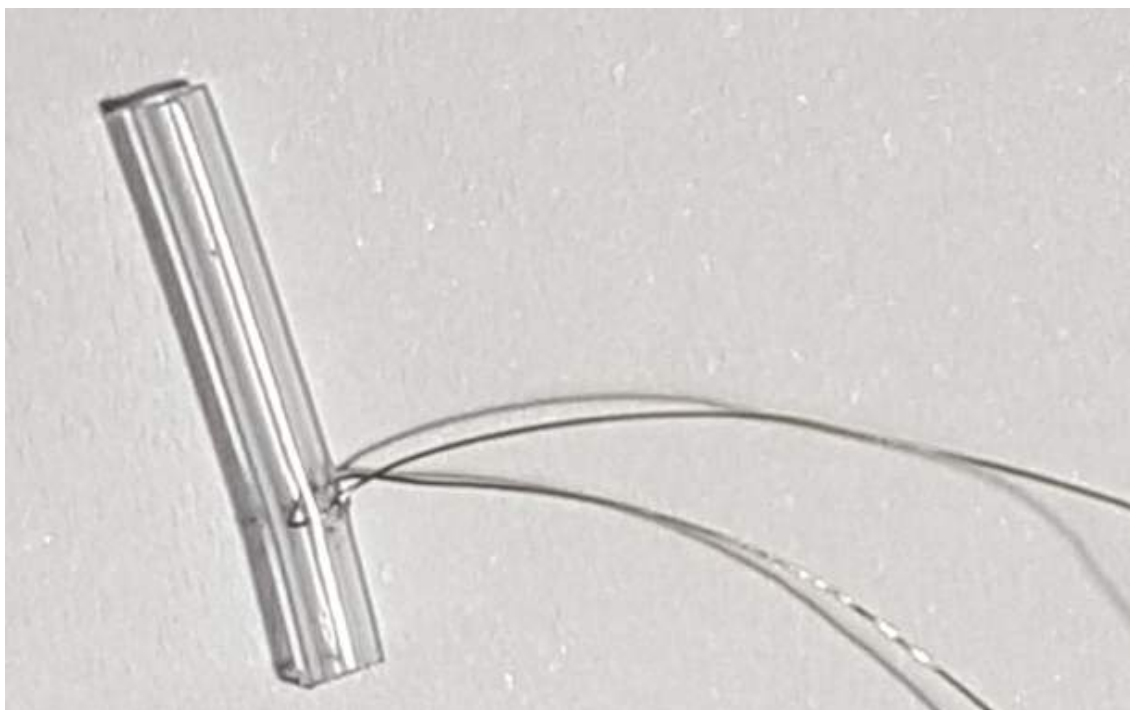


FIGURA 21. Passagem do fio de cobre revestido de estanho em forma de alça no interior do tubo.

Fonte: Autor.

Embora nas pesquisas experimentais atuais, sejam encontrados avanços relacionados ao uso de tubulização dos nervos periféricos, que auxiliam no processo de regeneração, utilizando agentes farmacológicos, uso de células tronco, terapia genética e sofisticados condutos de bioengenharia (PANAGOPOULOS *et al.*, 2017), foi utilizado tubo de silicone, em vista de que, nesse estudo, o objetivo de uso era apenas auxiliar no direcionamento das fibras. A principal preocupação com o emprego clínico de material sintético não absorvível é a ocorrência de complicações decorrentes de fibrose local desencadeada pelo material implantado e compressão nervosa (MERLE M. *et al.*, 1989). Embora as reações teciduais, após o uso de tubos de polímero de silicone tenham sido relatadas, um estudo descrevendo nova exploração em pacientes em que os tubos de silicone foram utilizados para completar pequenas lacunas, apresentou poucos sinais de reação de corpo estranho e irritação no local da implantação no terço distal do antebraço (BRAGA-SILVA, 1999, BRAGA-SILVA *et al.*, 2007). Foi mostrado que, em particular, em algumas situações clínicas, podem ser obtidos resultados funcionais satisfatórios por meio de condutos biológicas e não biológicas. Na verdade, os tubos de silicone simples apresentam bons resultados para completar falhas pequenas nos nervos, os condutos

bioabsorvíveis, como o ácido poliglicólico, permitem reparar com sucesso os defeitos mais longos em seres humanos (BATISTON *et al.*, 2005).

O objetivo do uso desses tubos foi de apenas evitar a formação de neuroma, circundando e protegendo o nervo, na tentativa de alinhar os fascículos, de forma a melhorar os resultados. Não foi produzido nenhum ‘gap’, apenas o defeito, com contato direto entre os cotos.

2.4.3. Metais condutores

O campo dos biomateriais está em um aumento contínuo devido à alta demanda do envelhecimento da população, bem como ao aumento do peso médio das pessoas. Os biomateriais são materiais artificiais ou naturais que são usados para restaurar ou substituir a perda ou falha de uma estrutura biológica, para recuperar sua forma, sua função e, também, para melhorar a qualidade e longevidade da vida humana. Biomateriais são utilizados em diferentes partes do corpo humano, como válvulas artificiais no coração, stents em vasos sanguíneos, implantes de reposição em ombros, joelhos, quadris, cotovelos, orelhas e estruturas dentárias (SAENZ *et al.*, 2013). A incompatibilidade biológica pode causar efeitos teciduais que são: toxicidade sistêmica, hemocompatibilidade, irritação local, implantação, citotoxicidade, toxicidade subcrônica, genotoxicidade e sensibilização. Os materiais são testados sob esses aspectos.

2.4.4. Estanho

O estanho (Sn), elemento número 50 da tabela periódica, é utilizado nas ligas de titânio que, por sua vez, são usados em implantes na área da medicina. O estanho é acrescentado às ligas permitindo reduzir a quantidade de alumínio e mantendo sua resistência mecânica (boa soldabilidade, alta resistência mecânica, boa resistência ao escoamento, boa tenacidade, boa ductibilidade). As composições das ligas em que é utilizado são Ti-15Zr-4Nb-2Ta-0.2Pd e Ti-15Sn-4Nb-2Ta-0.2Pd. Já as ligas Ti-Zr-Nb-Ta-Pd e Ti-Sn-Nb-Ta-Pd, foram testadas quanto à biocompatibilidade *in vitro* e apresentaram propriedades mecânicas e resistência à corrosão (ITO A. *et al.*, 1995). Os presentes resultados sugerem que a liga Ti-Mo-Sn-Zr, recentemente desenvolvida, mostrou alta biocompatibilidade comparável ao titânio puro e pode ser utilizada como biomaterial eficiente para uso médico (NUNOME *et al.*, 2015). A seleção apropriada do biomaterial do implante é um fator chave para o sucesso a longo prazo dos implantes. O ambiente biológico não aceita completamente nenhum material para otimizar o desempenho

biológico, os implantes devem ser selecionados para reduzir a resposta biológica negativa, mantendo a função adequada (SAINI *et al.*, 2015). Essas ligas exibem uma elevada rigidez que, devido à blindagem por tensão, pode resultar em atrofia / degradação dos ossos, resultando em uma falha do implante com o tempo. As novas ligas de titânio, que podem incluir ferro (FE), nióbio (Nb), molibdênio (Mo) ou estanho (Sn), agem para reduzir a rigidez de um implante ortopédico por exemplo (HANNON, 2016). Pelo fato de ser utilizado em ligas metálicas para confecção de implantes, pelo baixo custo, por se tratar de bom condutor de eletricidade e, também, pela facilidade de obtenção, foi escolhido um fio de cobre estanhado para colocação internamente no tubo (Figura 22).

2.4.5. Cobre

O Cobre (Cu), elemento número atômico 29 na tabela periódica, é utilizado para confeccionar alguns materiais na área médica. Nas pesquisas relacionadas a citotoxicidade de fragmentos de DIU Cu de alta dose a longo prazo no colo uterino, o cobre é bem tolerado por ratos Wistar fêmeas. Não foram observadas necrose ou atipia no endométrio. Mais importante ainda, foram realizados exames anatômicos de órgãos vitais e suas funções não foram afetadas. Como o DIU Cu não exibiu toxicidade sistêmica óbvia nem toxicidade local em ratos, sendo considerado seguro desde que utilizado por curto período, havendo a necessidade de troca após determinado tempo (ZHAO *et al.*, 2017). Dessa maneira, foi utilizado fio de Cu no interior do tubo, porque esta pesquisa foi desenvolvida em um período máximo nove semanas e, o fio de cobre foi utilizado pelo baixo custo, boa condutibilidade elétrica e fácil obtenção (Figura 22).

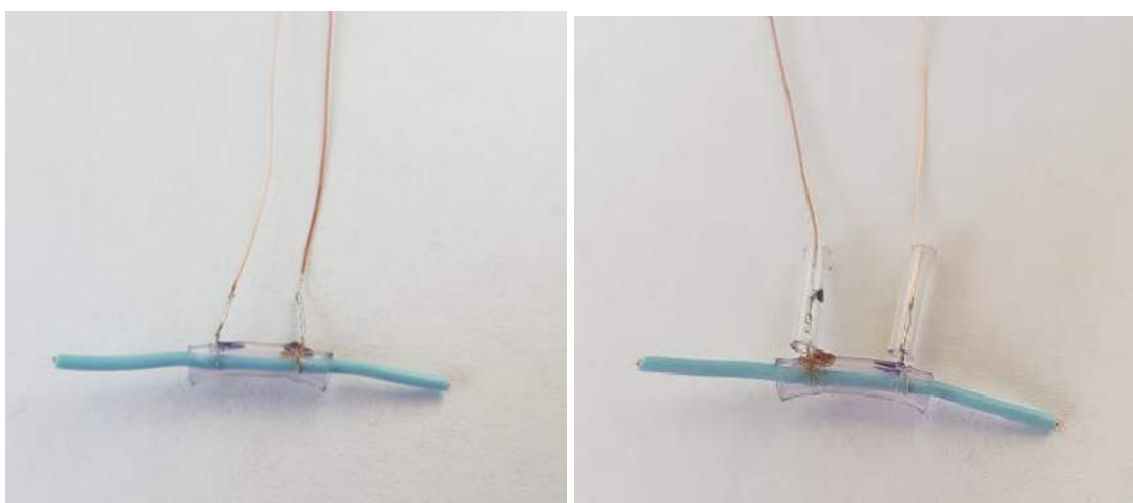


FIGURA 22. Tubo para eletroestimulação demonstrando o local da solda e ao lado o local da solda protegida com outro tubo de silicone.

Fonte: Autor.

3. JUSTIFICATIVA

As lesões de nervos periféricos apresentam alta incidência e, mesmo sendo tratadas de maneira adequada com técnica microcirúrgica, podem apresentar uma taxa de maus resultados significativa. Atingindo uma parcela considerável da população economicamente ativa, trazendo limitações funcionais, que geram custos elevados ao Sistema Único de Saúde e a Previdência Social. Por isso, o interesse pelo estudo da regeneração em nervos periféricos vem crescendo continuamente nas últimas décadas. As lesões nervosas resultam aproximadamente US 150 bilhões de dólares em cuidados de saúde anuais nos Estados Unidos (SAADAT *et al.*, 2011; GRIFFIN *et al.*, 2013; ANDERSON, *et al.*, 2015). As lesões traumáticas em nervos periféricos encontram-se entre as mais frequentes no nosso meio (TORRES *et al.*, 2015).

Diversas substâncias e materiais têm sido desenvolvidos com o intuito de colaborar com as novas tecnologias e solucionar esse desafio. Isso depende de vários fatores como, por exemplo, tipo de lesão, tempo até o atendimento após a lesão e tipo de tratamento empregado (LAWRENCE *et al.*, 2000).

A Eletroestimulação, associada à tubulização (EE), em um modelo animal, justifica-se pelo futuro emprego nas lesões em humanos na tentativa de reduzir o tempo de recuperação das lesões. Diminuindo, assim, o ônus de um sistema de saúde sobrecarregado, permitindo a reabilitação funcional de pacientes em idade produtiva de maneira mais rápida.

4. OBJETIVO GERAL

Avaliar, *in vivo*, o uso da Eletroestimulação associada à tubulização, na regeneração das lesões do nervo ciático em ratos.

4.1. Objetivos específicos

Entre os objetivos específicos foram avaliados:

O resultado funcional e histológico com três semanas dos ratos submetidos à eletroestimulação (EE) somente na ocasião do procedimento cirúrgico, com seis semanas dos ratos submetidos à eletroestimulação (EE) na ocasião do procedimento cirúrgico e com três semanas, com nove semanas dos ratos submetidos à eletroestimulação (EE) na ocasião do procedimento cirúrgico, com três semanas, e, com seis semanas;

O resultado funcional e histológico dos ratos submetidos à sutura e tubulização (ST) com três semanas, dos ratos submetidos à sutura e tubulização (ST) com seis semanas, dos ratos submetidos à sutura e tubulização (ST) com nove semanas;

O resultado funcional e histológico dos ratos submetidos à sutura (SUT) com três semanas, dos ratos submetidos à sutura (SUT) com seis semanas; dos ratos submetidos à sutura (SUT) com nove semanas.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Delineamento experimental

Estudo experimental, controlado, comparado e cego.

5.2. Cálculo do tamanho da amostra

Assumindo uma magnitude de diferença entre as médias dos grupos de $E/S=1,5$ (1,5 unidades de desvio padrão) em nível de significância (erro tipo I) de 0,05 e poder estatístico de 90% ($\beta=0,10$), foi estimado que seriam necessários 10 ratos por grupo (um total de 90 animais).

5.3. Animais

Nas pesquisas científicas médicas, em diversas áreas, o modelo animal tem sido amplamente utilizado nos estudos dos nervos periféricos. Os ratos são preferidos por apresentar pequeno tamanho, grande número de animais geneticamente parecidos e custo acessível (SARIKCIOGLU *et al.*, 2009). O nervo ciático dos ratos mostra uma capacidade equivalente de regeneração comparado a dos primatas. Por isso, o nervo ciático do rato é amplamente utilizado na avaliação das funções motoras e sensitivas (MACKINNON *et al.*, 1985; YU *et al.*, 2011).

Nesse modelo experimental foram utilizados 90 ratos isogênicos da raça Wistar (*Rattus Novergicus Albinus*), machos adultos, pesando entre 200 e 300 gramas de massa corporal. Todos os animais são provenientes do CeMBE (Centro de Modelos Biológicos Experimentais)

da PUCRS (Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul) (Figura 21), sendo que o procedimento cirúrgico foi realizado no Laboratório de Habilidades Médicas e Pesquisa Cirúrgica da Escola de Medicina, da PUCRS. Os testes de marcha dos ratos foram realizados no INTOX (Instituto de Toxicologia), da mesma instituição. Os animais foram mantidos no CeMBE, com controle de luz (ciclo claro-escuro de 12h), à temperatura controlada de $22 \pm 1^\circ\text{C}$, com água e alimentação *ad libitum* (LINCHTENFELDS et al.,2012). O presente estudo está em conformidade com a Lei Arouca 2008, nº 11.794/08, que regulamenta o inciso VII do § 1º do art. 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais, revogando a Lei nº 6.638, de 8 de maio de 1979; e dá outras providências (Figura 23).



FIGURA 23. Centro de estudos de modelos Biológicos experimentais (CeMBE – PUCRS).

Fonte: Autor.

5.4. Modelo experimental

O modelo de lesão do nervo ciático foi provocado acessando a região lateral da coxa direita. Após incisão da pele, subcutâneo e fáscia lata, os músculos vasto lateral e bíceps femoral foram afastados, o nervo ciático exposto e liberado de suas inserções fasciais. Foi produzida uma lesão, com tesoura de microcirurgia, no terço médio do nervo antes da

bifurcação do ciático em nervos tibial e fibular comum criando um defeito (COSTA *et al.*, 2006; LINCHTENFELDS *et al.*, 2012). Os procedimentos cirúrgicos foram realizados de acordo com o estabelecido para cada grupo. O tubo de silicone foi colocado envolvendo o nervo ciático do rato nos grupos da eletroestimulação associada a tubulização e no grupo de tubulização. O tubo com 1 cm de comprimento, 0,5 cm proximal e 0,5 cm distal ao local do contato direto entre os cotos (COSTA *et al.*, 2009) e o fio foi conectado ao eletroestimulador e fixado no dorso do animal sendo que o mesmo fio internamente foi fixado no tubo de silicone por uma solda de estanho, no seu limite proximal e distal (SULAIMAN *et al.*, 2013) (Figura 24).



FIGURA 24. Defeito criado no nervo ciático do rato.

Fonte: Autor

5.5. Grupos de experimentação

Os 90 animais foram randomicamente distribuídos em 3 grupos de 30 animais (Figuras 25, 26 e 27) e, cada um desses grupos, foi dividido em outros três grupos de acordo com o tempo de tratamento empregado. Os ratos receberam os tratamentos imediatamente após a realização da lesão.

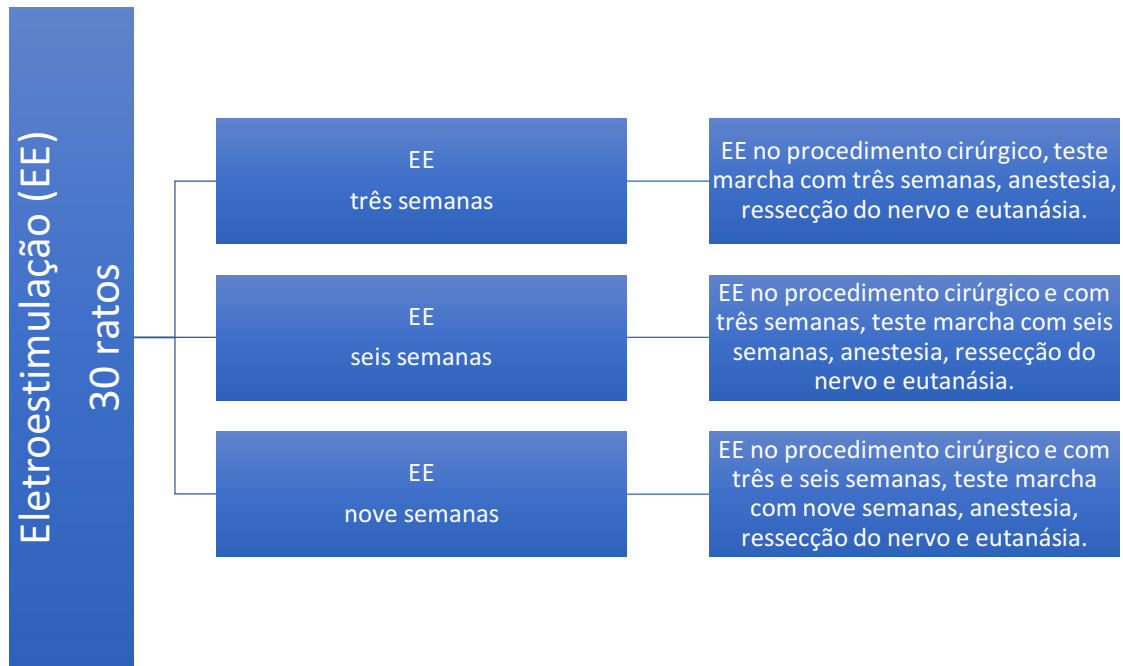


FIGURA 25. Organograma do grupo EE.

Fonte: Autor

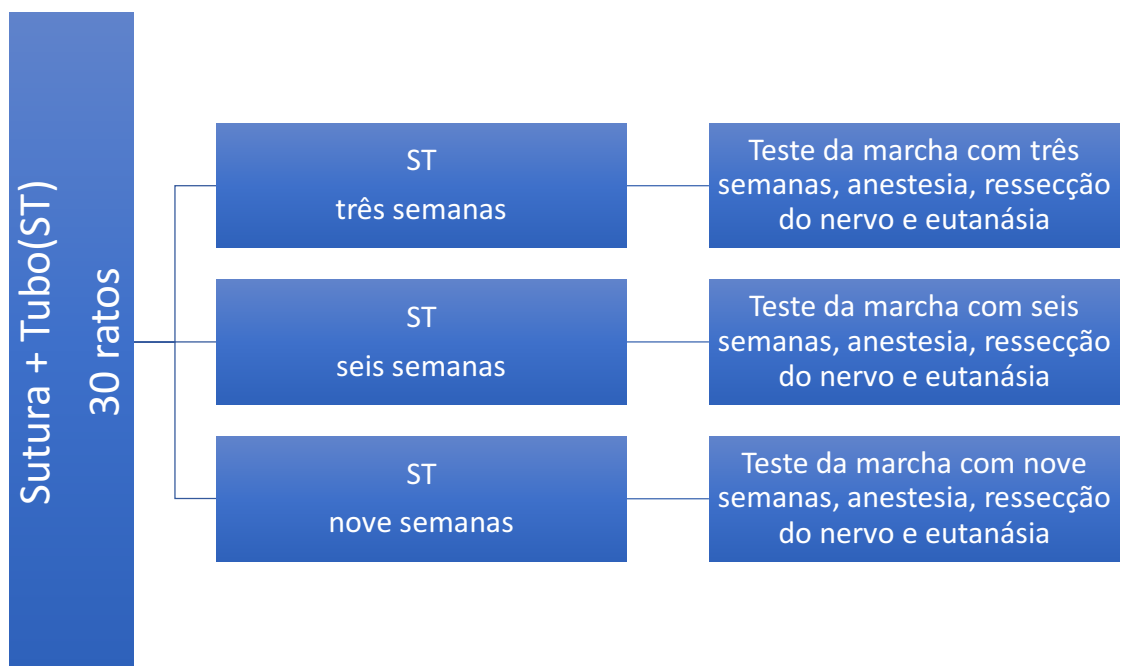


FIGURA 26. Organograma do grupo ST.

Fonte: Autor

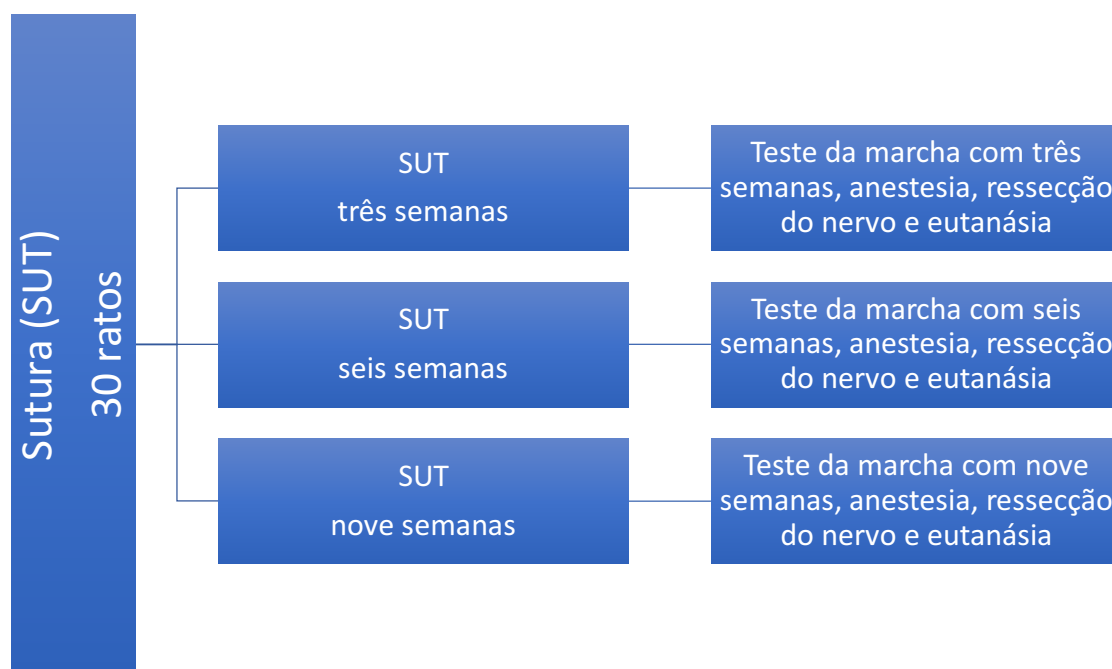


FIGURA 27. Organograma do grupo SUT.

Fonte: Autor

Grupo EE: (grupo da eletroestimulação). Um tubo de silicone com 10 mm de comprimento de calibre compatível, com fio condutor de eletricidade de cobre (Cu) com cobertura de estanho (Sn), colocado 2,5 mm proximal e outro 2,5 mm distal. Ao fio de cobre estanhado, após a saída do tubo, foi soldado um fio de cobre (Cu) com isolamento (esmaltado) para não dissipar a energia, evitando, assim, queimaduras em tecidos adjacente e permitindo que o nervo recebesse a energia necessária para o procedimento. Esses fios eram deixados fora da pele, onde foram conectados ao aparelho de eletroestimulação. Após o defeito criado, o nervo foi fixado dentro do centro do tubo com os fios para eletroestimulação. O nervo foi fixado com pontos de ancoragem com fio prolene® 7.0, sem a sutura tradicional, mantendo os cotos em contato direto. Na porção mais distal do fio, conectada ao eletroestimulador, foi removido o esmalte delicadamente para evitar quebra do fio, tendo sido realizada a EE. Os fios metálicos foram transfixados no dorso do animal, fora da pele, e, cobertos por um curativo. O curativo foi suturado na pele do animal, na tentativa de evitar a soltura ou remoção (Figuras 28, 29, 30 e 31). Nesse grupo, dez ratos foram estimulados na cirurgia, e avaliados e eutanasiados com três semanas. Dez ratos estimulados na cirurgia, com três semanas, avaliados e eutanasiados com seis semanas; dez ratos estimulados na cirurgia, com três, com seis semanas, avaliados e eutanasiados com nove semanas de seguimento.

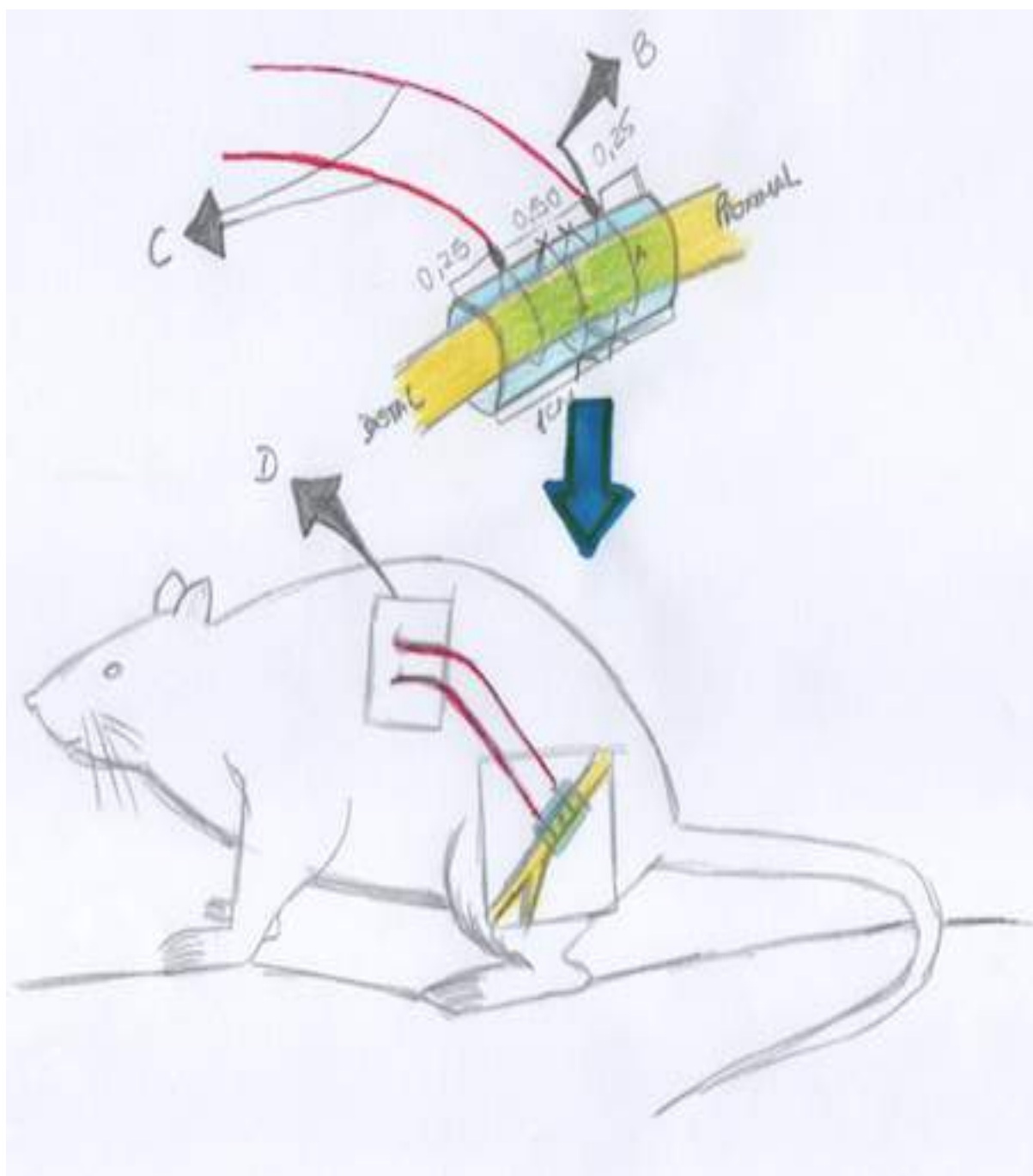


FIGURA 28. Instalação do tubo com EE. Fio de cobre estanhado (A), solda de estanho (B), fios de cobre esmaltados (C), curativo externamente na pele (D).

Fonte: Autor

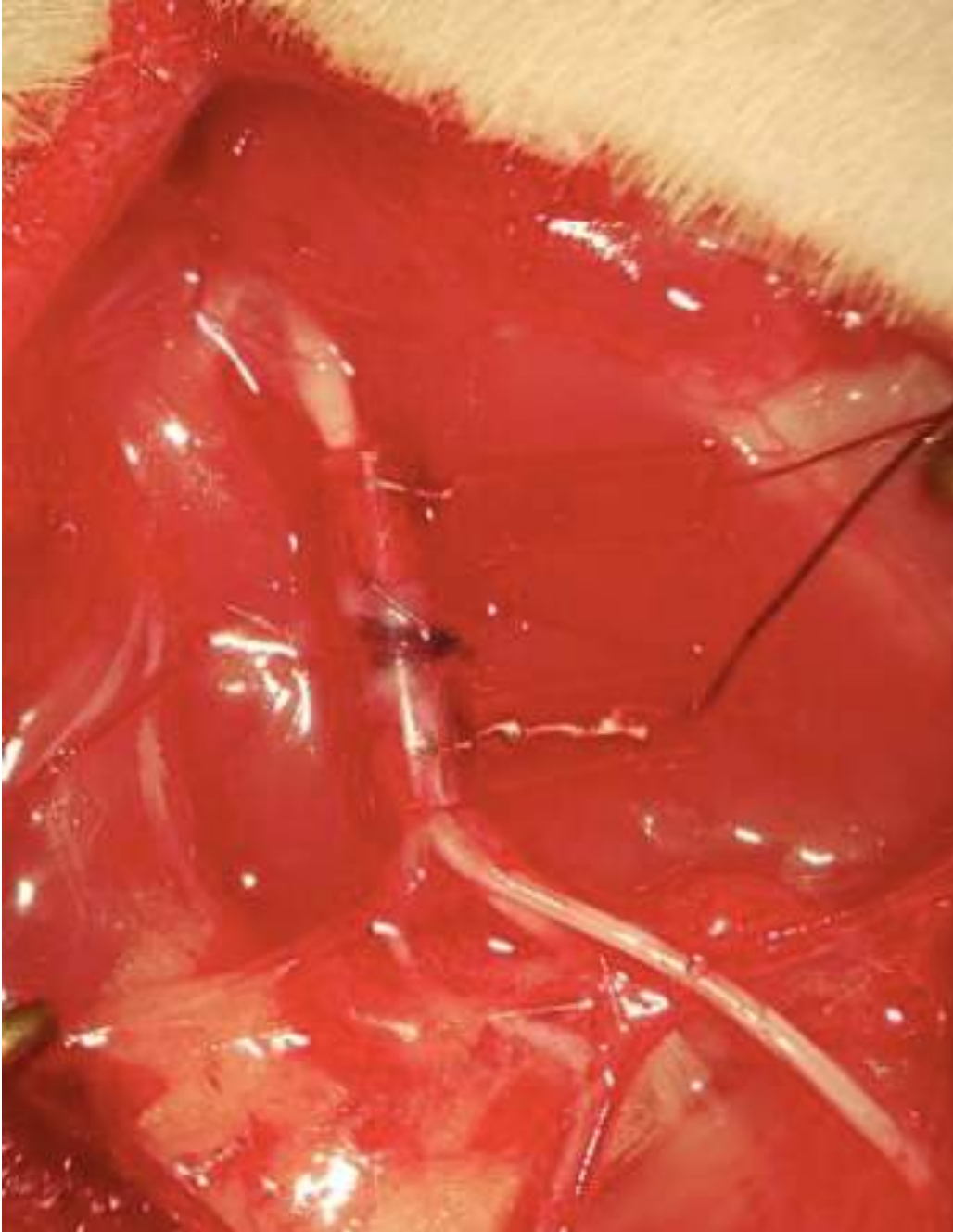


FIGURA 29. Dispositivo de eletroestimulação instalado.
Fonte: Autor



FIGURA 30. EE após procedimento cirúrgico para instalação.

Fonte: Autor



FIGURA 31. Grupo EE – Ratos na bancada recebendo eletroestimulação no pós-operatório imediato.

Fonte: Autor

Grupo ST: Após o defeito criado, o nervo foi fixado dentro do meio do tubo de silicone proximal e distal com pontos de fio prolene® 7.0 em ambos os lados, estabelecendo o contato entre os cotos. Portanto, nesse grupo foram dez ratos avaliados e eutanasiados com três semanas, dez ratos avaliados e eutanasiados com seis semanas, dez ratos avaliados e eutanasiados com nove semanas (Figura 32).



FIGURA 32. Grupo ST, após criação de defeito, aproximação dos cotos com colocação de tubo de silicone.

Fonte: Autor

Grupo SUT – controle: somente sutura simples. O defeito criado foi suturado com quatro pontos epineurais, separados com mononylon® 9.0 e os animais foram avaliados funcional e histologicamente com três, seis e nove semanas. Dessa forma, nesse grupo, foram dez ratos avaliados e eutanasiados com três semanas; dez ratos avaliados e eutanasiados com seis semanas; dez ratos avaliados e eutanasiados com nove semanas (Figura 33 e 34).

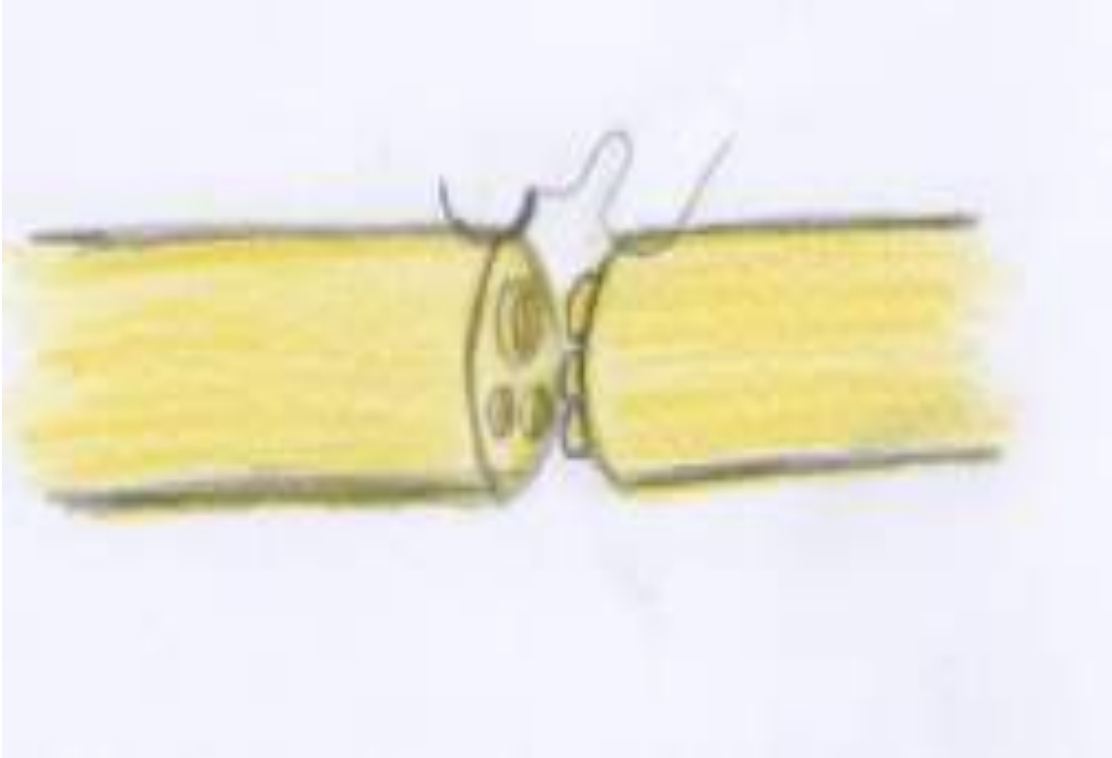


FIGURA 33. Sutura epineural. (gold standard).

Fonte: Autor

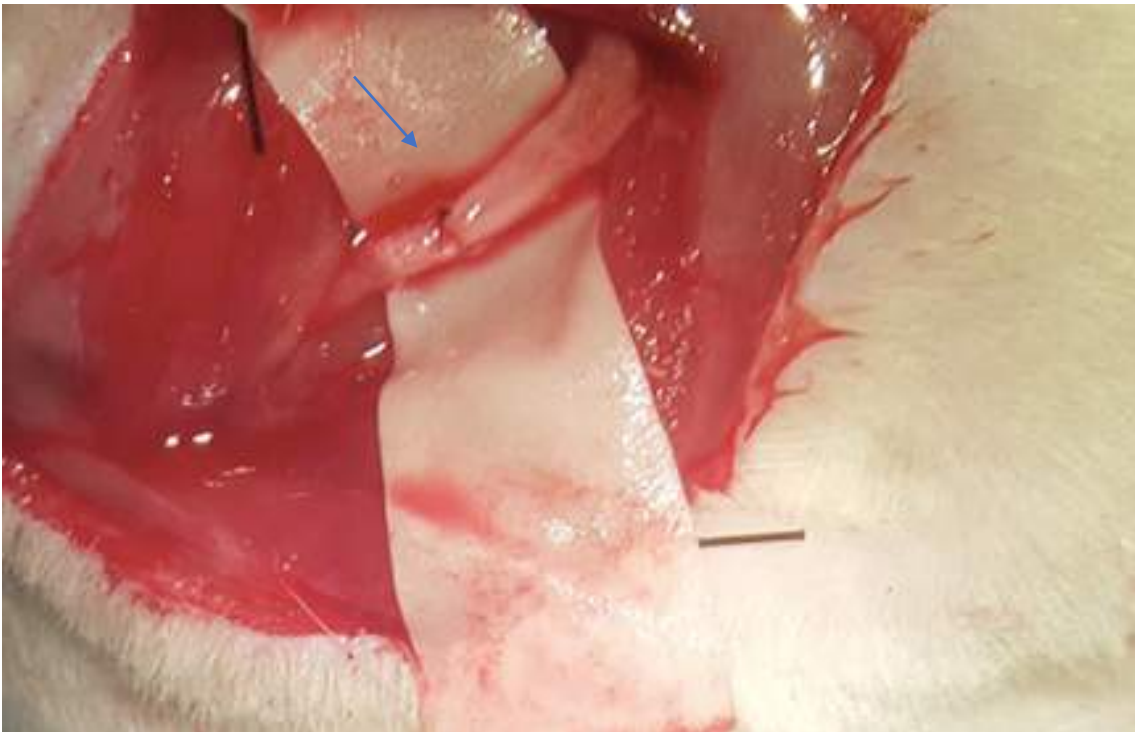


FIGURA 34. Exemplo de sutura epineural.

Fonte: Autor.

5.6. Protocolo anestésico

Os procedimentos anestésico-cirúrgicos foram realizados no Laboratório de Habilidades Médicas e Pesquisa Cirúrgica, da Faculdade de Medicina, da PUCRS. Os animais foram anestesiados através de associação de cloridrato de cetamina ($75\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) e Xilazina ($10\text{mg}\cdot\text{kg}$) (PAIVA *et al.*, 2005) administrados na mesma seringa via intraperitoneal (IP) (Figura 35).



FIGURA 35. Local de injeção do anestésico.

Fonte: www.Bi methodology for laboratory mice. Acesso em 22/12/2017.

5.7. Procedimento cirúrgico

Os animais foram posicionados em decúbito lateral esquerdo, sob anestesia geral, as patas, anteriores e posteriores, esticadas e tricotomizados, após, realizada a desinfecção de rotina (BRAGA-SILVA *et al.*, 2007, LINCHTENFELDS *et al.*, 2012). Através do acesso dorsal da pata direita, uma incisão longitudinal foi realizada 3 mm paralela e posterior ao eixo direito, desde o tubérculo maior do fêmur, até a região póstero lateral do joelho. A pele foi incisada e afastada, o músculo glúteo e o bíceps femoral foram afastados por dissecação e o nervo isquiático foi visualizado, liberado de suas inserções fasciais e dissecado (COSTA *et al.*, 2006, COSTA *et al.*, 2009; LINCHTENFELDS *et al.*, 2012) (Figura 36).

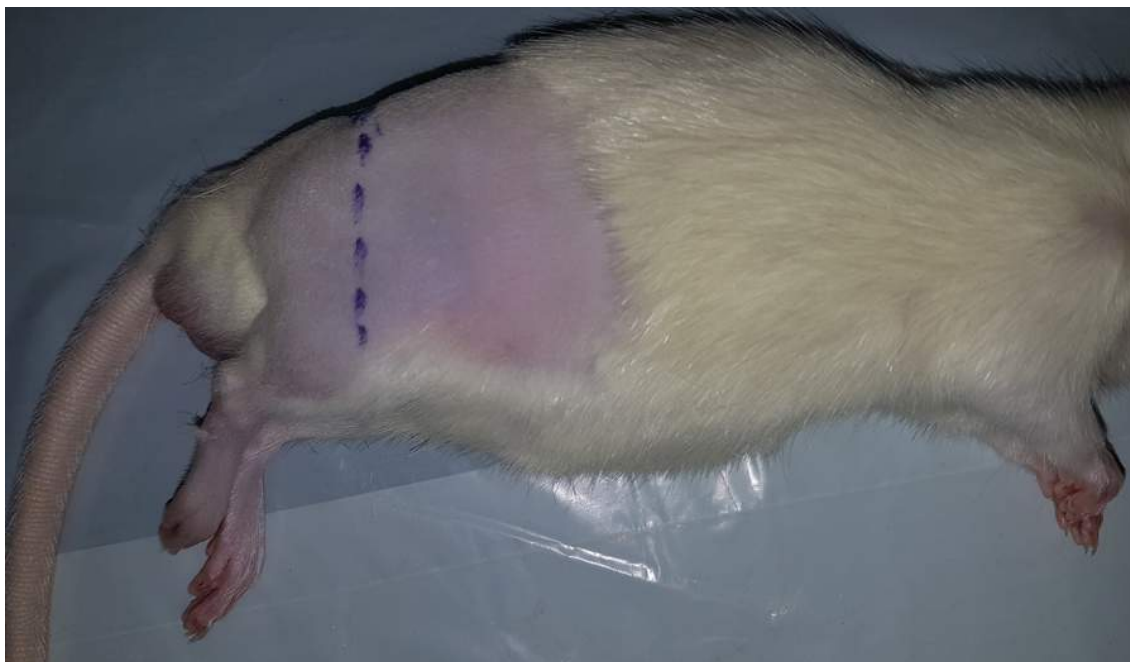


FIGURA 36. Marcação da pele para posterior incisão.

Fonte: Autor

Através do auxílio de microscópio cirúrgico (D.F.Vasconcellos, São Paulo, Brasil), foi criado um defeito linear, com tesoura microcirúrgica, no terço médio proximal, antes da bifurcação do ciático em nervos tibial e fibular comum. A sutura dos grupos EE e ST foi realizada com fio Prolene® 7.0, de maneira que passava inicialmente pela região média do tubo, a seguir pela região epineural do nervo e voltava a passar pelo tubo, ao lado do fio de entrada. Então o ponto foi dado de maneira que os cotos do nervo ficassem em contato direto no meio do tubo (HOUSCHYAR *et al.*, 2016) (Figura 37).

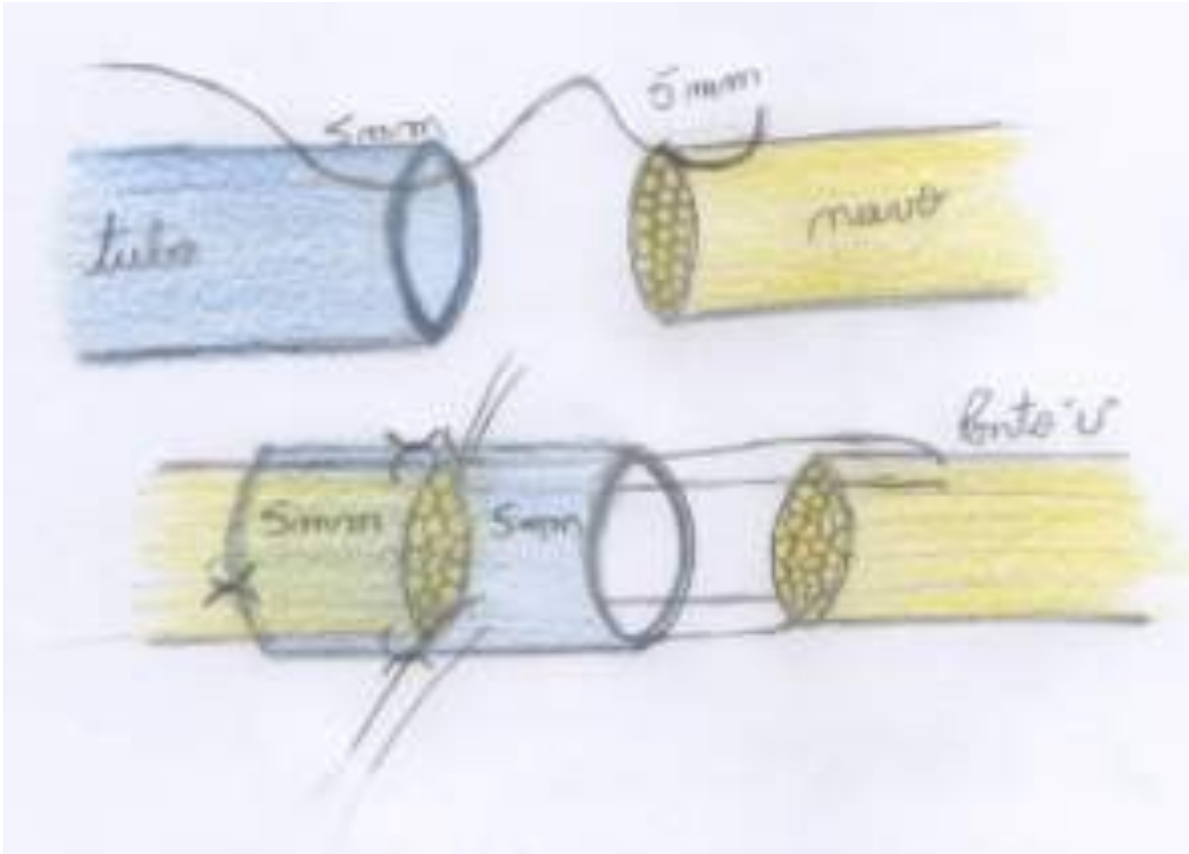


FIGURA 37. Ponto de aproximação dos cotos do nervo utilizado para as duas técnicas.

Fonte: Autor.

Foram realizados alguns testes antes da escolha desse método de aproximação dos cotos. Assim, a conclusão foi que, dessa maneira, haveria menor manipulação do nervo, evitando lesões iatrogênicas, pois nos testes iniciais, a passagem do tubo após sutura, provou várias solturas durante o procedimento. Para fechamento da incisão de acesso em ambos os grupos experimentais, a fâscia lata e a pele foram suturadas separadamente, em padrão contínuo simples e fio monofilamentar de náilon 4-0 (Ethilon®, Johnson & Johnson). No pós-operatório imediato foi administrado cetoprofeno ($5\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, SC, cada 24 horas, durante 2 dias) e cloridrato de tramadol ($5\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, SC, cada 12 horas durante 2 dias), como medicação analgésica/antiinflamatória (HAU *et al.*, 2003, LEBOWSKI *et al.*, 2017). Para o fechamento da incisão de acesso, em todos os grupos experimentais, a fâscia lata e a pele foram suturadas separadamente em padrão contínuo simples e fio monofilamentar de náilon 4-0 (Ethilon®, Johnson & Johnson).

O período de avaliação (até o sacrifício das cobaias) foi determinado de acordo com os achados na revisão bibliográfica que determinaram que a regeneração axonal, nos ramos

cutâneos e musculares, é igual a duas a três semanas após a reparação e eletroestimulação do nervo nesse modelo (BRUSHART *et al.*, 1988; AL-MAJED *et al.*, 2000). Foi determinado que a EE ,a 3 volts e 20 Hz, em corrente contínua por uma hora foi mais eficaz que estímulo contínuo por duas semanas. Acelerando, dessa forma, a regeneração axonal, uma vez que os neurônios motores regeneraram seus axônios dentro de até três semanas, em contraste com um período de oito a dez semanas nos grupos sem estimulação (AL-MAJED *et al.*, 2000; BRUSHART *et al.*,2002; GORDON *et al.*,2009), da mesma maneira que a transecção e reparação cirúrgica no modelo proposto causam um período de reinervação distal ao local da secção se prolonga por mais de 10 semanas (AL-MAJED *et al.*, 2000). A avaliação funcional foi realizada através da análise da marcha – impressão da pegada (walking track analysis), antes do sacrifício.

5.8. Teste de marcha

A medida da recuperação funcional de lesão em nervo ciático de ratos, é o teste de marcha. Esse método foi descrito pela primeira vez por Medinaceli (DE MEDINACELI *et al.*, 1982, DE MEDINACELI *et al.*,1995), em 1982, e, posteriormente, e modificado por Bain (BAIN J.R. *et al.*, 1989). O método descrito vem sendo utilizado de maneira crescente por pesquisadores que trabalham com neurociência e envolve a medida de várias relações: PL = distância do calcanhar até o 3º dedo; TS = distância do 1º ao 5º dedo; IT = distância do 2º ao 4º dedo. Diferentes técnicas são empregadas na obtenção. Os padrões das pegadas para a análise do teste de marcha, podem ser coletadas através de tinta e papel ou ainda com recursos digitais (escâner que avalia a pegada) e computador (KOKA *et al.*, 2001) (Figura 38).

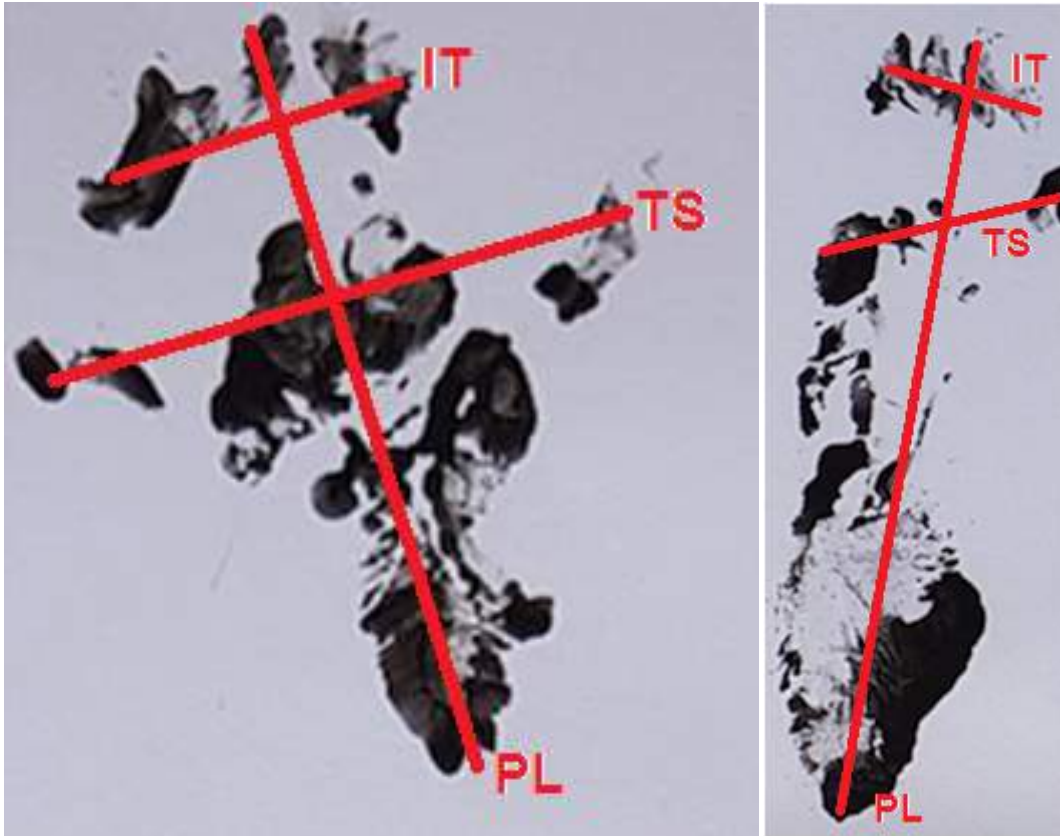


FIGURA 38. Medida das patas de um rato: Pata normal (esquerda) e pata lesada (direita).

Fonte: Autor

Uma complexa fórmula matemática, derivada empiricamente, é usada para comparar as medidas obtidas entre o lado experimental e o lado normal. O valor numérico encontrado através da fórmula é chamado de índice de função ciática. Um SFI igual à (0), indica normal, e (-100) indica rompimento completo do tronco do nervo (como em uma transecção do nervo ciático) (MONTE-RASO *et al.*, 2006; SARIKCIOGLU *et al.*, 2009; VAREJÃO *et al.*, 2001). O SFI foi calculado para nervos normais e para os submetidos a lesão, segundo a equação 1(eq.1):

$$\text{SFI} = -38.8 \left(\frac{\text{EPL}-\text{NPL}}{\text{NPL}} \right) + 109.5 \left(\frac{\text{ETS}-\text{NTS}}{\text{NTS}} \right) + 13.3 \left(\frac{\text{EIT}-\text{NIT}}{\text{NIT}} \right) - 8.8 \quad \text{eq.(1)}$$

Onde:

E: Experimental

N: Normal

PL: *print length*, comprimento da pata (distância do calcanhar até o 3º dedo)

TS: *total spread*, ou espalhar total dos dedos (distância do 1º ao 5º dedo)

IT: *intermediate toes*, ou espalhar dos dedos intermediários (distância do 2º ao 4º dedo).

Para a determinação do SFI, as folhas foram cortadas em tiras de 43 cm de comprimento e 8,7 cm de largura (as mesmas dimensões da passarela), os animais foram posicionados em uma passarela de madeira (43 x 8,7x 5,5 cm) fechada nas laterais e dotada de abrigo para o rato no final do trajeto. Todos os animais foram, primeiramente, treinados por duas ou três vezes para que pudessem reconhecer o local. Frequentemente, durante os treinamentos, os animais paravam no meio do corredor para explorar o local. Após, caminhavam até o final chegando ao abrigo. As patas dos animais foram pintadas com tinta apropriada e suas pegadas ficaram registradas em uma tira de papel que foi posicionada dentro da passarela por onde eles passaram. De posse das pegadas, os parâmetros PL, TS e ITS são coletados manualmente por 2 examinadores para posterior análise através da equação matemática ((KOKA *et al.*, 2001) que está inserida no programa calculando o SFI automaticamente (Figura 39).

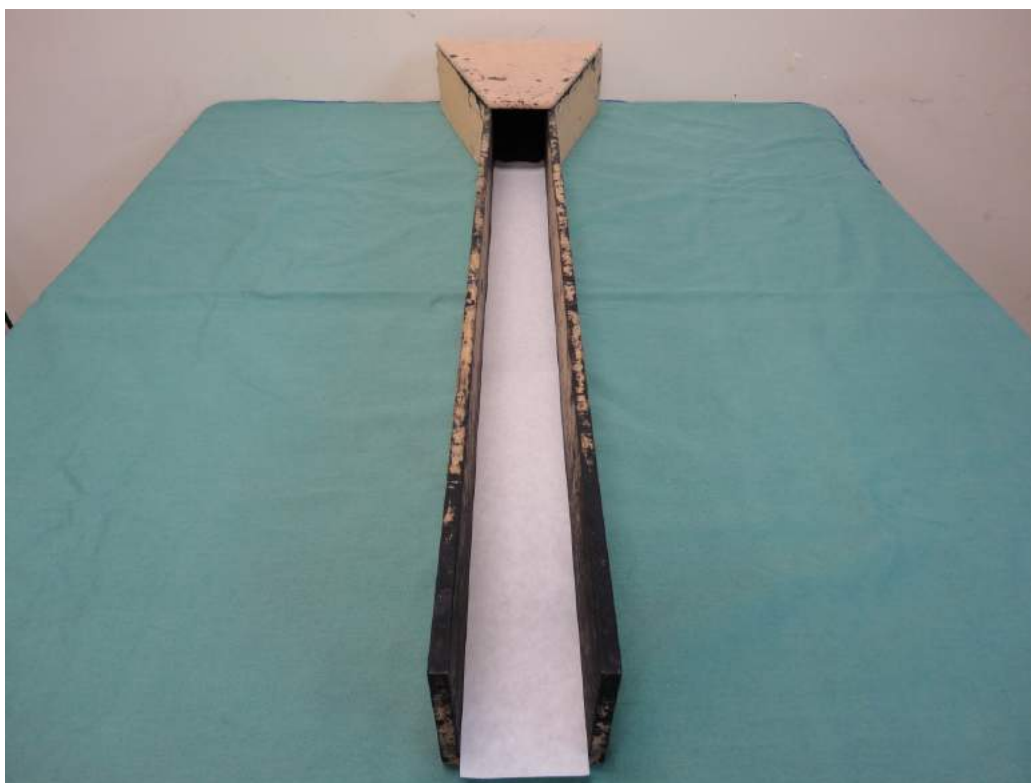


FIGURA 39. Passarela do teste de marcha.

Fonte: Imagem cedida por Goldani et al, 2012.

Os animais foram submetidos ao teste de marcha em passarela ao final dos tratamentos empregados, de acordo com o seu grupo, antes do sacrifício em períodos pré-determinados (três, seis e nove semanas). O Índice de Função Ciática foi calculado através da mensuração das pegadas de cada animal, comparando-se a pata lesada com a não lesada. Na interpretação, valores negativos próximos de cem (-100) indicam disfunção severa do nervo e valores negativos próximos à zero (0) significam disfunção leve ou função normal (SARIKCIOGLU,

2009; VAREJÃO, *et al.*, 2001; VEAS, 2009). Após o teste da marcha os ratos foram novamente anestesiados, o nervo foi abordado cirurgicamente, removido segmento, submetidos ao fechamento da ferida operatória e eutanasiados.

5.9. Eutanásia

Após a análise da macha, com três, seis e nove semanas, os animais foram novamente anestesiados, conforme protocolo anteriormente descrito, e eutanasiados com sobredose anestésica (mesmo protocolo utilizado para os procedimentos cirúrgicos), estando esse método de acordo com a Lei Arouca n. 11.794, de 13 08.10.2008.

5.10. Análise macroscópica e microscópica

Foi observada regeneração neuronal em todos os nervos que mantiveram a sutura intacta. As espessuras do nervo se mantiveram constantes, com exceção das que soltaram dentro do tubo. Algumas desenvolveram neoneuroregeneração, porém, foram excluídas deste estudo. As Figuras 40 e 41 demonstram, aleatoriamente, exemplares dos resultados macroscópicos obtidos.

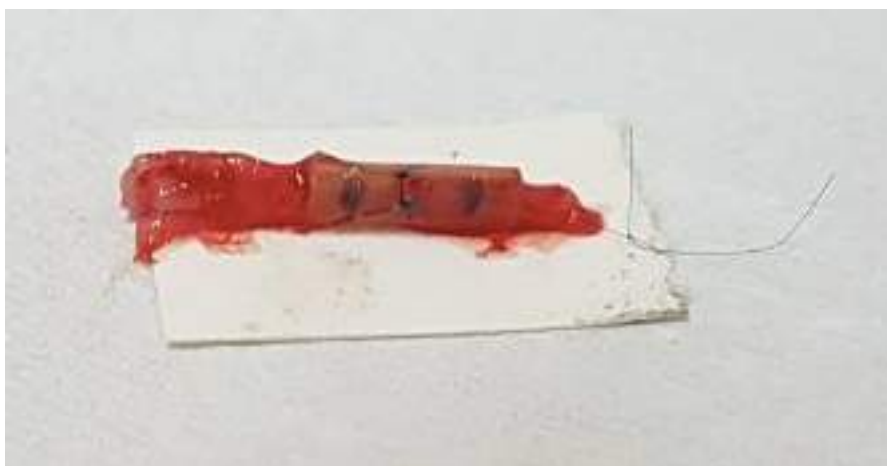


FIGURA 40. Grupo ST (tubo de silicone sem eletroestimulação). Nervo após ressecção, preparado e fixado ao papel, em sua região proximal com fio mononylon 9.0, para possibilidade de identificação da região do nervo durante a análise histológica.

Fonte: Autor



FIGURA 41. Soltura do nervo dentro do tubo, vazio.

Fonte: Autor

Após a retirada do tubo e/ou tubo e fios, as amostras foram fixadas em formaldeído, cortadas e seccionadas transversalmente gerando dois segmentos: proximal e distal no local da regeneração (Figuras 42 e 43).

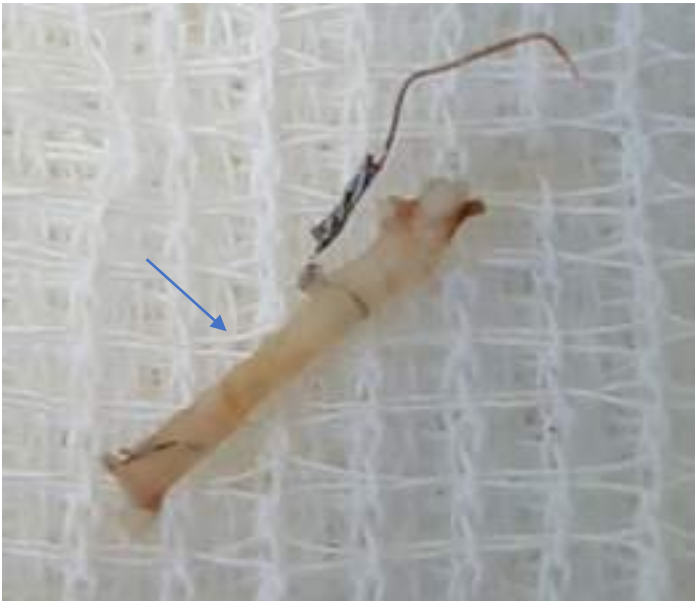


FIGURA 42. Grupo EE (tubo de silicone com eletroestimulação). Nervo após ter sido ressecado, fixação em formol, pode ser observada a presença de possível regenerado (seta), leve afilamento no local (sem solução de continuidade). Após a remoção dos fios condutores de eletricidade, segue a preparação para análise histológica.

Fonte: Autor



FIGURA 43. Peça fixada em formol, grupo SUT (sutura simples). Secção transversal no meio do nervo para envio ao emblocamento e preparação da peça para análise histológica.

Fonte: Autor

O corte foi realizado no epicentro do nervo, região que foi quantificada na histologia. Posteriormente, foram lavadas com uma solução de óxido de propileno e embebidas em parafina em um molde com cavidades de 5 mm de profundidade. Esse molde oferece orientação e ângulo de corte adequados para as secções do nervo. As amostras foram clivadas em cortes semifinos de 3 micrometros em micrótomo. Foram transferidas para lâminas de vidro em água, secas em platina a 50-60°C e coradas com azul de toluidina a 1% em ácido bórico saturado para observação em microscopia de luz. Também foram coradas com hematoxilina e eosina. As lâminas foram analisadas por especialista cegado em relação ao delineamento do estudo em microscópio óptico Olympus® BX40. Os parâmetros avaliados histologicamente foram o número de células e a área do nervo. O número de células foi mensurado através da média, selecionando de forma randomizada 10 campos em aumento de 200x. (SCHMALBRUCH H. *et al.* 1986).

As fibras nervosas possuem uma distribuição heterogênea ao longo de um corte transversal do nervo, podendo ser vistas em maior ou menor densidade. Além disso, o tamanho do diâmetro das fibras pode ser muito diferente de uma região para outra no mesmo fascículo nervoso (GEUNA S. *et al.*, 2000). Portanto, a seleção dos campos histológicos, de onde são retiradas as imagens das amostras, pode influenciar fortemente as estimativas finais da análise morfométrica. Assim, a seleção dos campos histológicos deverá respeitar a regra de igualdade de oportunidades para os diferentes perfis de fibras, a fim de evitar uma estimativa tendenciosa. Dessa forma, a seleção deve ocorrer de maneira aleatória, contemplando igualmente a região

periférica e central, com o objetivo de oferecer oportunidades iguais para os diferentes perfis de fibras nervosas e sua heterogênea distribuição ao longo nervo.

As análises estereológicas dos nervos ciáticos foram realizadas de acordo com os princípios descritos anteriormente. Uma estação de trabalho foi montada com o uso de um microscópio ligado a um computador. Foi utilizado o *software* Image Pro Plus para processamento de imagem. Esse software fornece uma coleção de ferramentas fáceis de usar para análise das lâminas. Apresenta acoplado um capturador de imagem (Quick Capture Image) que foi utilizado para capturar as imagens visualizadas, permitindo processar rapidamente as imagens diretamente em sua estação de captação para garantir alta qualidade, precisão e reprodutibilidade. Após a captura da imagem, foi aplicado programa Grid mask (uma moldura de contagem) e a área amostrada foi escolhida de maneira sistemática, uniforme e aleatória, sendo uma evolução do método estereológico aplicado por Gundersen e Geuna (GUNDERSEN *et al.*, 1988, GEUNA *et al.*, 1999, RAGBETLI *et al.*, 2013). As fibras localizadas no interior do campo e aquelas que tocassem a borda superior e esquerda do mesmo eram incluídas para a análise morfométrica (GEUNA *et al.*, 1999) (Figura 44).

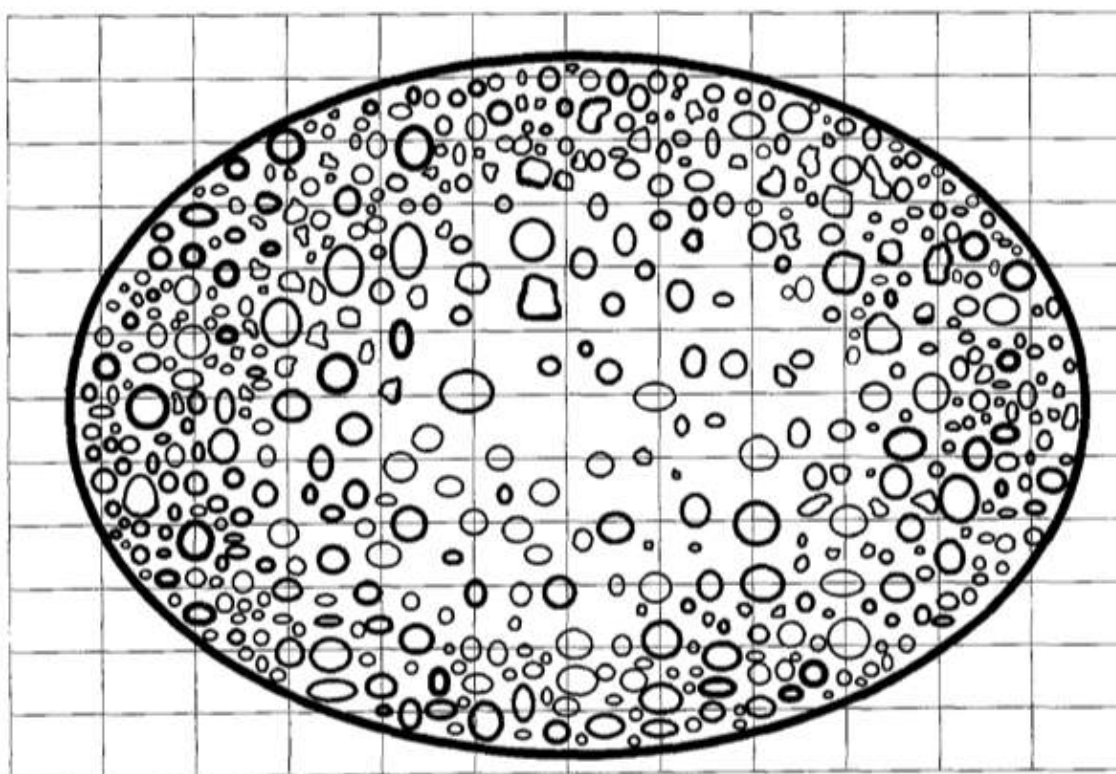


FIGURA 44. Corte transversal do nervo, demonstrando a distribuição heterogênea tanto da localização, quanto o tamanho do diâmetro das fibras no mesmo feixe nervoso.

Fonte: GEUNA *et al.*, 1999.

Nos cortes histológicos foi observada a presença de células de Schwann e a área do nervo na região do regenerado nos três grupos de estudo. Pela análise das Figuras 45 e 46 pode-se observar que, independentemente do segmento analisado, há presença de células de Schwann assim como quantidades variáveis de axônios.

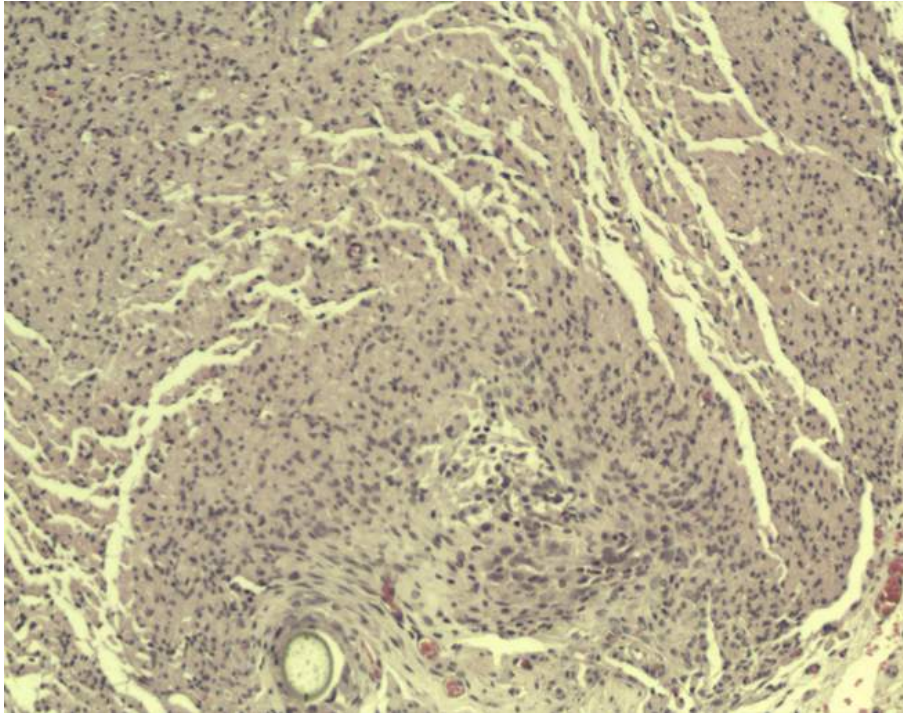


FIGURA 45. Imagem capturada de tela com aumento de 200 vezes.
Fonte: Autor

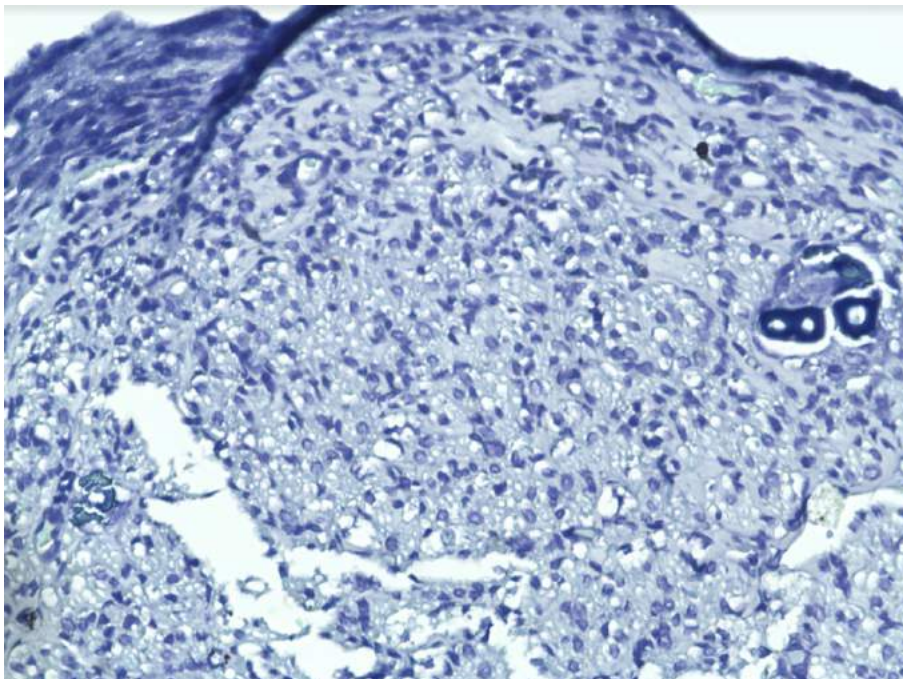


FIGURA 46. Captura de tela com aumento de 200 X.
Fonte: Autor

5.11. Análise estatística

Os dados quantitativos foram apresentados como média e erro-padrão, sendo os grupos comparados pelo procedimento de Equações de Estimativas Generalizadas (GEE: *Generalized Estimating Equations*) tanto no eixo entre grupos, como no eixo intra grupo. Comparações post-hoc foram obtidas pelo método de Sidak. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Os dados foram analisados com o programa SPSS, versão 22.0.

5.12. Aspectos bioéticos

Este trabalho seguiu as normas bioéticas estabelecidas pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) e/ou CEUA (Comitê de Ética para o Uso de Animais) do Hospital São Lucas – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), além de estar em conformidade com a resolução 714 de 20 de junho de 2002, do Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV) e com o Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). O estudo foi realizado respeitando os preceitos para minimizar a dor e o sofrimento dos animais. Todos os procedimentos que, de alguma forma, pudessem causar dor, angústia ou sofrimento (incluindo os procedimentos cirúrgicos e a eutanásia) para com os animais, foram realizados sob anestesia geral (descrita anteriormente). A pesquisa em questão foi aprovada pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais (CEUA), da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS) sob o número de protocolo 17/7396 (Anexo A).

6. RESULTADOS

6.1. Análise funcional por teste de marcha

Os animais não se apoiavam sobre a pata operada, apresentavam o pé caído e os dedos em completa adução, como resultado da grave disfunção do nervo ciático. Eles gradualmente recuperaram a capacidade de fazer apoio sobre o membro operado e espalhar os dedos. A função do ciático dos animais foi avaliada por teste de marcha em três, seis e nove semanas de pós-operatório. Os valores do índice de função ciática (SFI) foram bem variáveis no decorrer dos períodos (Tabelas 3 e 4 e Figura 47). Foram avaliadas 180 impressões de pegadas nos 90 ratos, comparando o lado normal ao lado lesado.

TABELA 3. Média (\pm desvio padrão) do Índice de função ciática (SFI) para comparação entre os grupos EE, ST e SUT em três, seis e nove semanas de pós-operatório.

	Grupo	Média \pm desvio padrão	p
SFI três semanas	EE	-76,0 \pm 9,9	0,201
	ST	-78,4 \pm 28,3	
	SUT	-84,1 \pm 13,1	
SFI seis semanas	EE	-77,0 \pm 9,0	0,099
	ST	-58,7 \pm 36,7	
	SUT	-66,0 \pm 30,7	
SFI nove semanas	EE	-87,9 \pm 9,69	<0,001
	ST	-77,0 \pm 12,0	
	SUT	-67,6 \pm 26,8	

Valor de p em relação ao total para cada período avaliado (três, seis e nove semanas) GEE (equações de estimativas generalizadas), EE (eletroestimulação), ST (sutura e tubo), SUT (sutura).

Na comparação entre os três grupos com nove semanas, houve diferença significativa relacionada à recuperação funcional para o grupo SUT em relação ao grupo EE.

TABELA 4. Média (\pm desvio padrão) do índice de função do ciático para comparação dentro do mesmo grupo em diferentes períodos de tempo, com três, seis e nove semanas de pós-operatório.

Grupo	Média \pm desvio padrão	P
EE três semanas	-76,0 \pm 9,9	
EE seis semanas	-77,0 \pm 9,0	<0.001
EE nove semanas	-87,9 \pm 9,69	
ST três semanas	-78,4 \pm 28,3	
ST seis semanas	-58,7 \pm 36,7	0,177
ST nove semanas	-77,0 \pm 12,0	
SUT três semanas	-84,1 \pm 13,1	
SUT seis semanas	-66,0 \pm 30,7	0,116
SUT nove semanas	-67,6 \pm 26,8	

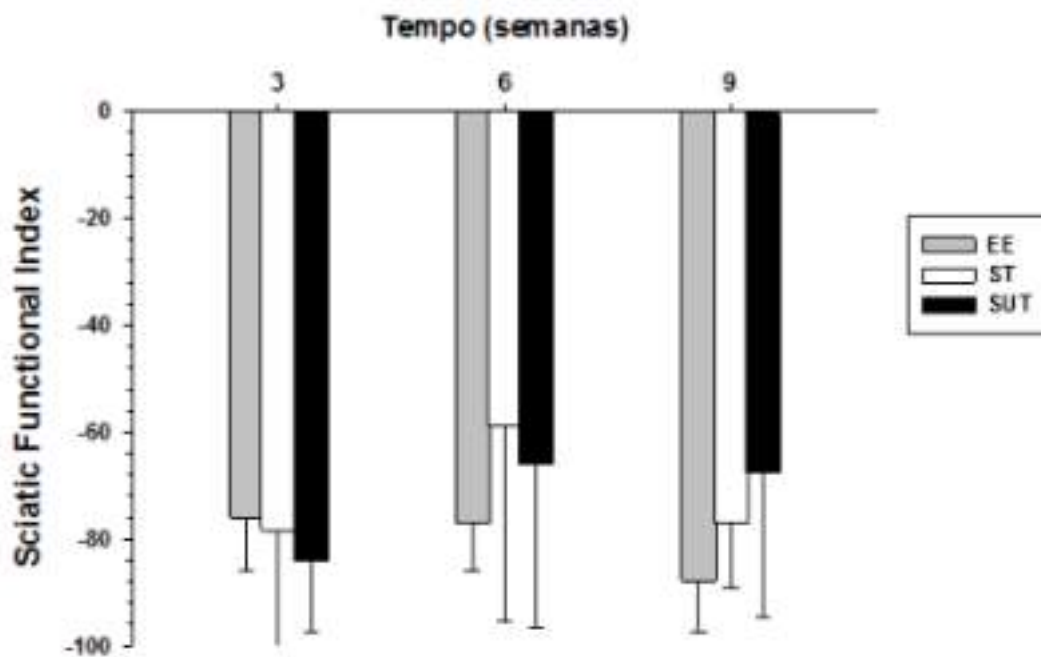


FIGURA 47. Gráfico do SFI.

Fonte: Autor

Na comparação dentro do mesmo grupo, houve resultado significativo com relação à recuperação funcional apenas para o grupo um (EE).

6.2. Análise morfométrica

A análise dos resultados morfométricos foram realizados através da análise do número de células e análise da área do nervo.

6.2.1. Área do nervo

As tabelas 5, 6, 7 e 8 e a Figura 48 abaixo apresentam os dados descritivos das áreas dos nervos (μm^2) analisados.

TABELA 5. Valor médio da área (μm^2) no grupo EE com três, seis e nove semanas.

Grupo EE	Média (\pm desvio padrão)	P
Três semanas	625.195 \pm 140.180	
Seis semanas	439.826 \pm 264.294	0,101
Nove semanas	472.660 \pm 199.406	

Não houve diferença significativa com relação a área do nervo dentro do mesmo grupo, independente do período de tempo avaliado.

TABELA 6. Valor médio da área (μm^2) no grupo ST com três, seis e nove semanas.

Grupo ST	Média (\pm desvio padrão)	P
Três semanas	352.689 \pm 141.487	
Seis semanas	513.408 \pm 282.690	0,001
Nove semanas	450.340 \pm 293.543	

Houve diferença significativa com relação a área do nervo dentro do mesmo grupo, entre o período inicial de três semanas e seis semanas.

TABELA 7. Valor médio da área (μm^2) para comparação no grupo SUT com três, seis e nove semanas.

Grupo SUT	Média (\pm desvio padrão)	P
Três semanas	523.429 \pm 355.041	
Seis semanas	395.718 \pm 226.413	0,001
Nove semanas	369.428 \pm 116.801	

Houve diferença significativa com relação a área do nervo dentro do mesmo grupo, entre o período inicial de três semanas e os outros dois subgrupos.

TABELA 8. Área (μm^2) para comparação entre os grupos EE, ST e SUT em três, seis e nove semanas de pós-operatório.

	Grupo	Média \pm desvio padrão	P
Três semanas	EE	625.195 \pm 140.180	
	ST	352.689 \pm 141.487	<0,001*
	SUT	523.429 \pm 355.041	
Seis semanas	EE	439.826 \pm 264.294	
	ST	513.408 \pm 282.690	0,694
	SUT	395.718 \pm 226.413	
Nove semanas	EE	472.660 \pm 199.406	
	ST	450.340 \pm 293.543	0,316
	SUT	369.428 \pm 116.801	

Valor de p em relação ao total para cada período avaliado (três, seis e nove semanas)

Diferença significativa ao nível de 1%

Fonte: Autor.

Na comparação entre os três grupos houve resultado com relação a área do nervo significativamente melhor para o grupo da EE no período de três semanas.

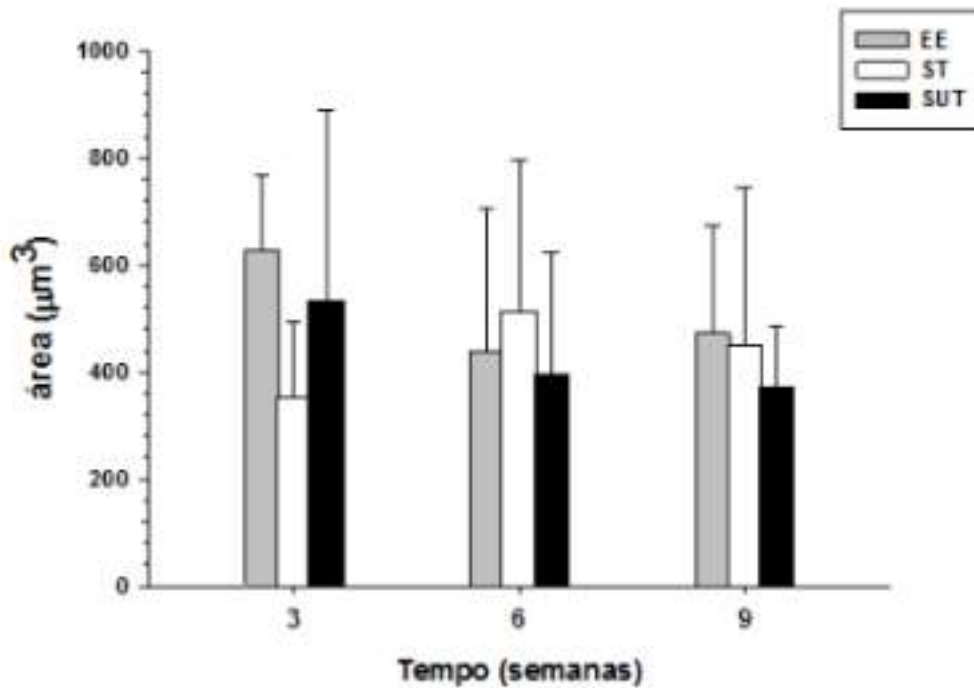


FIGURA 48. Gráfico da área do nervo.

Fonte: Autor

6.2.2. Número de células

As tabelas 10-14 e figura 49 abaixo apresentam os dados descritivos do número de células de Schwann dos nervos analisados.

TABELA 9. Valor médio número de células de Schwann para comparação no grupo EE com três, seis e nove semanas.

Grupo EE	Média (\pm erro padrão)	P
Três semanas	2756 \pm 956.83	
Seis semanas	2865.25 \pm 1355.76	0,484
Nove semanas	2439.28 \pm 462.04	

Não houve diferença significativa com relação ao número de células de Schwann dentro do mesmo grupo, independente do período de tempo avaliado.

TABELA 10. Valor médio número de células de Schwann no grupo ST com três, seis e nove semanas.

Grupo ST	Média (\pm desvio padrão)	P
Três semanas	2887.00 \pm 1451,82	
Seis semanas	2199.83 \pm 894.99	0,476
Nove semanas	2071.85 \pm 976.80	

Não houve diferença significativa com relação ao número de células de Schwann dentro do mesmo grupo, independente do período de tempo avaliado.

TABELA 11. Valor médio número de células de Schwann no grupo SUT com três, seis e nove semanas.

Grupo SUT	Média (\pm desvio padrão)	P
Três semanas	3033.12 \pm 1356.46	
Seis semanas	2289.57 \pm 1196.18	0,003
Nove semanas	1698.87 \pm 734.31	

Houve diferença significativa com relação ao número de células de Schwann dentro do mesmo grupo, independente do período de tempo avaliado, estatisticamente melhor no período de três semanas.

TABELA 12. Valor médio número de células de Schwann entre os grupos com três semanas.

Grupos	Média (\pm desvio padrão)	P
EE	2756 \pm 956.83	
ST	2887.00 \pm 1451,82	0,861
SUT	3033.12 \pm 1356.46	

Não houve diferença significativa com relação ao número de células de Schwann entre os grupos para o período de três semanas.

TABELA 13. Valor médio número de células de Schwann entre os grupos com seis semanas.

Grupos	Média (\pm desvio padrão)	P
EE	2865.25 \pm 1355.76	
ST	2199.83 \pm 894.99	0,217
SUT	2289.57 \pm 1196.18	

Não houve diferença significativa com relação ao número de células de Schwann entre os grupos para o período de seis semanas.

TABELA 14. Valor médio número de células de Schwann entre os grupos com nove semanas.

Grupos	Média (\pm desvio padrão)	P
EE	2439.28 \pm 463.04	
ST	2071.85 \pm 976.80	0,033
SUT	1698.87 \pm 734.31	

Houve diferença significativa com relação ao número de células de Schwann entre os grupos da EE e SUT para o período de nove semanas.

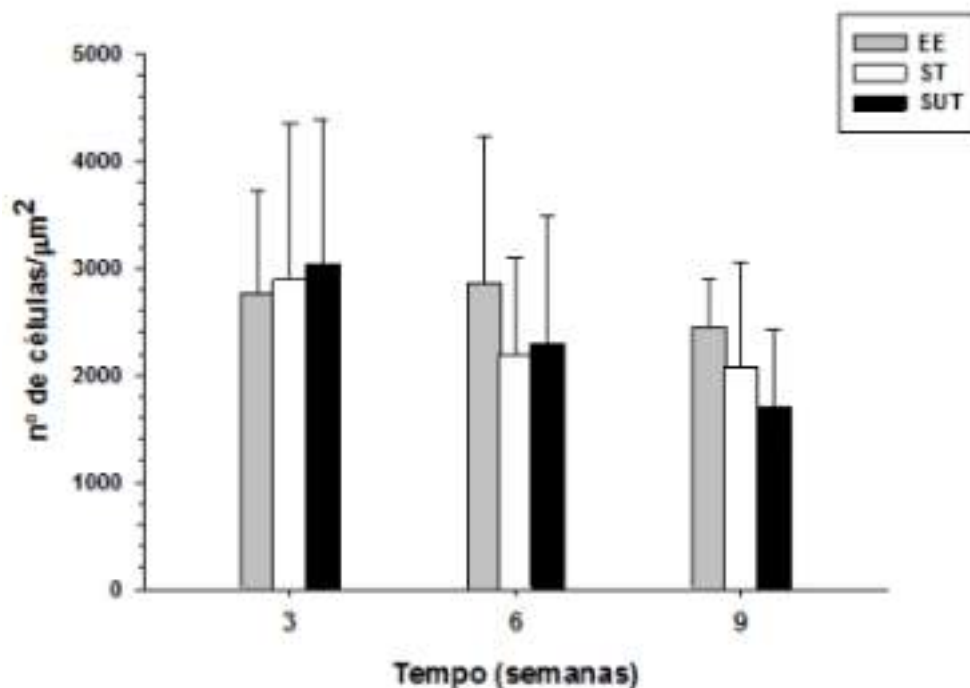


FIGURA 49. Gráfico do número de células.

Fonte: Autor

7. DISCUSSÃO

Nas lesões dos nervos periféricos, o principal resultado desejado é a recuperação funcional do órgão efêtor. Neste trabalho foi constatado que, mesmo apresentando poucas diferenças morfológicas e morfométricas significantes, poderá ocorrer recuperação funcional. Avaliações funcionais são muito difíceis em animais, mas De Medinaceli e colaboradores introduziram o método do SFI de ratos, posteriormente modificado por outros autores (BAIN *et al.*, 1989; MACKINNON *et al.*, 1985), que permite avaliar satisfatoriamente a recuperação do nervo ciático lesado em função do tempo. Apresenta fácil aplicação e baixo custo para realização, além de ser um método não invasivo.

Nessa pesquisa foi comparada a recuperação funcional e aspectos morfométricos nos três tipos de tratamento já citados anteriormente. Durante a realização da pesquisa, ocorreram vários fatores que podem ter interferido na hipótese dessa pesquisa tornando-a nula. Na avaliação da recuperação funcional, entre os grupos de EE, ST e SUT, com três semanas, não houve diferença estatística significativa. Também foi comparada a recuperação funcional entre

os grupos de EE, ST e SUT, com seis semanas, que também não demonstrou diferença estatística entre os mesmos grupos. Finalmente, foi comparada a recuperação funcional, entre os grupos com nove semanas, que apresentou resultado estatisticamente significativo no teste funcional da marcha dos ratos, submetidos ao tratamento padrão (sutura microcirúrgica simples). Quando realizada a comparação dentro do mesmo grupo, aquele em que foi aplicada EE com três semanas, apresentou recuperação funcional adequada (estatisticamente significativa), o que corrobora com a literatura de que uma única eletroestimulação durante 1 hora, na frequência de 20 Hz e tensão de 3V, aceleram a regeneração nervosa e a recuperação funcional adequada. Isso porque se entende que pode ter ocorrido bioincompatibilidade dos materiais, os grupos em que os materiais metálicos permaneceram mais tempo implantados (mais do que três semanas), apresentaram queda na recuperação funcional e influenciaram negativamente nos resultados. Nos outros dois grupos, levando em consideração a diferença de tempo para a análise, não houve diferença estatística significativa.

Quanto à influência de fatores externos, é muito importante ressaltar alguns problemas no decorrer da pesquisa que influenciaram os resultados funcionais e histológicos obtidos nos grupos de eletroestimulação e sutura com tubo. Dentre eles, a confecção artesanal do tubo que impede a precisão das medidas, mas, mais importante do que isso, a utilização do cobre, metal utilizado na confecção da parte interna do tubo que, embora, apresentasse um ‘banho’ de estanho (material biocompatível e utilizado em ligas metálicas para a realização de implantes), não foi suficiente para evitar o efeito irritativo do cobre, mesmo que por um curto período de tempo, acarretando no desenvolvimento de fibrose acentuada, circundando o dispositivo implantado (fio-tubo) no nervo, o que pode ter inibido a recuperação funcional adequada. Isso pôde ser percebido no decorrer das semanas em que foram realizadas as EE, uma vez que, na grande maioria dos ratos, com exceção daqueles eutanasiados com três semanas, houve a necessidade de reintervenção cirúrgica nesse grupo, para possibilitar a realização de nova eletroestimulação, posto que os ratos roeram e arrancaram os fios rompendo até a região da solda. Isso não foi detectado na análise histológica, provavelmente pelo curto período de tempo estipulado para a mesma.

Com relação à análise histológica, foi evidenciada diferença significativa com relação ao número de células de Schwann, entre os grupos da EE e SUT, para o período de nove semanas, o que pode indicar a ocorrência de que uma regeneração melhor estivesse ocorrendo, não manifestada através do teste funcional, devido a possível irritação causada pelo cobre. Entre os outros grupos, não houveram diferenças estatisticamente significativas, porém como

apresentavam um bom número de células de Schwann, com distribuição regular e pouco tecido conjuntivo entre as fibras, refletiu que estava ocorrendo o processo de regeneração nervosa no sítio estudado de maneira adequada.

A análise morfométrica após lesão traumática de nervo não reproduz a capacidade funcional. Diversos autores não encontraram relação entre SFI e análises morfométricas, estando de acordo com os achados desta pesquisa.

O resultado da recuperação funcional, quando aplicada uma única vez a EE com frequência de 20 Hz e 3 V, foi compatível com os estudos já realizados, porém a hipótese de que haveria uma melhora dos resultados no grupo da EE, se a mesma fosse aplicada novamente com três e seis semanas, foi nula.

A regeneração de nervos, observada em estudos experimentais apresenta aspectos controversos, porque nem sempre é possível estabelecer uma relação clara entre os resultados obtidos por diferentes métodos numa mesma investigação, nem entre os resultados obtidos por um mesmo método, empregado em investigações diferentes ou conduzidas por autores diferentes. A maioria dos estudos sobre a regeneração dos nervos emprega métodos histomorfométricos e eletrofisiológicos, os quais, embora essenciais, não adiantam nenhuma informação sobre a recuperação funcional correspondente, o que seria de maior interesse.

8. CONCLUSÕES:

- O grupo da EE com três semanas, se comparado com os grupos da EE com seis e nove semanas, apresentou recuperação funcional adequada estatisticamente significativa.

- A hipótese de que em caso de novas eletroestimulações, com intervalos de três semanas haveria melhora da recuperação funcional, foi nula. Supõe-se que fatores relacionados à falta de biocompatibilidade dos materiais influenciaram negativamente. Dessa forma os melhores resultados para recuperação funcional, ao final das nove semanas, foram obtidos no grupo da sutura padrão. Essa, embora com regeneração mais lenta, não sofreu influência de fatores externos (fio-tubo) que os outros dois grupos sofreram.

- O grupo da SUT ao final de nove semanas, na comparação intergrupos apresentou resultado melhor, estatisticamente significativo.

- O grupo EE apresentou resultado superior com relação ao número de células de Schwann, estatisticamente significativo relacionado ao grupo SUT, no período de nove

semanas. O que pode indicar a ocorrência de que uma regeneração melhor estivesse ocorrendo, não manifestada na análise funcional devidos aos fatores relacionados a biocompatibilidade.

- Embora, neste trabalho o resultado tenha sido insatisfatório quanto à hipótese, entende-se que uma vez sanadas as dificuldades relacionadas à biocompatibilidade e ao fato de que as cobaias roeram os fios que estavam localizados externamente, a EE direta nos nervos periféricos tem apresentado resultados promissores na literatura e deve continuar sendo estudada.

- O uso de eletroestimulação com dispositivos implantáveis sem fio, em que seja realizada por indução, poderão futuramente validar a hipótese desta pesquisa. Também a nanotecnologia, provavelmente, pode levar a avanços na cirurgia dos nervos periféricos, que poderá se tornar um novo meio de modulação da ativação dos impulsos nervosos. Essas descobertas têm implicações potencialmente significativas para o projeto de materiais especiais nano-aprimorados, que podem ser usados para promover a cicatrização, controlar a infecção, evitar incompatibilidade e restaurar a função, auxiliando na regeneração do nervo e recuperação funcional.

- Não foram encontradas na literatura revisada outras pesquisas que tenham realizado a comparação entre esses três métodos e, tampouco nos períodos de tempo estabelecidos para esse trabalho.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-MAJED A. A, Neumann C.M., Brushart T.M., Gordon T. **Brief electrical stimulation promotes the speed and accuracy of motor axonal regeneration.** J Neuroscience. Apr 1;20(7):2602-8 (2000).

ALSHADWI A., Nadershah M. **Surgical repair of trigeminal nerve injuries.** Chapter 5 of Advanced Oral and Maxillofacial Surgery Volume 3. 31 August 2016.

ALVITES R. D., Santos A.R. de C., Maurício ACP de C., Varejão A.S.P. **Olfactory Mucosa Mesenchymal Stem Cells and Biomaterials: A New Combination to Regenerative Therapies after Peripheral Nerve Injury.** InTECH pages 77-97. 2017.

ANDERSON M., Shelke N. B., Manoukian O. S., Yu X., McCullough L.D., Kumbar S.G. **Peripheral Nerve Regeneration Strategies: Electrically Stimulating Polymer Based Nerve Growth Conduits.** Crit Rev Biomed Eng. 2015; 43(2-3): 131–159.

BAIN J.R., Mackinnon S.E., Hunter D.A. **Functional Evaluation of Complete Sciatic, Peroneal, and Posterior Tibial Nerve Lesions in the Rat.** Plast Reconstr Surg. 1989;83(1):129-38.

BATISTON B., Geuna S., Ferrero M., Tos P. **Nerve repair by means of tubulization: literature review and personal clinical experience comparing biological and synthetic conduits for sensory nerve repair.** Microsurgery, 2005;25(4):258-67.

BIOMETHODOLOGY FOR LABORATORY MICE. Disponível em: http://theodora.com/rodent_laboratory/. Injection, sites and volume (1995-2008). Acesso em 15 jun 2016.

BIRCH R. **Nerve Repair.** Chapter 32. Greens Operative Hand Surgery 6th Edition, Kindle Edition by Scott W. Wolfe (Author), William C. Pederson (Author), Robert N. Hotchkiss (Author), Scott H. Kozin (Author), Mark S Cohen (Author), nov. 2010. 2392 p.

BRAGA-SILVA J., Roman D., Javier A., Cantarelli M. D., Costa da Costa J., Faúndez M., Vieira Orsi V., Braga R. **Modelo experimental de lesão raquimedular em ratos com dispositivo para acesso de agentes terapêuticos locais.** Acta ortop. Bras. vol.15 no.3 São Paulo, pp. 155-157 (2007).

BRAGA-SILVA Jefferson. **The use of silicone tubing in the late repair of the median and ulnar nerves in the forearm.** J Hand Surg Br. 1999 Dec;24 (6):703-6.

BRESHAH M.N., Sadakah A.A., Eldrieny E.A., Saad K.A. **Functional and histological evaluation of rat sciatic nerve anastomosis using cyanoacrylate and fibrina glue.** Tanta Dental Journal 10 67-74 (2013).

BRUSHART T.M. **Preferential reinnervation of motor nerves by regenerating motor axons.** J Neuroscience 8: 1026 – 1031 (1988).

BRUSHART T.M. **Motor axons preferentially reinnervate motor pathways.** J Neuroscience 13: 2730 – 8 (1993).

BRUSHART T.M., Hoffman P. N., Royall R. M., Murinson B. B., Witzel C., and Gordon T., PhD. **Electrical Stimulation Promotes Regeneration without Increasing Its Speed or conditioning the Neuron.** The Journal of Neuroscience. August 1, 22(15): 6631-6638 (2002).

CHALFOUN C.T., Wirth G.A., Evans G.R. **Tissue engineered nerve constructs: where do we stand?** J Cell Mol Med. 2006 Apr-Jun;10(2):309-17.

COLLI B. O., Júnior C. G. **Nervos periféricos: Diagnóstico e tratamento Clínico e Cirúrgico.** Aspectos gerais das lesões traumáticas agudas dos nervos periféricos. Capítulo 6. Pág. 39- 54. Nervos periféricos: Diagnóstico e tratamento Clínico e Cirúrgico. Rio de Janeiro, (2003).

COSTA M. P., Cunha A. S., da Silva C.F., Filho T. E. P. de B, Ferreira M. C. **A utilização do tubo de ácido poliglicólico e FK 506 na regeneração de nervos periféricos.** Acta ortop. Bras. vol.14 no.1 São Paulo, (2006).

COSTA M. P., Cunha A. S., da Silva C.F., Filho T. E. P. de B, Costa H. J. Z. R., Ferreira M. C. **Tube de ácido poliglicólico e GM1 na regeneração de nervos periféricos.** Acta Ortop Brasileira 17(5):286-90 (2009).

CULLEN D. K., Bryan Pfister B. **State of the art and future Challenges in Neural Engineering: Strategies for nervous System Repair Foreword/ Editor's commentary (volume 2).** Critical Reviews in Biomedical Engineering. 39(2): 79-80 (2011).

DAZA C.H.M., Rengifo YR, Rubio JJS, Alzate LH, Hurtado H. **Câmaras de silicóna como injerto nervioso, análisis de la especialidad de regeneración del nervio peroneal o tibial: estudio experimental em ratas.** Rev Colomb de Ortop y Traumatol. 1993;13(3):285-92.

DE MEDINACELLI L., Freed W. J., Wyatt RJ. **An Index of the functional condition of rat sciatic nerve based on measurements made from walking tracks.** Exp Neurology, 77: 634-643 (1982).

DE MEDINACELLI L. **Interpreting nerve morphometry data after experimental traumatic lesions.** J Neurosci Methods. May;58(1-2):29-37 (1995).

DORETTO, D. **Fisiopatologia Clínica do Sistema Nervoso.** RJ: Atheneu,1996.

ELECTRICITY. In: The editors of Encyclopedic Britannica, SAMPAOLO M., 31 may 2017. Disponível em: <https://www.britannica.com/> Acesso em 20 set. 2017.

EVANS R.D.G. **Challenges to nerve regeneration.** Semin Surg Oncol. 2000 Oct-Nov;19(3):312-8.

GARTNER L.P., Hiatt J.L. **Color text book of histology.** 3^o ed. Philadelphia: Saunders; 2006.

GEUNA S., Tos P., Battiston B., Guglielmone R. **Verification of the two-dimensional disector, a method for the unbiased estimation of density and number of myelinated nerve fibers in peripheral nerves.** Ann Anat. 2000 Jan;182(1):23-34.

GOLDANI E. Efeito do Tacrolimus (FK506) aplicado em minibombas de infusão osmótica na regeneração do nervo ciático de ratos wistar. Tese de Doutorado. Porto Alegre. (2012).

GORDON T., Sulaiman O.A.R, and Ladak A. Eletrical Stimulation for improving nerve regeneration: Where do we stand? International Review of Neurobiology. Vol 87(2009).

GORDON T., Eva P, Borschel G. H. Delayed peripheral nerve repair: methods, including surgical ‘cross bridging’ to promote nerve regeneration. Neural Regeneration Research. Year 2015, vol. 10, Issue 10. Page 1540-1544 (2015).

GORDON T., Fu S.Y. Long-term response to nerve injury. Adv Neurol. 1997; 72:185-99.

GORDON Tessa. Nerve Regeneration: Understanding Biology and Its Influence on Return of Function After Nerve Transfers. Hand Clin. 2016 May;32 (2):103-17.

GRIFFIN J.W., Hogan M.V., Chhabra A. B, Deal D.N. Peripheral Nerve Repair and Reconstruction. Current Concepts Review. Copyright 2013 by The Journal of Bone and Joint Surgery Incorporated.

GRINSELL D., Keating C.P. Peripheral Nerve Reconstruction after Injury: A Review of Clinical and Experimental Therapies. Review article. BioMed Research International. Volume 2014 (2014), Article ID 698256, 13 pages.

Guidelines da Universidade de Michigan. Laboratory mice. March, 2017.

GUIMARÃES L.S.P., Hirakata V.N. Uso do modelo de equações de estimações generalizadas na análise de dados longitudinais. Rev HCPA 2012;32 (4).

GUNDERSEN H.J.G., Bagger P., Bendtsen T.F., Evans S.M., Korbbo L., Marcussen N., Moller A., Nielsen K., Nyengaard J.R., Pakkenberg B., Sorensen F.B., Vesterby A., West M.J. The new stereological tools: Dissector, fractionator, nucleator and point sampled interepts and their use in pathological research and diagnosis. APMIS 96: 857-881(1988).

GUNDERSEN T.F., Bendtsen, L. Korbbo. N. Marcussen, A. Moller, K. Nielsen, J.R. Nyengaard, B. Pakkenberg, F.B. Sorensen, A. Vesterby, West M.J.. **Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis.** APMIS 96:379-394,1988.

HAN N., Xu C., Wang T., Kou Y., Yin X., Zhang P., Xue F. **Electrical Stimulation does not enhance nerve regeneration if delayed after sciatic nerve injury: the role of fibrosis.** Neural Regeneration Research. January, vol 10, Issue 1 (2015).

HANNON P. **A brief review of current orthopedic implant device issues: biomechanics and biocompatibility.** Biol Eng Med, 2016. Volume 1(1): 1-2.

HAU J, Van Hoosier Jr GL. **Handbook of Laboratory Animal Science.** 2 ed. New York: CRC Press LLC; 2003.

HOUSCHYAR K.S.et al. **The role of current techniques and concepts in peripheral nerve repair.** Plastic surgery international, 2016. Academic OneFile.

Disponível em:http://beyondhedish.files.wordpress.com/2015/12/myelin_sheath.jpg>. Acesso em 12 dez. 2017.

Myelin Sheath

Disponível em: <http://www.sobiologia.com.br/figuras/Fisiologiaanimal/nervoso11.jpg>>. Acesso em 22 fev. 2018.

IBRAHIM A.M., Gerstle TL, Rabie AN, Song YA, Melik R, Han J, Lin SJ. **Nanotechnology in plastic surgery.** Plast Reconstr Surg. 2012 Dec;130 (6):879e-887e

IN DEPTH TUTORIALS INFORMATION. Diseases of the Peripheral Nervous System Part. Disponível em: [What- when-how.com](http://www.what-when-how.com) (2011). Acesso em 10 maio 2017.

ITO A., Okazaki Y, Tateishi T, Ito Y. **In vitro biocompatibility, mechanical properties, and corrosion resistance of Ti-Zr-Nb-Ta-Pd and Ti-Sn-Nb-Ta-Pd alloys.** J Biomed Mater Res. 1995 Jul;29 (7):893-9.

KOKA R, Hadlock TA. **Quantification of Functional Recovery Following Rat Sciatic Nerve Transection**. *Experimental Neurology* 2001;168 (1):192–5.

LANDON D.N., Hall S. The myelinated nerve fiber. In: Landon DN, editor. **The peripheral nerve**. London: Chapman and Hall; 1976. p. 1-105.

LAWRENCE R., Robinson MD. **Traumatic injury to peripheral nerves**. *Muscle & Nerve*, June 2000.

LEBOWISKI R., Nowland HM. **Guidelines on Anesthesia and Analgesia in Rats**. Site Michigan Medicine Confluence. Abr 27, 2017.

LEE Y.N. **Anatomy and Physiology CNS PNS reflex arc**. Dynamic Views Theme, 2012. Powered by blogger. Posted 30th august 2015. AcessO em 20 jan. 2018.

LINCHTENFELS M. **Efeito do plasma rico em plaquetas e de plaqueta rica em fibrina na regeneração de lesões com perda de substância do nervo ciático em ratos**. Dissertação de mestrado. Porto Alegre (2012).

LOEB G.E., Marks W. B., and Hoffer J.A. **Cat Hindlimb Motoneurons During Locomotion IV. Participation in Cutaneous Reflexes**. *Journal of Neurophysiology*. Vol. 57, no 2, February. Printed in USA (1987).

LUBINSKA L. **Early course of Wallerian degeneration in myelinated fibers of the rat phrenic nerve**. *Brain Res* 1977; 130:47–63.

LUNDBORG G. **Peripheral nerve injuries: pathophysiology and strategies for treatment**. *J Hand Ther*. 1993 Jul-Sep;6(3):179-88.

LUNDBORG G, Rósen B, Dahlin L, Danielsen N, Holmberg J. **Tubular versus conventional repair of median and ulnar nerves in the human forearm: Early results from a prospective, randomized, clinical study**. *J Hand Surg AM*. 1997 Jan;22 (1):99-106.

MACHADO, A.B.M. **Neuroanatomia funcional**. 2ª Ed. São Paulo: Atheneu, 1998.

MACKINNON S.E., Hudson A.R., Hunter D.A. **Histologic assessment of nerve regeneration in the rat.** *Plast Reconstr Surg.* 75:384-388 (1985).

MACKINNON S.E., Dellon A. **Diagnosis of Nerve Injury.** *Surgery of the Peripheral Nerve.* New York: Thieme; 1988. pp. 74-79.

MACKINNON S.E., Dellon A.L.: **Surgery of the Peripheral Nerve.** New York: Thieme Medical Publishers, Inc, in SMIT, 2006.

MERLE M. Dellon AL, Campbell JN, Chang PS. **Complications from silicon-polymer intubulation of nerves.** *Microsurgery.* 1989;10(2):130-3.

MATTAR JUNIOR R., Azze R.J. **Lesão dos nervos periféricos. Atualização em Traumatologia do Aparelho Locomotor.** São Paulo: Publicação Oficial do Instituto de Ortopedia e Traumatologia do HC FMUSP; 1999 (Fascículo).

MIZISIN A.P., Weerasuriya A. **Homeostatic regulation of the endoneurial microenvironment during development, aging and in response to trauma, disease and toxic insult.** *Acta Neuropathologica* 121(3):291-312, 2011.

MONTE-RASO, V.V. **Índice Funcional do ciático nas lesões por esmagamento do nervo ciático de ratos. Avaliação da reprodutibilidade do método entre examinadores.** Tese de Doutorado. Ribeirão Preto (2006).

MORRIS J.H., Hudson A. R., Weddell G. **A study os degeneration and regenerattion in the divided rat sciatic nerve based on electron microscopy. II The development of the "regeneration unit".** *Z Zellforsch Microsk Anat,* 124 (1): 103-130 (1972).

MURRAY, B. **Trauma of the Nervous System: Peripheral Nerve Trauma.** In: BRADLEY, W. G. et al. (Ed). *Neurology in Clinical Practice. Principles of Diagnosis and management.* 4. Ed. London: Butterworth Heinemann, 2005: 1179-1198.

NOBLE J, Munro CA, Prasad VS, Midha R. **Analysis of upper and lower extremity peripheral nerve injuries in a population of patients with multiple injuries.** J Trauma. 1998;45(1):116-22.

NUNOME S., Kanetaka H, Kudo TA, Endoh K, Hosoda H, Igarashi K. **In vitro evaluation of biocompatibility of Ti-Mo-Sn-Zr superelastic alloy.** J Biomater Appl. 2015 Jul;30 (1):119-30.

O'DONOVAN M. J., Hoffer J.A., Loeb G. E. **Physiological characterization of motor unit properties in intact cats.** Journal of Neuroscience Methods, 7 137-149 (1983).

PABARI A. Yang S.Y., Seifalian A.M., Mosahebi A. **Modern surgical management of peripheral nerve gap.** J Plast Reconstr Aesthet Surg. 2010 Dec;63(12):1941-8.

PACHIONI, C.A.S et al. **Lesão por esmagamento do nervo isquiático de ratos: um estudo da vascularização.** Acta Ortopédica Brasileira, v. 14, n. 4, p. 203-207, 2006.

PAIVA, F. P; Maffili, V. V; Santos, A. C. S. **Curso de Manipulação de animais de laboratório.** Ministério da Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz. Salvador, BA, 2005. 28p.

PANAGOPOULOS G.N., Megaloikononimos P.D., Mavrogenis A.F. **The present and future for peripheral nerve regeneration.** Orthopedics, 2017; 40 (1): 141-156.

PETERS A, Palay SL, Webster HF. **The fine structure of the nervous system: the neurons and sprouting cells.** Phylafelphia: Saunders; 1976.

RAGBETLI C., Yalama M., Kati I., Ulkay M. B., Esener O.B., Bozkurt H.H., Koyun N., Ragbetli M. C. **The Axon Number of the Rat Sciatic Nerve: A Stereological Study.** Kafkas Univ Vet Fak Derg. 19(4):635-639, 2013.

RAMBURRUN P., Kumar P., Choonara Y. E., Viness P. **A Review of Bioactive Release from Nerve Conduits as a Neurotherapeutic Strategy for Neuronal Growth in Peripheral Nerve Injury.** July 2014BioMed Research International 2014(2014):132350.

RODRIGUEZ F J, Valero-Cabr  A, Navarro X. **Regeneration and functional recovery following peripheral nerve injury.** Drug Discovery Today: Disease Models. 2004;1(2):177-85.

SAADAT S, Eslami V, Rahimi-Movaghar V. **The incidence of peripheral nerve injury in trauma patients in Iran.** Ulus Travma Acil Cerrahi Derg. 2011 Nov;17 (6):539-44.

SAENZ V.V., Fuentes E. Titanium and Titanium Alloys as Biomaterials. Chapter 5. INTECH open science, open minds. 2013.

SAINI M., Singh Y, Arora P, Arora V, Jain K. **Implant biomaterials: A comprehensive review.** World J Clin Cases. 2015 Jan 16; 3(1): 52–57.

SARIKCIOGLU L., Demirel B.M., Utuk A. **Walking track analysis: an assessment method for functional recovery after sciatic nerve injury in the rat. Review Article.** Folia Morphol. Vol.68, no 1, pp. 1-7(2009).

SCHAMALBRUCH H. **Fiber composition of the rat sciatic nerve.** Anat Rec. 1986 May;215(1):71-81.

SEBBEN A. D., Lichtenfels M., da Silva J. L. B. **Regenera o de nervos periféricos: terapia celular e fatores neurotróficos. Peripheral nerve regeneration: cell therapy and neurotrophic factors.** Rev Bras Ortopedia 46(6):643-49 (2011).

SINGH B., Dalton C., Gordon T, Zochodne D. W. **Electrical Stimulation Enhances Axon and Nerve Regeneration.** J Neurosurg 116:498-512 (2012).

SINGH B., PharM M., Xu Q., M.D., Ph.D., Franz C. K., Ph.D., Zhang R. M., Dalton C., Ph.D., Gordon T., Ph.D., Verge V. M. K., Ph.D., MiDha R., M.D., F.r.C.S.C., Zochodne, D. W. M.D., F.r.C.P.C.; **Accelerated axon outgrowth, guidance, and target reinnervation across nerve transection gaps following a brief electrical stimulation paradigm Laboratory investigation.** Journal of Neurosurgery. March. 116: 498-512 (2012).

SHORES, A. **Sistema nervoso periférico.** In: BOJRAB, M.J. Técnicas atuais em cirurgia de pequenos animais. São Paulo: Roca, 1996, p.49-60.

SUNDERLAND S. A classification of peripheral nerve injuries producing loss of function. *Brain*. 1951;74 (4):491-516.

SULAIMAN, M.D., PhD, FRCS. Tessa Gordon, PhD. **Neurobiology of Peripheral Nerve Injury, Regeneration, and functional Recovery: From Bench Top Research to Bedside Application**. *Wale. The Ochsner Journal* 13:100-108 (2013).

TATAGIBA M., Mazzer N., Aguiar P.H. Pereira C. U. **Nervos Periféricos**. Aspectos Gerais da lesão traumática dos nervos periféricos. Rio de Janeiro. Revinter 2003. 233p.

TELLÓ M., Dias G. A. D. **Circuitos Elétricos Biologicamente Fechados. Livro: Uso da corrente Elétrica no tratamento do câncer**. Pag. 63-75 (2004).

The conduction of the action potential across a myelinated and an unmyelinated axon. Disponível em: [https://www.britannica.com/Encyclopaedia Britannica/UIG/Getty Images](https://www.britannica.com/Encyclopaedia_Britannica/UIG/Getty_Images). Acesso em 09 jun. 2017.

TORRES R.Y., Miranda GE. **Epidemiology of traumatic peripheral nerve injuries evaluate by electrodiagnostic studies in a tertiary care Hospital Clinic**. *Bol Asoc Med P R*. 2015 Jul-Sep;107 (3):79-84.

VAREJÃO, A. S. P. Meek, M. F. Ferreira, A. J. A. Patricio, J. A. B. Cabrita, A. M. S. **Functional evaluation of peripheral nerve regeneration in the rat: walking track analysis**. *J Neurosci Methods*. 2001;108(1):1-9.

VEAS J.A.R. **Utilização do teste da análise da marcha como método de avaliação funcional após lesões nervosas segmentares em nervo ciático de ratos**. Dissertação de Mestrado. Porto Alegre (2009).

WILLAND M. P., Zhang J. J., Chiang C. D., Borschel G.H., Gordon T. **Electrical Muscle Stimulation Increases Early Reinnervation Following Nerve Injury and Immediate Repair**. 6th Annual International IEEE EMBS Conference on Neural Engineering San Diego, California, 6 - 8 November (2013).

WITZEL C., Rohde C, Brushart TM. **Pathway sampling by regenerating peripheral axons.** J Comp Neurol 2005; 485:183–90.

WILLAND M. P., PhD, Nguyen² M. A., Borschel G. H., MD, Gordon, T., PhD. **Electrical Stimulation to Promote Peripheral Nerve Regeneration.** Neurorehabilitation Neural Repair, september, 1-7 (2015).

YU W., Zhao W., Zhu C., Zhang X., Ye D., Zhang W., Zhou Y., Jiang X., Zhang Z. **Sciatic nerve regeneration in rats by a promising electrospun collagen/poly(ϵ -caprolactone) nerve conduit with tailored degradation rate.** BMC Neuroscience 2-14 (2011).

XU C., Kou Y, Zhang P., Han N., Yin X., Deng J., Chen B., Jiang B. **Electrical Stimulation to Promote Regeneration of Defective Peripheral Nerves after Delayed Repair Intervals Lasting under One Month.** Plos one, september, vol 9, Issue 9 (2014).

ZHAO X., Liu Q., Sun H., Hu Y., Wang Z. **Chronic Systemic Toxicity Study of Copper Intrauterine Devices in Female Wistar Rats.** Med Sci Monit. 2017; 23: 3961–3970.



SIPESQ

Sistema de Pesquisas da PUCRS

Código SIPESQ: 7396

Porto Alegre, 6 de março de 2017

Prezado(a) Pesquisador(a),

A Comissão de Ética no Uso de Animais da PUCRS apreciou e aprovou o Projeto de Pesquisa "RESULTADO DA ELETROESTIMULAÇÃO ASSOCIADA AO USO DE NEURÓTIPO NA REGENERAÇÃO DOS NERVOS PERIFÉRICOS" coordenado por JEFFERSON LUIS BRAGA DA SILVA.

Sua investigação, respeitando com detalhe as descrições contidas no projeto e formulários avaliados pela CEUA, está autorizada a partir da presente data.

Informamos que é necessário o encaminhamento de relatório final quando finalizar esta investigação. Adicionalmente, ressaltamos que conforme previsto na Lei no. 11.794, de 08 de outubro de 2008 (Lei Arouca), que regulamenta os procedimentos para o uso científico de animais, é função da CEUA zelar pelo cumprimento dos procedimentos informados, realizando inspeções periódicas nos locais de pesquisa.

Duração do Projeto: 06/03/2017 - 06/09/2017

Nº de Animais	Espécie
90	WISTAR
Total de Animais: 90	

Atenciosamente,

Comissão de Ética no Uso de Animais(CEUA)

ANEXO A – CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA PARA USO DE ANIMAIS


ATA DE APRESENTAÇÃO DE DISSERTAÇÃO Nº 440

Aos vinte e oito dias do mês de março do ano de dois mil e dezoito, no Curso de Mestrado em Medicina e Ciências da Saúde, área de concentração em Clínica Cirúrgica da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul foi concluído o processo de avaliação da dissertação intitulada **"O EMPREGO DA ELETROESTIMULAÇÃO ASSOCIADA À TÉCNICA DE TUBULIZAÇÃO NA REGENERAÇÃO DO NERVO CIÁTICO DE RATOS WISTAR APÓS TRANSECÇÃO SEM PERDA DE SUBSTÂNCIA"** de autoria da pós-graduanda **Tatiana Zotti Pitágoras** sob orientação do **Prof. Dr. Jefferson Braga Silva**. A comissão examinadora foi constituída por: Dr. Alexandre Vontobel Padoin (PUCRS), Dr. Lúcio Sarubbi Fillmann (PUCRS), Dr. João Baptista Gomes dos Santos (UNIFESPI) e Dr. Lucas Colomé, suplente (PUCRS). A aluna foi **APROVADA**. Para constar, lavrou-se esta ata que deverá ser anexada à documentação exigida para posterior expedição do diploma. A presente ata foi assinada pelo Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde.

Porto Alegre, 28 de março de 2018.

Prof. Dr. Alexandre Vontobel Padoin
 Coordenador do Programa de Pós-Graduação
 em Medicina e Ciências da Saúde

Prof. Dr. Alexandre Vontobel Padoin
 Coordenador do Programa de Pós-Graduação
 em Medicina e Ciências da Saúde

Submission Confirmation

2 mensagens

Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery <oesserver@eesmail.elsevier.com>
Responder a: "Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery" <jpras@elsevier.com>
Para: tatipita71@gmail.com, tzpita@hotmail.com

28 de março de 2018 21:22

Dear Tati,

Thank you for your submission entitled "THE OUTCOME OF ELECTROSTIMULATION ASSOCIATED WITH THE TUBULIZATION TECHNIQUE IN SCIATIC NERVE REGENERATION IN THE WISTAR RATS AFTER TRANSITION" which has been received by the Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery.

The full list of authors for this paper is Dr. Tatiana Zotti Pitágoras.

If you are not an author of this paper and should not have been included in the list of authors during the submission then please email jpras@elsevier.com.

The corresponding author will be able to check on the progress of your paper by logging on to Elsevier Editorial Systems as an author, the URL is <https://ees.elsevier.com/jpras/>.

Your username is: tatipita71@gmail.com

If you need to retrieve password details please go to: http://ees.elsevier.com/jpras/automail_query.asp

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to this journal.

Khd regards,

Elsevier Editorial System
Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery

Tatiana Pita <tatipita71@gmail.com>
Rescunho para: pg

28 de março de 2018 21:24

ANEXO C – CARTA DE APROVAÇÃO DA SUBMISSÃO DO ARTIGO

THE OUTCOME OF ELECTROSTIMULATION ASSOCIATED WITH THE TUBULIZATION TECHNIQUE IN SCIATIC NERVE REGENERATION IN THE WISTAR RATS AFTER TRANSITION

Tatiana Z. Pitágoras 1; Eduardo Goldani 2; Josiel Schilling Poeta 3; Luiz Eduardo Schardong Spalding 4; João Fernando Saraiva 5, Fábio Hermann 6, Gustavo Pesenato 7; Fábio Luiz Dal Moro Maito 8; Pedro Chagastelles 9; Jefferson Braga da Silva 10.

1,2,3 Laboratory of Medical Skills and Surgical Research, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, Brazil.

4 Faculty of Mathematic, Passo Fundo University (UPF), Passo Fundo, Brazil.

5 Orthopaedic Reconstructive Service de Passo Fundo, Brazil.

6, 7 Students of Medicine School, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul (PUCRS).

8 PhD, Associate Professor, PUCRS, Porto Alegre, Brazil.

9 Toxicology Institute, Pontifical Catholic University (PUCRS), Porto Alegre, Brazil.

10 Pontifical Catholic University, Professor, School of Medicine. Hand Surgery and Reconstructive Microsurgery Department, São Lucas Hospital.

AUTHOR RESPONSIBLE:

TATIANA Z. PITAGORAS

RUA PAISSANDÚ 2207

PASSO FUNDO – RS

CODE 99010 102

55 54 3045 3048

55 54 981246682

tzpita@hotmail.com , tatipita71@gmail.com

ABSTRACT

Introduction: Peripheral nerve transection injuries are common and occur frequently in clinical practice and are responsible for serious problems such as pain, loss of sensibility and motor, and permanent sequelae and affected individual, as well as the socioeconomic environment in which they develop; in about 24% of the cases, make the individual incapable to perform his work function. Great advances were obtained in the treatment of peripheral nerve lesions and the results of electrical stimulation are encouraging and suggest its use as an alternative treatment.

Objective: To evaluate, in vivo, the use of electrostimulation (EE) associated with the tubulization technique on the repair of sciatic nerve injury in Wistar rats.

Materials and Methods: Ninety male Wistar isogenic rats weighing between 200 and 300 grams were divided into three groups of 30 rats (electrostimulation associated with the tubing technique (EE), tubing suture (ST) and suture(SUT), which were subdivided into three other groups with ten animals according to the evaluation time, with three, six and nine weeks postoperative. Regeneration was assessed by 'walking track' analysis and histological analysis in which determination of the area and number of Schwann cells in the nerve samples.

Results: In the functional evaluation, the group that received only one EE with 20 Hz, 3 V for one hour presented a superior result, statistically significant when compared to those stimulated more than once, but during the period stipulated for this research, there were different responses than expected.

Keywords: Electro stimulation, regeneration, peripheral nerve injury and tubulization.

INTRODUCTION

Peripheral nerve transection injuries are common and frequently occur in clinical practice and are responsible for pain, loss of sensibility and motor, and most often permanent sequelae. Among the damages that substantially reduce the quality of life of people who are affected by them, are included a decrease in physical capacity and the total or partial loss of their productive activities, which causes important socioeconomic consequences such as the increase in health expenses public and social security (1,2,3,4). Refined microsurgical techniques and a better understanding of the pathophysiology and molecular basis of nerve injury have led to a decisive leap in the field of translational neurophysiology. Nerve repair, nerve grafting and nerve transposition improved significantly with consistently better functional results (5).

Currently, the most commonly used surgical procedures in peripheral nerve injury treatment centers are neurolysis, direct suturing and nerve grafting (in cases of segmental loss). However, these "gold standard" methods for tissue restoration are often limited by lack of tissue availability, risk of disease spread, secondary deformities and possible differences in tissue structure and size (6). One technique that has been widely used and studied is the tubulization that can be used in different ways, for small and large losses of the peripheral nerve segment when the extension of the lesion makes it impossible to simply meet the stumps. The silastic tube is used for nerve regeneration to obtain motor and sensory recovery (7,8). This technique is a surgical procedure in which the sectioned nerve stumps are introduced and fixed inside a tubular prosthesis in order to provide a favorable environment for regeneration. It also provides directing nerve growth of the injured or sectioned ends, protecting the nerve fibers of the scar tissue and preventing the formation of neuroma. Tubing has another interesting feature: it can be optimized with an increase in regenerative factors (4). The conduits may also be of biodegradable materials. When combined with biomaterials, their effects become potentialized and can be incorporated during the manufacture of synthetic tubes that can be absorbable or released through infusion minipumps (9,10).

Another technique that has been researched to try to improve results related to nerve regeneration is electrical stimulation (EE). The positive effect of EE in the short term is mediated through the cell body, implying improved growth. The efficacy of short-term low frequency electrical stimulation suggests a new therapeutic approach to accelerate nerve regeneration after injury and, in turn, improve functional recovery (11,12).

The studies aims to bring about improvements in the rates of nerve regeneration, in an attempt to minimize changes in denervation and improve functional recovery (13).

The purpose of this study was to evaluate the existence of an advantage in the combined treatment of proximal and distal electrostimulation associated with tubing technique in the speed and quality of axonal regeneration when compared to the use of suture and tubulization and with direct microsurgical suture (gold standard).

MATERIAL AND METHODS

It is an experimental, controlled, comparative and blind study. In medical scientific research, in several areas, the animal model has been widely used in studies of peripheral nerves. Rats are preferred because they are small in size, large numbers of genetically equal animals and affordable cost (14). The sciatic nerve of rats shows an equivalent capacity of regeneration with that of the primates. Therefore, it is widely used in the evaluation of motor and sensory functions (15,16).

In this experimental model, 90 male isogenic Wistar rats (*Rattus Novergicus Albinus*), adult males, weighing between 200 and 300 grams of body mass were used. All the animals come from the CeMBE (Center for Experimental Biological Models) of PUCRS (Pontificia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Brazil), and the surgical procedure was performed at the Laboratory of Medical Skills and Surgical Research at the Medical School of PUCRS. The rat walking track tests were performed at the Institute of Toxicology (INTOX) of PUCRS and were maintained at CeMBE with light control (light-dark cycle of 12h), at a controlled temperature of $22 \pm 1^\circ\text{C}$, with water and feed ad libitum (17).

The 90 animals were randomly distributed in 3 groups of 30 animals (Fig 1, 2, 3) and each of these groups was divided into three other groups according to the treatment time used at zero, three weeks and six weeks. The rats received the treatments immediately after the injury. The treatments were suture of approach of the stumps, with tubulization and electrostimulation (EE), approach suture with tubulation (ST) and standard suture (SUT).

EE group: (electrostimulation group). A 10 mm long silicone tube and compatible gauge with copper conductive wire (Cu) with tin cover (Sn), placed 2.5 mm proximal and 2.5 mm distal. A tinned copper wire (Cu) with insulation (enamelled) was soldered to the tinned copper wire after the tube was exhausted so as not to dissipate energy by avoiding burns in adjacent tissues and allowing the nerve received the energy necessary for the procedure, were left out of the skin where they were connected to the electrostimulation apparatus. The points

of approach of the nervous stumps were only made of anchorage without the traditional suture with prolene® 7.0, defect created and the nerve was fixed inside the middle of the tube in right contact, without gap. After the EE, the wires were fixed on the back of the animal outside the skin, covered by a dressing and the dressing was sutured on the animal's skin in an attempt to avoid loosening or removal (Fig. 4 and 5). This same electrostimulation was repeated after a period of three, six weeks. Therefore, ten rats were evaluated at three weeks, ten rats at six weeks and ten rats at nine weeks.

Group ST: defect created and the nerve was fixed inside the middle of the proximal and distal silicone tube respectively with prolene® 7.0 stitches on both sides establishing contact between the stumps. Therefore, in this group there were ten rats evaluated at three weeks, ten rats evaluated at six weeks and ten rats evaluated at nine weeks (Fig. 6).

SUT group - control: single suture only. The defect created is sutured with four separate epineural points with mononylon® 9.0 and the animals were evaluated functional and histologically at three, six and nine weeks. Therefore, in this group there were ten rats evaluated at three weeks, ten rats evaluated at six weeks and ten rats evaluated at nine weeks (Fig. 7).

The anesthetic-surgical procedures were performed in the Laboratory of Medical Abilities and Surgical Research of the Faculty of Medicine of PUCRS. The animals were anesthetized through the combination of ketamine hydrochloride (75mg.kg⁻¹) and Xylazine (10mg.kg) (18) administered in the same syringe via intraperitoneal (IP).

The animals were placed in left lateral decubitus position, under general anesthesia, the anterior and posterior legs stretched, tricotomized and routine disinfection performed (19,17). Through the dorsal access of the right paw, a longitudinal incision was made 3 mm parallel and posterior right axis, from the major tubercle of the femur to the posterior lateral region of the knee. The skin was incised and separated, the gluteus muscle and biceps femoris were separated by dissection and the ischiadic nerve was visualized and released from its fascial insertions and dissected (21,21,17).

A linear defect with microsurgical scissors was created in the proximal middle third, before the bifurcation of the sciatic nerve in tibial and common fibular nerves, using a surgical microscope (D.F.Vasconcellos, São Paulo, Brazil). The suture was performed with Prolene® 7.0 wire so that it initially passed through the middle region of the tube, then through the epineural region of the nerve and back through the tube, next to the input wire, so the point was given so that the nerve stumps were in direct contact in the middle of the tube (22) (Fig. 8).

For closure of the access incision in both experimental groups, the fascia lata and the skin were sutured separately in simple continuous pattern and 4-0 nylon filament monofilament

(Ethilon®, Johnson & Johnson). In the immediate postoperative period, ketoprofen (5mg.kg⁻¹, SC, every 24 hours for 2 days) and tramadol hydrochloride (5mg.kg⁻¹, SC, every 12 hours for 2 days) were administered as analgesic / anti-inflammatory medication (23,24).

The evaluation period (up to rats sacrifice) was determined according to the findings in the literature review that determined that axonal regeneration in the cutaneous and muscular branches is equal to two to three weeks after repair and nerve stimulation in this model (25 ; 11). It was determined that EE at 3 volts and 20 Hz in direct current for one hour was more effective than continuous stimulus for two weeks, accelerating axonal regeneration, since motor neurons regenerated their axons within up to three weeks, in contrast to a period of eight to ten weeks in the groups without stimulation (11, 26, 27).

The functional recovery measure of sciatic nerve injury in rats is the “walking track” test. This method was first described by Medinaceli (28,29) in 1982 and later modified by Bain (30). The footprint standards for “walking track” analysis can be collected using ink and paper or with digital resources (scanners that evaluate the footprint) and computer (31) (Fig. 9). With the footprints, the PL, TS and ITS parameters are collected manually by 2 examiners and for further analysis using the mathematical equation (31) which is inserted in the program calculating SFI automatically. After the test, the rats were anesthetized again, the nerve was surgically approached, removed segment, submitted to surgical wound closure and euthanized with anesthetic overdose (same protocol used for surgical procedures), being this method according to the Arouca Law n. 11,794, dated 08.10.2008. Neuronal regeneration was observed in all nerves that maintained the intact suture. The thickness of the nerve remained constant, except for those that were released within the tube where there was variation, some developed neoneuroregeneration, but were excluded from this study.

The cut was performed at the epicenter of the nerve, a region that was quantified in histology. Subsequently, they were washed with a solution of propylene oxide and embedded in paraffin in a mold with 5 mm deep wells. This mold provides adequate orientation and cutting angle for the nerve sections. The samples were cleaved in 3 micrometer semfinished sections on a microtome. They were transferred to glass slides in water, platinum dried at 50-60 ° C and stained with 1% toluidine blue saturated boric acid for light microscopy observation, also stained with hematoxylin and eosin. The slides were analyzed by a blinded specialist in relation to the design of the study under an Olympus® BX40 optical microscope. The histologically evaluated parameters were the number of cells and the nerve area. The number of cells was measured through the mean, randomly selecting 10 fields at 200x magnification. (32).

Stereological analyzes of sciatic nerves were performed according to the principles described above. A workstation was assembled using a microscope attached to a computer. Using Image Pro Plus software for image processing, this software provides a collection of easy-to-use blade analysis tools. It features a Quick Capture Image that was used to capture the images, allowing you to process images directly at your capture station to ensure high quality, accuracy and reproducibility. After the image capture, Grid mask program (a counting frame) was applied and the area sampled was chosen in a uniform random method, being an evolution of the stereological method applied by Gundersen and Geuna (33,34,35). The fibers located in the interior of the field and those that touched the upper and left border of the field were included for morphometric analysis (34).

In the histological sections were analyzed the number of Schwann cells and the nerve area in the regenerated region in the three study groups. One can observe the example of figure 10, regardless of the analyzed segment, there is presence of Schwann cells as well as variable amounts of axons.

The quantitative data were presented as mean and standard deviation, the groups being compared by the Generalized Estimating Equations (GEE) procedure, both on the axis between groups and on the intragroup axis. Post-hoc comparisons were obtained by the Sidak method. Values of $p < 0.05$ were considered statistically significant. The data were analyzed with SPSS software version 22.0.

DISCUSSION

The regeneration of nerves observed in experimental studies presents controversial aspects, because it is not always possible to establish a clear relation between the results obtained by different methods in the same research, nor between the results obtained by the same method, used in different investigations or conducted by authors many different.

In the peripheral nerves injuries, the main desired result is the functional recovery of the effector organ. In this research, it was found that, even with few significant morphological and morphometric differences, functional recovery may occur. In this research the functional recovery and morphometric aspects were compared in the three types of treatment previously mentioned. During the research several factors occurred that could have interfered in the hypothesis of this research making it null. In the assessment of functional recovery between the EE, ST and SUT groups at three weeks, there was no significant statistical difference. Functional recovery was also compared between the EE, ST and SUT groups at six weeks,

which also did not show statistical difference between the same groups. Finally, the functional recovery was compared between the nine-week groups, which presented a statistically significant result in the functional gait test of the rats submitted to the standard treatment (simple microsurgical suture). When the comparison was made within the same group, the one in which EE was applied at three weeks showed a statistically significant functional recovery, which corroborates with the literature that a single electrostimulation for 1 hour at the frequency of 20 Hz and voltage of 3V accelerate nerve regeneration and functional recovery (Table 1 and 2). It is understood that bioincompatibility of the materials may have occurred, the groups in which the metallic materials remained the longest implanted (more than three weeks), showed a decrease in functional recovery and had a negative influence on the results. In the other two groups, taking into account the time difference for the analysis, there was no significant statistical difference.

Regarding the influence of external factors, the most important factor was that the use of copper, a metal used in the inner part of the tube, which although presented with a tin bath (biocompatible material and used in metallic alloys of implants), was sufficient to avoid the copper irritative effect, even for a short period of time, leading to the development of fibrosis surrounding the implanted device (wire-tube) in the nerve, which may have inhibited adequate functional recovery. This could be seen during the weeks in which EE were performed, since in the great majority of rats, except for those euthanized at three weeks, there was a need for surgical reintervention in this group, in order to allow the re-stimulation, once the mice chewed and ripped the strands breaking to the region of the weld. This possibility was not detected in the histological analysis.

Regarding the histological analysis, a significant difference was observed with respect to the number of Schwann cells between the EE and SUT groups for the nine week period. Among the other groups there were no statistically significant differences, but since they had a good number of Schwann cells with regular distribution and little connective tissue between the fibers, it reflected that the process of nerve regeneration was occurring properly.

The result of the functional recovery when applied once to the EE with frequency of 20 Hz and 3 V was compatible with the studies already performed, but the hypothesis that there would be an improvement of the results in the EE group, if it were applied again with three and six weeks, was void (Table 3 and 4).

CONCLUSIONS

- The EE group at three weeks, when compared to the EE groups at six and nine weeks, had a statistically significant adequate functional recovery.

- Factors related to the lack of biocompatibility of the materials negatively influenced the hypothesis that in the case of new electrostimulations with intervals of three weeks would improve the functional recovery, making it null. Thus, the best results for functional recovery at the end of the nine weeks were obtained in the standard suture group. This, although with slower regeneration, was not influenced by external factors (wire-tube) that the other two groups suffered.

- There were significant differences related to the number of Schwann cells between the EE and SUT groups for the nine week period. What could indicate the occurrence of a better regeneration was occurring, not manifested in the functional analysis due to factors related to biocompatibility.

- Although with an unsatisfactory result the hypothesis that in addition to a single electrostimulation for one hour, at the frequency of 20 Hz and voltage of 3 V, other electrostimulations are performed in the same time interval (every three weeks), it is understood that once the difficulties related to biocompatibility have been remedied and the rats have bitten the wires that were located externally, direct EE in the peripheral nerves has presented promising results in the literature and should continue to be studied.

- The use of electrostimulation with implantable and wireless devices in which it is performed by induction may in the future validate the hypothesis of this research. Also nanotechnology probably can lead to advances in peripheral nerve surgery.

- Other studies comparing these three methods were not found in the reviewed literature, nor in the time periods established in this study.

ACKNOWLEDGMENTS

Thanks are for the lab team of medical skills, INTOX and CeMBE of Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul.

CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

None.

REFERENCES

1. NOBLE J, Munro CA, Prasad VS, Midha R. **Analysis of upper and lower extremity peripheral nerve injuries in a population of patients with multiple injuries.** J Trauma. 1998;45(1):116-22.
2. RODRIGUEZ F J, Valero-Cabré A, Navarro X. **Regeneration and functional recovery following peripheral nerve injury.** Drug Discovery Today: Disease Models. 2004;1(2):177-85.
3. CHALFOUN C.T., Wirth G.A., Evans G.R. **Tissue engineered nerve constructs: where do we stand?** J Cell Mol Med. 2006 Apr-Jun;10(2):309-17.
4. SEBBEN A. D., Lichtenfels M., da Silva J. L. B. **Regeneração de nervos periféricos: terapia celular e fatores neurotróficos. Peripheral nerve regeneration: cell therapy and neurotrophic factors.** Rev Bras Ortopedia 46(6):643-49 (2011).
5. PANAGOPOULOS G.N., Megaloikononimos P.D., Mavrogenis A.F. **The present and future for peripheral nerve regeneration.** Orthopedics, 2017; 40 (1): 141-156.
6. EVANS R.D.G. **Challenges to nerve regeneration.** Semin Surg Oncol. 2000 Oct-Nov;19(3):312-8.
7. DAZA C.H.M., Rengifo YR, Rubio JJS, Alzate LH, Hurtado H. **Câmaras de silicona como injerto nervioso, análisis de la especialidad de regeneración del nervio peroneal o tibial: estudio experimental em ratas.** Rev Colomb de Ortop y Traumatol. 1993;13(3):285-92.
8. LUNDBORG G, Rósen B, Dahlin L, Danielsen N, Holmberg J. **Tubular versus conventional repair of median and ulnar nerves in the human forearm: Early results from a prospective, randomized, clinical study.** J Hand Surg AM. 1997 Jan;22 (1):99-106.
9. DELLON A. Mackinnon S.E., Dellon A. **Diagnosis of Nerve Injury.** Surgery of the Peripheral Nerve. New York: Thieme; 1988. pp. 74-79.
10. GORDON T., Fu S.Y. **Long-term response to nerve injury.** Adv Neurol. 1997; 72:185-99.
11. AL-MAJED A. A, Neumann C.M., Brushart T.M., Gordon T. **Brief electrical stimulation promotes the speed and accuracy of motor axonal regeneration.** J Neuroscience. Apr 1;20(7):2602-8 (2000).

12. IBRAHIM A.M., Gerstle TL, Rabie AN, Song YA, Melik R, Han J, Lin SJ. **Nanotechnology in plastic surgery.** *Plast Reconstr Surg.* 2012 Dec;130 (6):879e-887e
13. GORDON T., Eva P, Borschel G. H. **Delayed peripheral nerve repair: methods, including surgical ‘cross bridging’ to promote nerve regeneration.** *Neural Regeneration Research.* Year 2015, vol. 10, Issue 10. Page 1540-1544 (2015).
14. SARIKCIOGLU L., Demirel B.M., Utuk A. **Walking track analysis: an assessment method for functional recovery after sciatic nerve injury in the rat. Review Article.** *Folia Morphol.* Vol.68, no 1, pp. 1-7(2009).
15. MACKINNON S.E., Hudson A.R., Hunter D.A. **Histologic assessment of nerve regeneration in the rat.** *Plast Reconstr Surg.* 75:384-388 (1985).
16. YU W., Zhao W., Zhu C., Zhang X., Ye D., Zhang W., Zhou Y., Jiang X., Zhang Z. **Sciatic nerve regeneration in rats by a promising electrospun collagen/poly(ϵ -caprolactone) nerve conduit with tailored degradation rate.** *BMC Neuroscience* 2-14 (2011).
17. LINCHTENFELS M. **Efeito do plasma rico em plaquetas e de plaqueta rica em fibrina na regeneração de lesões com perda de substância do nervo ciático em ratos.** Dissertação de mestrado. Porto Alegre (2012).
18. PAIVA, F. P; Maffili, V. V; Santos, A. C. S. **Curso de Manipulação de animais de laboratório.** Ministério da Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz. Salvador, BA, 2005. 28p.
19. BRAGA-SILVA J., Roman D., Javier A., Cantarelli M. D., Costa da Costa J., Faúndez M., Vieira Orsi V., Braga R. **Modelo experimental de lesão raquimedular em ratos com dispositivo para acesso de agentes terapêuticos locais.** *Acta ortop. Bras.* vol.15 no.3 São Paulo, pp. 155-157 (2007).
20. COSTA M. P., Cunha A. S., da Silva C.F., Filho T. E. P. de B, Ferreira M. C. **A utilização do tubo de ácido poliglicólico e FK 506 na regeneração de nervos periféricos.** *Acta ortop. Bras.* vol.14 no.1 São Paulo, (2006).
21. COSTA M. P., Cunha A. S., da Silva C.F., Filho T. E. P. de B, Costa H. J. Z. R., Ferreira M. C. **Tubo de ácido poliglicólico e GM1 na regeneração de nervos periféricos.** *Acta Ortop Brasileira* 17(5):286-90 (2009).
22. HOUSCHYAR K.S.et al. **The role of current techniques and concepts in peripheral nerve repair.** *Plastic surgery international*, 2016. Academic OneFile.
23. HAU J, Van Hoosier Jr GL. **Handbook of Laboratory Animal Science.** 2 ed. New York: CRC Press LLC; 2003.

24. LEBOWISKI R., Nowland HM. **Guidelines on Anesthesia and Analgesia in Rats.** Site Michigan Medicine Confluence. Abr 27, 2017.
25. BRUSHART T.M. **Preferential reinnervation of motor nerves by regenerating motor axons.** J Neuroscience 8: 1026 – 1031 (1988).
26. BRUSHART T.M., Hoffman P. N., Royall R. M., Murinson B. B., Witzel C., and Gordon T., PhD. **Electrical Stimulation Promotes Regeneration without Increasing Its Speed or conditioning the Neuron.** The Journal of Neuroscience. August 1, 22(15): 6631-6638 (2002).
27. GORDON T., Sulaiman O.A.R, and Ladak A. **Electrical Stimulation for improving nerve regeneration: Where do we stand?** International Review of Neurobiology. Vol 87(2009).
28. DE MEDINACELLI L., Freed W. J., Wyatt RJ. **An Index of the functional condition of rat sciatic nerve based on measurements made from walking tracks.** Exp Neurology, 77: 634-643 (1982).
29. DE MEDINACELLI L. **Interpreting nerve morphometry data after experimental traumatic lesions.** J Neurosci Methods. May;58(1-2):29-37 (1995).
30. BAIN J.R., Mackinnon S.E., Hunter D.A. **Functional Evaluation of Complete Sciatic, Peroneal, and Posterior Tibial Nerve Lesions in the Rat.** Plast Reconstr Surg. 1989;83(1):129-38.
31. KOKA R, Hadlock TA. **Quantification of Functional Recovery Following Rat Sciatic Nerve Transection.** Experimental Neurology 2001;168 (1):192–5.
32. SCHAMALBRUCH H. **Fiber composition of the rat sciatic nerve.** Anat Rec. 1986 May;215(1):71-81.
33. GUNDERSEN H.J.G., Bagger P., Bendtsen T.F., Evans S.M., Korbbo L., Marcussen N., Moller A., Nielsen K., Nyengaard J.R., Pakkenberg B., Sorensen F.B., Vesterby A., West M.J. **The new stereological tools: Dissector, fractionator, nucleator and point sampled interepts and their use in pathological research and diagnosis.** APMIS 96: 857-881(1988).
34. GEUNA S., Tos P., Battiston B., Guglielmone R. **Verification of the two-dimensional disector, a method for the unbiased estimation of density and number of myelinated nerve fibers in peripheral nerves.** Ann Anat. 2000 Jan;182(1):23-34.
35. RAGBETLI C., Yalama M., Kati I., Ulkay M. B., Esener O.B., Bozkurt H.H., Koyun N., Ragbetli M. C. **The Axon Number of the Rat Sciatic Nerve: A Stereological Study.** Kafkas Univ Vet Fak Derg. 19(4):635-639, 2013.

TABLE 1. Mean (\pm standard deviation) of sciatic function index (SFI) for comparison between EE, ST and SUT groups at three, six and nine postoperative weeks.

	Groups	Mean (\pm standard deviation)	p
SFI three weeks	EE	-76,0 \pm 9,9	0,201
	ST	-78,4 \pm 28,3	
	SUT	-84,1 \pm 13,1	
SFI six weeks	EE	-77,0 \pm 9,0	0,099
	ST	-58,7 \pm 36,7	
	SUT	-66,0 \pm 30,7	
SFI nine weeks	EE	-87,9 \pm 9,69	<0,001
	ST	-77,0 \pm 12,0	
	SUT	-67,6 \pm 26,8	

P value in relation to the total for each period evaluated (three, six and nine weeks) GEE (generalized estimation equations), EE (electrostimulation), ST (suture and tube), SUT (suture).

TABLE 2. Mean (\pm standard deviation) of the sciatic function index for comparison within the same group at different time periods, with three, six and nine postoperative weeks.

Groups	Mean (\pm standard deviation)	P
EE three weeks	-76,0 \pm 9,9	<0.001
EE six weeks	-77,0 \pm 9,0	
EE nine weeks	-87,9 \pm 9,69	
ST three weeks	-78,4 \pm 28,3	0,177
ST six weeks	-58,7 \pm 36,7	
ST nine weeks	-77,0 \pm 12,0	
SUT three weeks	-84,1 \pm 13,1	0,116
SUT six weeks	-66,0 \pm 30,7	
SUT nine weeks	-67,6 \pm 26,8	

TABLE 3. Area (μm^2) for comparison between EE, ST and SUT groups at three, six and nine postoperative weeks.

	Groups	Mean (\pm standard deviation)	P
Three weeks	EE	625.195 \pm 140.180	<0,001*
	ST	352.689 \pm 141.487	
	SUT	523.429 \pm 355.041	
six weeks	EE	439.826 \pm 264.294	0,694
	ST	513.408 \pm 282.690	
	SUT	395.718 \pm 226.413	
nine weeks	EE	472.660 \pm 199.406	0,316
	ST	450.340 \pm 293.543	
	SUT	369.428 \pm 116.801	

P value in relation to the total for each period evaluated (three, six and nine weeks)
Significant difference at the level of 1%.

Source: Author.

TABLE 4. Number of Schwann cells between EE, ST and SUT groups at three, six and nine postoperative weeks.

	Groups	Mean (\pm standard deviation)	P
Three weeks	EE	2756 \pm 956.83	0,861
	ST	2887 \pm 1451,82	
	SUT	3033.12 \pm 1356.46	
Six weeks	EE	2865.25 \pm 1355.76	0,217
	ST	2199.83 \pm 894.99	
	SUT	2289.57 \pm 1196.18	
Nine weeks	EE	2439.28 \pm 463.04	0,033
	ST	2071.85 \pm 976.80	
	SUT	1698.87 \pm 734.31	

P value in relation to the total for each period evaluated (three, six and nine weeks)
Significant difference at the level of 1%.

Source: Author.

FIGURE 1. Organization chart of the SUT group.

Source: Author

FIGURE 2. Organogram of the ST group.

Source: Author

FIGURE 3. Organization chart of the EE group.

Source: Author

FIGURE 4. Tube installation with EE. Tinned copper wire (A), tin solder (B), enameled copper wires (C), outer dressing on the skin (D).

Source: Author

FIGURE 5. EE after surgical procedure for installation.

Source: Author

FIGURE 6. ST Group, after defect creation, approximation of stumps with placement of silicone tube.

Source: Author

FIGURE 7. Example of epineural suture.

Source: Author.

FIGURE 8. Point of approach of the nerve stumps used for both techniques.

Source: Author.

FIGURE 9. Measurement of the paws of a mouse: Normal leg (left) and injured leg (right).

Source: Author

FIGURE 10. Screen capture with increase of 200 X.

Source: Author

ANEXO D – ARTIGO



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
Pró-Reitoria de Graduação
Av. Ipiranga, 6681 - Prédio 1 - 3º. andar
Porto Alegre - RS - Brasil
Fone: (51) 3320-3500 - Fax: (51) 3339-1564
E-mail: prograd@pucrs.br
Site: www.pucrs.br