



## 6º Congresso de Pós-Graduação

### **ANÁLISE QUANTITATIVA DE AXÔNIOS REGENERADOS APÓS ESMAGAMENTO DO NERVO ISQUIÁTICO E ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA DE ALTA VOLTAGEM**

#### **Autor(es)**

ANDREIA MARIA SILVA

#### **Orientador(es)**

ROSANA MACHER TEODORI

#### **1. Introdução**

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

Logo após a lesão nervosa periférica tem início a degeneração e, duas horas após, inicia a regeneração (Burnett e Zager, 2004). Apesar da possibilidade de regeneração, a recuperação funcional é frequentemente pobre, especialmente na axoniotmese e neurotmese, limitando o indivíduo de retornar às atividades funcionais normais (Mendonça, Barbieri e Mazzer, 2003).

Para minimizar o problema, diversos estudos têm investigado diferentes formas de favorecer a regeneração nervosa e recuperação funcional. Pode-se destacar o uso do ultra-som (Monte-Raso et al., 2006), fototerapia (Gigo-Benato, Geuna e Rochkind, 2005), exercício em esteira (Sobral, 2007), estimulação elétrica de baixa freqüência (Mendonça, Barbieri e Mazzer, 2003).

A estimulação elétrica de alta voltagem (EEAV) é um recurso pouco explorado na clínica e tem sido investigado por seus efeitos regenerativos na cicatrização de úlceras dérmicas (Davini et al., 2005; Low e Reed, 2001) e circulatórios (Davini et al., 2005; Nelson e Hayes, 2003). A literatura não refere sua aplicação na lesão nervosa periférica.

A hipótese para este estudo é que a EEAV poderia acelerar o processo de regeneração nervosa, promovendo modificações no número de axônios observados no nervo regenerado após 21 dias.

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

Davini et al. (2005) apontam sua ação circulatória (controle de edema) e regenerativa em úlceras dérmicas, sendo a ação circulatória mais efetiva quando a aplicação é feita com polaridade negativa no limiar motor; quanto à ação regenerativa, maior velocidade de regeneração é alcançada quando o eletrodo estiver sobre a lesão, iniciando a aplicação com polaridade negativa e depois alternando a polaridade. Taylor et al. (1997) destacam que esta corrente reduz a permeabilidade capilar, restringindo assim a passagem de macromoléculas através dos vasos. Kitchen (2003) descreve o efeito bactericida quando o eletrodo cátodo for aplicado sobre a região afetada.

Karnes et al. (1995), aplicaram a EEAV visando redução de edema: em 5 animais utilizaram polaridade negativa; em outros 5, utilizaram polaridade positiva; 4 receberam tratamento com polaridade positiva e negativa e 3 animais controle receberam histamina sem EEAV, durante 30 minutos. Concluíram que EEAV com polaridade positiva, em nível sensorial, reduz o diâmetro arteriolar, sugerindo que a polaridade é uma variável importante para mudança no diâmetro arteriolar, inferindo mudança no fluxo sanguíneo.

Outro fator importante para aplicação desta corrente é a colocação dos eletrodos com orientação monopolar. O eletrodo ativo é colocado sobre o local a ser tratado com um tamanho duas vezes menor que o eletrodo dispersivo, o qual deve ficar distante da área alvo (Robinson e Snyder-Mackler, 2001).

Considerando que os efeitos da EEAV sobre a regeneração nervosa periférica não são conhecidos, este estudo visa contribuir para a compreensão da ação deste tipo de corrente e para o gerenciamento de condutas terapêuticas que permitam acelerar a recuperação funcional após lesão nervosa periférica.

## **2. Objetivos**

---

Investigar o efeito da estimulação elétrica de alta voltagem (EEAV) sobre a regeneração nervosa periférica, através de análise quantitativa dos axônios regenerados após axoniotmese.

## **3. Desenvolvimento**

---

Utilizou-se 24 ratos Wistar machos, divididos em 4 grupos (n=6): Controle(CON) - animais sem lesão e sem EEAV; Desnervado (D) - lesão por esmagamento do nervo isquiático; Desnervado + EEAV diária (DED) - lesão por esmagamento do nervo isquiático e estimulação com EEAV diária, e SHAM – Sem lesão por esmagamento + EEAV diária (SHAM).

Os animais dos grupos D e DED sofreram esmagamento do nervo isquiático esquerdo, com quatro pinçamentos de 20 segundos e intervalo de um segundo entre eles (Fernandes et al., 2005). Os animais do grupo SHAM foram submetidos ao mesmo procedimento, entretanto, o nervo isquiático foi exposto e mantido intacto.

A aplicação de EEAV nos grupos DED e SHAM foi realizada sob anestesia (dose de 0,15 mL/100g de massa

corporal) e teve início 24 horas após a lesão (30 minutos, frequência = 100Hz, Voltagem = 100V). Um eletrodo ativo medindo 2,0 x 2,0 cm foi colocado sobre a cicatriz cirúrgica e outro, dispersivo, medindo 4,0 x 4,0 cm, foi posicionado paralelo ao ativo, com uma distância de 1 cm entre eles. Utilizou-se gel como meio de acoplamento.

Após 21 dias da lesão nervosa os animais foram anestesiados com injeção intramuscular de Ketalar (50 mg/mL) e Rompun (2g/100mL) na proporção 1:1, na dose de 0,3 mL/100g de massa corporal.

O nervo isquiático esquerdo foi exposto cirurgicamente, como descrito previamente, e fixado in situ à 4°C, durante 10 minutos com fixador de Karnovsky (1965) modificado, contendo 1% de paraformaldeído e 2% de glutaraldeído em tampão cacodilato de sódio a 0,1M, pH 7.3. Em seguida, foram eutanasiados por deslocamento cervical.

Em todos os grupos, a porção distal do nervo foi mantida em solução fixadora (Karnovsky) por 24 horas e pós-fixados em tetróxido de ósmio a 1% em tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH 7.3, por duas horas, imersos em uranila 5% durante 24 horas, para coloração em bloco, desidratados em soluções crescentes de acetona e incluídos em resina Araldite (UEGAMA).

Cortes transversais de 1mm foram corados com Azul de Toluidina a 1%, em solução aquosa de bórax a 1%, para microscopia óptica.

Analisou-se um corte por animal em cada grupo, sendo aleatoriamente selecionados 5 campos em cada corte.

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

Utilizou-se o teste ANOVA F one-way, seguido do teste Tukey HSD, considerando  $p < 0,05$ .

#### 4. Resultado e Discussão

---

No grupo CON, o número de axônios foi  $9162 \pm 1394,2$ ; no grupo D, foi  $11143,1 \pm 1149,6$ ; no grupo DED, foi  $9781 \pm 2060,4$  e no grupo SHAM foi  $10077,8 \pm 2262,1$  (Fig. 1). Não houve diferença entre os grupos ( $p=0,4$ ).

**Figura 1:** Valores médios e desvio padrão do número de axônios nos diferentes grupos ( $p=0,4$ ).

Após aplicação de estimulação elétrica de baixa frequência no músculo sóleo desnervado de ratos, Souza (2005) observou  $7614 \pm 676$  axônios no nervo normal,  $9938 \pm 593$  no grupo que sofreu lesão e

eletroestimulação muscular e  $19044 \pm 2426$  no grupo que sofreu lesão e não foi submetido a eletroestimulação, sendo este valor 3 vezes maior que no nervo normal. No grupo eletroestimulado, o número médio de axônios regenerados não foi diferente do grupo controle, sugerindo que a estimulação elétrica baixa frequência pode ter alterado as características do microambiente de regeneração, provavelmente diminuindo a expressão de fatores secretados pelos músculos denervados.

No estudo de Oliveira et al. (2008), que utilizaram estimulação elétrica muscular e natação na fase aguda após axoniotmese, o número de axônios regenerados nos animais desnervados foi maior que nos animais controle. Quando animais desnervados foram submetidos à estimulação elétrica de baixa frequência, o número de axônios regenerados foi maior que nos animais apenas desnervados. Eles concluíram que a estimulação elétrica muscular não inibiu a regeneração nervosa, como ocorre quando a estimulação elétrica crônica de baixa frequência é aplicada.

## 5. Considerações Finais

---

Conclui-se que a EEAV aplicada diariamente não influenciou o número de axônios regenerados após axoniotmese. Outros estudos são necessários para investigar o efeito dessa corrente sobre a maturação dos axônios regenerados.

## Referências Bibliográficas

---

BURNET, M.G.; ZAGER, E.L. Pathophysiology of peripheral nerve injury: a brief review. *Neurosurg. Focus.* 16: 1-7, 2004.

CARTER, A.J., et al. Changes in muscle cytoarchitecture alter Peripherals nerve injury and repair. *Journal of Hand surgery, Great Britain*, v. 23b, n.3, pa. 265-369, 1998.

DAVINI, R. et al. Estimulação elétrica de alta voltagem: uma opção de tratamento. *Rev. Bras. Fisioter.* 9 (3):249-256, 2005.

FAWCETT, J.W.; KEYNES, R.J. Peripheral nerve regeneration. *Rev.Neurosci*, 13:43-60, 1990.

FERNANDES, K.C.B.G., et al. Análise Morfométrica dos Tecidos Muscular e Conjuntivo Após Desnervação e Estimulação Elétrica De Baixa Frequência. *Rev Bras Fisiot.* 9 (2): 235-241, 2005.

GIGO-BENATO, D.; GEUNA, S.; ROCKKIND, S. Phototherapy for enhancing peripheral nerve repair: a review of the literature. *Muscle Nerve.* 31: 694-701, 2005.

LOW, J.; REED, A. Eletroterapia explicada: princípios e prática. Manole: São Paulo; 2001.

KARNES, J.L., et al High-voltage pulsed current: its influence on diameters of histamine-dilated arterioles in hamster cheek pouches. *Arch phys med rehabil.* 76, 1995.

KARNOVSKY, M.J. A formaldeyde – glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy.

J Cell Biol. 27:137, 1965.

KITCHEN, S. Eletroterapia: Prática baseada em evidência. 11ªed. Manole: São Paulo; 2003.

MENDONÇA, A.C.; BARBIERI, C.H.; MAZZER, N. Directly applied low intensity direct electric current enhances Peripherals nerve regeneration in rats. Journal of neuroscience methods. 129: 183-190, 2003.

MONTE-RASO, V.V., et al. Os efeitos do ultra-som terapêutico nas lesões por esmagamento do nervo ciático de ratos: análise funcional da marcha.Revista brasileira de fisioterapia.10(1): 113-119, 2006.

NELSON, R.M.; HAYES, K.W.; CURRIER, D.P. Eletroterapia Clínica. 3ª ed. Manole: São Paulo; 2002.

OLIVEIRA, L.S.; et al. Estimulación eléctrica y natación en La fase aguda de La axoniotmesis: influencia sobre La regeneración nerviosa y La recuperación funcional. Rev. Neurol. 47(1): 11-15, 2008.

ROBINSON, A.J. e SNYDER-MACKLER, L. Eletrofisiologia Clínica – Eletroterapia e teste eletrofisiológico. 2ª ed. Artmed: Porto Alegre; 2001.

SOBRAL, L.L. Exercício imediato versus tardio na regeneração do nervo isquiático de ratos após axoniotmese: análise morfométrica e funcional. 2007. Dissertação (Mestrado) – Universidade Metodista de Piracicaba – UNIMEP, Piracicaba.

SOUZA, A.V.A. Efeito da estimulação muscular de baixa frequência sobre a regeneração do nervo isquiático de ratos submetidos a axoniotmese. 2005. 72f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Metodista de Piracicaba – UNIMEP, Piracicaba.

TAYLOR, K.; et al. Effect of high-voltage pulsed current and alternating current on macromolecular leakage in hamster cheek pouch microcirculation. Physical therapy. 1997; 77 (12): 1729-1740.

## Anexos

