

**UNIVERSIDADE METODISTA DE PIRACICABA**

**FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM**

**FISIOTERAPIA**

Estimulação elétrica de alta voltagem como alternativa  
para o tratamento da lesão nervosa periférica

**Valéria de Oliveira Fontes**

**2009**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

UNIVERSIDADE METODISTA DE PIRACICABA

FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOTERAPIA

Estimulação elétrica de alta voltagem como alternativa  
para o tratamento da lesão nervosa periférica

**Valéria de Oliveira Fontes**

**2009**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Valéria de Oliveira Fontes**

Estimulação elétrica de alta voltagem como alternativa  
para o tratamento da lesão nervosa periférica

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia, da Universidade Metodista de Piracicaba, para obtenção do Título de Mestre em Fisioterapia. Área de Concentração: Intervenção Fisioterapêutica. Linha de Pesquisa: Plasticidade Neuromuscular e Desenvolvimento Neuromotor - Avaliação e Intervenção Fisioterapêutica.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Rosana Macher Teodori

**PIRACICABA**

**2009**

Fontes, Valéria O.

Estimulação elétrica de alta voltagem como alternativa para o tratamento da lesão nervosa periférica.

2009.

68 p.

Orientadora: Profa. Dra. Rosana Macher Teodori

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

1. Degeneração e Regeneração Nervosa. 2. Estimulação Elétrica de Alta Voltagem. 3. Morfometria. 4. Índice Funcional do Ciático. I. Teodori, Rosana Macher. II. Universidade Metodista de Piracicaba, Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia. III. Título

A Deus;  
Ao meu filho Victor;  
Aos meus pais.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por tudo que ele fez e faz em minha vida.

À minha família, pelo carinho e compreensão com as minhas escolhas.

À Profa. Dra. Rosana Macher Teodori, pela paciência, e dedicação à pesquisa.

À Profa. Dra. Maria Imaculada de Lima Montebelo, pela paciência e eficiência na realização das análises estatísticas.

Em especial à amiga Andréia Maria Silva, pelo carinho e por estar presente em todos os momentos.

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

A todas as pessoas que contribuíram de forma direta ou indireta para a realização deste trabalho.

“A dúvida é o princípio da sabedoria”.  
Aristóteles

## RESUMO

A estimulação elétrica de alta voltagem (EEAV) é um recurso fisioterapêutico utilizado na clínica para tratamento de edema, dor e cicatrização de úlceras dérmicas, considerando seu efeito circulatório e regenerativo. O objetivo deste estudo foi investigar o efeito da EEAV aplicada em dias alternados sobre as características morfométricas e funcionais do nervo isquiático de ratos após axoniotmese. Vinte ratos Wistar jovens ( $213,7\text{g} \pm 10,2$ ) foram divididos em 4 grupos ( $n=5$ ): Controle (CON); Desnervado (D); Desnervado + EEAV (DEA); SHAM (S) animais sem lesão nervosa, mas submetidos a incisão cirúrgica e EEAV em dias alternados. O nervo isquiático esquerdo foi esmagado com 4 pinçamentos de 20 segundos. Após 24 horas da lesão, os animais dos grupos DEA e S foram submetidos a EEAV (Frequência de 100 Hz; tensão a partir de 100 V, duração do pulso de 20  $\mu\text{seg}$  e duração interpulso de 100  $\mu\text{seg}$ , estimulação cátodica até o limiar motor por 30 minutos), durante 21 dias, realizados três vezes por semana. O eletrodo ativo foi posicionado sobre a cicatriz cirúrgica e o dispersivo contralateral ao ativo, com 1 cm de distância entre eles. O Índice Funcional do Ciático (IFC) foi avaliado nos períodos (pré-operatório, 7<sup>o</sup>, 14<sup>o</sup> e 21<sup>o</sup> dia pós-operatório - PO), sendo mensuradas a distância entre a extremidade do terceiro artelho e o calcâneo; entre o primeiro e o quinto artelho e entre o segundo e quarto artelho, em ambas as patas. O nervo isquiático de todos os animais foi coletado, fixado em Karnovsky, pós-fixado em tetróxido de ósmio, processado por inclusão em resina Araldite e cortados transversalmente (1  $\mu\text{m}$ ) para análise morfométrica e quantitativa. Para análise estatística, verificou-se a normalidade dos dados pelo teste Shapiro-Wilk e a homocedasticidade foi verificada através do teste de Bartlett. Para análise morfométrica, utilizou-se o teste Anova (F), seguido de Tukey HSD e para análise funcional, utilizou-se o teste Anova (F) para medidas repetidas, seguido de *post hoc* LSD, considerando o nível de significância de 5 %. O número de axônios não foi diferente entre os grupos ( $p=0,20$ ). O diâmetro dos axônios e das fibras nervosas, bem como a espessura das bainhas de mielina foi sempre maior no grupo tratado com EEAV que no grupo não tratado ( $p<0,01$ ). A razão G também não foi diferente entre os grupos ( $p>0,05$ ). A recuperação funcional foi significativamente melhor no grupo DEA no 14<sup>o</sup> dia PO, em relação ao grupo D. Aos 21 dias PO, todos os grupos atingiram valores funcionais normais. Conclui-se que a EEAV, aplicada em dias alternados, acelerou a regeneração nervosa e recuperação funcional após lesão por esmagamento em ratos.

**Palavras-Chave:** nervo ciático, estimulação elétrica, trauma do sistema nervoso, sistema nervoso periférico.

## ABSTRACT

The high-voltage electric stimulation (HVES) is a clinical physiotherapeutic resource for treating of edema, pain or in the healing process of dermic ulcers, considering their circulatory and regenerative effect. The aim of this study was to investigate the effect of HVES when applied on alternate days on morphometric and functional characteristics of rat sciatic nerve after axonotmesis. Twenty young Wistar rats (213,7g  $\pm$  10,2) divided into four groups (n=5): Control (CON); Denervated (D); Denervated + EEAV (DEA); SHAM (S) rats without nerve lesion but submitted to surgical incision and HVES on alternate days. The left sciatic nerve was crushed with four clampings of 20 seconds each. Twenty-four hours after, the rats from group DEA and S underwent HVES cathodic stimulation until the motor threshold, for 30 minutes (100 Hz frequency, tension of 100 V, pulse duration of 20  $\mu$ s and interpulse duration of 100  $\mu$ s) during 21 days, three times a week. The active electrode was placed over the surgical scar and the dispersive was placed contralateral to the active, with 1 cm distance between them. The Sciatic Functional Index (IFI) was evaluated at the pre operatory period and on the 7<sup>th</sup>, 14<sup>th</sup> and 21<sup>st</sup> post operatory (PO) day. The distance between the third finger extremity and calcaneus were measured, as well as the distance between 1<sup>st</sup> to 5<sup>th</sup> finger and that from 2<sup>nd</sup> and 4<sup>th</sup> finger on both legs. All animal's sciatic nerve was collected, fixed in Karnovsky, post fixed in osmium tetroxide, processed for inclusion in Araldite resin and 1  $\mu$ m transverse sections were made for the morphometric and quantitative analysis. For statistical analysis, normality of data was checked by Shapiro-Wilk test and homocedasticity by Bartlett test. For morphometric analysis, the Anova test (F) was used for repeated measures, followed by post hoc LSD, 5% being the standard of significance considered. The number of axons was not different among the groups ( $p=0.20$ ) The diameter of axons and of nerve fibers as well as the myelin sheath thickness was always higher in the group treated with HVES than in the group not treated ( $p<0.01$ ). G Ratio was not different among the four groups ( $p<0.05$ ). Functional recovery was significantly better in the group DEA on the fourteenth PO day compared to group D. On the 21<sup>st</sup> PO day, all groups reached normal functional values. We conclude that the HVES applied on alternate days speeded up nerve regeneration and functional recovery after sciatic nerve crush injury in rats.

**Key words:** sciatic nerve, electric stimulation, nervous system trauma, peripheral nervous system.

# SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	4
2.1 ESTRUTURA DO NERVO PERIFÉRICO.....	4
2.2 LESÃO NERVOSA PERIFÉRICA.....	5
2.3 DEGENERAÇÃO E REGENERAÇÃO NERVOSA.....	6
2.4 ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA DE ALTA VOLTAGEM.....	9
3 OBJETIVO.....	13
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	14
4.1 ASPECTOS ÉTICOS.....	14
4.2 DESENHO DO ESTUDO.....	14
4.3 GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	14
4.4 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS.....	15
4.4.1 ANÁLISE FUNCIONAL DA MARCHA.....	15
4.4.2 LESÃO NERVOSA.....	18
4.4.3 ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA DE ALTA VOLTAGEM.....	20
4.4.4 COLETA E PROCESSAMENTO DO NERVO.....	22
4.5 ANÁLISE DOS DADOS.....	23
4.5.1 ANÁLISE MORFOMÉTRICA.....	23
4.5.2 ANÁLISE DO NÚMERO DE AXÔNIOS.....	25
4.6 ANÁLISE ESTÁTICA.....	26
5 RESULTADOS.....	27
5.1 ANÁLISE HISTOLÓGICA .....	27
5.2 ANÁLISE QUANTITATIVA.....	29
5.2.1 NÚMERO DE AXÔNIO.....	29
5.3 ANÁLISE MORFOMÉTRICA.....	30

5.3.1 DIAMÊTRO DOS AXÔNIOS.....	30
5.3.2 DIAMÊTRO DAS FIBRAS NERVOSAS.....	31
5.3.3 ESPESSURA DA BAINHA DE MIELINA.....	32
5.3.4 RAZÃO G.....	33
5.4 ANÁLISE FUNCIONAL DA MARCHA.....	34
5.4.1 ANÁLISE INTERGRUPOS.....	34
5.4.2 ANÁLISE INTRAGRUPOS.....	35
6 DISCUSSÃO.....	36
7 CONCLUSÃO.....	44
REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	45
ANEXO 1 .....	56

## 1 Introdução

O homem moderno tem sido cada vez mais exposto a situações de trauma. Mendonça, Barbieri e Mazzer (2003) comentam que essas lesões são cada vez mais frequentes na rotina dos atendimentos de urgência dos hospitais, em consequência do aumento da violência urbana, acidentes de trânsito, domésticos e profissionais, como também nos acidentes no esporte e nas atividades de vida diária.

Traumas em nervos causam diminuição ou perda da sensibilidade e motricidade no território inervado (Lee e Wolfe, 2000; Robinson, 2000). Todavia, a recuperação funcional é um processo lento dependente da natureza, extensão e grau da lesão, bem como da regeneração nervosa. Assim, quanto mais precoce a reinervação, melhor o prognóstico (Eberstein e Eberstein, 1996).

Alterações histológicas ocorrem no músculo após a desnervação, como a diminuição da massa muscular em consequência da perda da ação trófica do neurônio motor sobre o músculo (Lieber, 2002), além da proliferação de tecido conjuntivo (Fernandes et al., 2005).

Lundborg (2003), aponta a necessidade de técnicas de reparo que permitam um restabelecimento sensorial e motor eficiente. Entretanto, além da importância do reparo cirúrgico nos casos de secção nervosa, diferentes recursos fisioterapêuticos tem sido estudados com o objetivo de acelerar o processo de reinervação muscular e recuperação funcional, como a laserterapia (Anders, Geuna e Rochkind, 2004), o ultra-som (Crisci e Ferreira, 2002; Monte Raso et al., 2006) e a eletroestimulação crônica de baixa frequência (Eberstein e Eberstein, 1996). No Laboratório de Plasticidade Neuromuscular do Programa de Pós-graduação em

Fisioterapia da Universidade Metodista de Piracicaba (UNIMEP), tem sido investigados, dentro da linha de pesquisa Plasticidade Neuromuscular e desenvolvimento Neuromotor, os efeitos do exercício físico através da natação (Oliveira et al., 2008), de corrida em esteira (Sobral et al., 2008) e do ambiente enriquecido (Takeda et al., 2008), além da eletroestimulação fásica de baixa frequência (Fernandes et al., 2005; Oliveira et al., 2008). Esses estudos tem contribuído para a compreensão da influência de diferentes recursos terapêuticos sobre o processo de regeneração nervosa, bem como a melhor forma de intervenção para acelerar esse processo, visando uma rápida recuperação funcional.

A estimulação elétrica de alta voltagem (EEAV) é um recurso utilizado na clínica fisioterapêutica para o tratamento de úlceras dérmicas, diminuição de edema e redução da dor (Robinson e Snyder-Mackler, 2001). Os primeiros estudos científicos relacionados a este recurso remontam à década de 70 e se baseiam no reparo do sistema tegumentar (Davini et al., 2005) e no efeito circulatório (Taylor et al., 1997).

Há evidências que comprovam a efetividade da aplicação da EEAV na cicatrização de úlceras cutâneas crônicas (Davini et al., 2005), sendo que a estimulação catódica pode exercer efeito bactericida quando aplicada a sobre a lesão até que esta apresente uma aparência serosanguínea (Unger, Eddy e Raimastry, 1991).

Estudo recente realizado por Silva (2009), no âmbito do grupo de pesquisa de Plasticidade Neuromuscular da UNIMEP, demonstrou que a EEAV aplicada diariamente sobre o nervo isquiático esmagado acelerou a maturação das fibras nervosas regeneradas e a recuperação funcional em ratos.

Esses resultados levaram à necessidade de investigação de outra variável, como a frequência semanal de aplicação do recurso, o que constitui um fator relevante quando se considera as limitações de tempo disponível para o tratamento em humanos.

Este estudo investigou a hipótese de que a aplicação de EEAV em dias alternados sobre o nervo submetido a axoniotmese pudesse garantir o efeito regenerativo desse recurso e acelerar a regeneração nervosa e recuperação funcional em ratos.

## **2 Revisão da Literatura**

### **2.1 Estrutura do nervo**

O nervo é constituído de axônios, células de Schwann e tecido conjuntivo (Dagum, 1998), sendo o axônio a região do neurônio responsável pela condução do estímulo nervoso, tanto no sentido centrípeto quanto centrífugo (Ferreira e Martinez, 2000).

As fibras nervosas mielínicas apresentam um axônio envolvido por uma célula de Schwann que enrola-se ao seu redor, formando lamelas concêntricas. Nas fibras amielínicas, com calibre 0,5 a 2 $\mu$ m, uma célula de Schwann pode contornar diversas fibras nervosas (Guyton e Hall, 2002).

O suprimento vascular do nervo é bem desenvolvido, havendo, nas três bainhas conjuntivas, vasos sanguíneos que regulam o fluxo local (Pachioni et al., 2006). Anatomicamente, o nervo possui três bainhas conjuntivas: endoneuro, perineuro e epineuro, responsáveis por proteger e organizar as fibras nervosas. O endoneuro é o nível mais interno, constituído de tecido conjuntivo frouxo, colágeno, fibroblastos e capilares sanguíneos. O perineuro é o nível intermediário, constituído de feixes de fibras nervosas contendo tecido conjuntivo fibroso que tem como função manter a pressão intrafascicular, atuando também como barreira de difusão a várias substâncias e na proteção contra agentes infecciosos (Flores, Lavernia e Owens, 2000). O epineuro é o nível mais externo, constituído de fibras colágenas e elásticas, mastócitos, macrófagos e fibroblastos, tendo como função proteger o nervos. As

bainhas conjuntivas são essenciais para proteção da fibra nervosa e estão orientadas de forma a limitar o estiramento mecânico do nervo, tanto por movimentos do corpo, como por forças externas. Sua integridade é importante também nos processos de regeneração nervosa (Sunderland, 1965).

## **2.2 Lesão Nervosa Periférica**

As lesões nervosas periféricas são cada vez mais comuns em acidentes automobilísticos, indústrias e no ambiente doméstico. Inúmeros fatores podem influenciar a regeneração nervosa, como a idade do paciente, tipo e localização da lesão, entre outros (Mendonça, Barbieri e Mazzer, 2003).

Seddon (1943), citado por Robinson (2000), classificou as lesões nervosas periféricas com base no grau de comprometimento dos axônios e no prognóstico de recuperação, como: neuropraxia, axoniotmese e neurotmeze.

Neuropraxia é o grau mais leve de lesão, onde ocorre um bloqueio localizado de condução, porém, com preservação da continuidade axonal. Ela também é conhecida como “paralisia do sábado à noite”, ocorrendo recuperação rápida e completa em poucos dias ou semanas (Colohan, Pitts e Rosegay, 1996; Grant, Goodkin e Kliot, 1999; Robinson, 2000).

Na axoniotmese a lesão é grave, sendo caracterizada por compressão ou esmagamento do nervo, com interrupção da continuidade axonal, porém os envoltórios conjuntivos e a microcirculação são preservados. Imediatamente após a lesão ocorre degeneração Walleriana e a regeneração axonal acontece de forma processual, numa velocidade de 1 mm por dia no homem (Burnett e Zager, 2004).

Trata-se de uma lesão reversível, onde a recuperação funcional é esperada (Bridge et al., 1994; Robinson, 2000; Burnett e Zager, 2004).

A neurotmeose é um tipo de lesão grave onde ocorre ruptura completa do nervo e o prognóstico de recuperação não é favorável. É necessário uma reconexão cirúrgica, porém, mesmo com o reparo, seu resultado pode ser limitado, pois vários fatores podem interferir para que a recuperação funcional não seja completa (Omura et al., 2005).

Sunderland (1978), citado por Robinson (2000), classificou as lesões em cinco graus, sendo o Grau I correspondente à neuropraxia de Seddon; o Grau II à axonotmeose de Seddon; o Grau III fica entre axonotmeose e neurotmeose de Seddon, onde a continuidade do axônio é rompida por perda dos tubos endoneurais, porém o perineuro e epineuro estão preservados; no Grau IV os fascículos nervosos (axônio, endoneuro e perineuro) são rompidos, com excessão do epineuro (Robinson, 2000; Ferreira, 2001) e no Grau V ocorre a lesão completa do nervo, equivalendo à neurotmeose de Seddon.

### **2.3 Degeneração e Regeneração nervosa**

A lesão nervosa dá lugar a alterações em toda fibra nervosa, desde o local da lesão até o órgão receptor. Em 1850, foi observada por Augustus Waller a degeneração do segmento distal de um nervo seccionado com a simultânea sobrevivência do segmento proximal (Ferreira e Martinez, 2000).

Alterações bioquímicas, estruturais, celulares e moleculares acontecem em toda a célula, no sentido de recuperar a função do nervo danificado (Flores, Lavernia

e Owens, 2000; Burnett e Zager, 2004). Entre tais alterações estão a cromatólise, o aumento de volume do corpo celular, a migração do núcleo para a periferia da célula e alterações metabólicas (Burnett e Zager, 2004). Logo após estas mudanças segue-se a desintegração granular do citoesqueleto axoplasmático. Quarenta e oito horas após a lesão não se evidenciam fibras normais, estando presente a desintegração do citoesqueleto axonal, o que constitui um processo ativo de destruição por proteólise enzimática mediada por calpaína (Ferreira e Martinez, 2000).

Quinze dias após a lesão ocorre a proliferação de mastócitos, que liberam histamina e serotonina, que auxiliam no aumento da permeabilidade capilar e facilitam a migração de macrófagos ao local para realizar a fagocitose dos restos degenerados (Burnett e Zager, 2004).

As células de Schwann resultantes de divisões celulares formam cadeias de células que se interdigitam, formando as “bandas de Büngner” no interior dos tubos de membrana basal. Ocorre síntese de fator de crescimento neural (NGF), que favorece o brotamento dos axônios durante a reinervação (Stoll e Muller, 1999; Ferreira e Martinez, 2000; Dubový, 2004).

O processo de regeneração é iniciado horas após a lesão. Os axônios da porção proximal formam os primeiros brotos ou neuritos nos locais correspondentes aos nodos de Ranvier, a chamada zona germinativa (Ide, 1996; Ferreira, 2001). Mediados por fatores tróficos, dois a três neuritos seguem em direção ao órgão-alvo (Fawcett e Keynes, 1990; Ide, 1996).

Durante o processo regenerativo ocorre aumento da síntese de proteínas, dentre elas as GAPs (Proteínas Associadas ao Crescimento), como a GAP-43 e as proteínas do citoesqueleto, actina, proteína dos neurofilamentos e a tubulina (Fawcett e Keynes, 1990; Ide, 1996). Nesse momento, aumentam também as moléculas de adesão celular neural (NCAM), e a N caderina semelhante à insulina – I, que tem a finalidade de contribuir para o crescimento do axônio e proliferação de células de Schwann, inibindo a apoptose (Ide, 1996).

Os neuritos em crescimento se expandem a partir do cone de crescimento e, através de movimento amebóide, exploram o ambiente de regeneração. Nesse contexto, no interior das bandas de Büngner, as células de Schwann fornecem aos neuritos em crescimento, fatores tróficos, como a laminina e a fibronectina, que favorecem o alcance dos órgãos efetadores pelos neuritos (Fawcett e Keynes, 1990).

A reinervação muscular após axoniotmese tem início aproximadamente 15 dias após a lesão, quando se observa a poliinervação. O período que corresponde ao pico de poliinervação é entre o 21<sup>o</sup> e o 25<sup>o</sup> dia. A partir do momento em que o contato sináptico é recuperado, a síntese de receptores extrajuncionais e a liberação de fatores tróficos pelo músculo é diminuída, iniciando-se a eliminação sináptica, na qual a extremidade dos neuritos regenerados se transforma em terminal nervoso (Carmignoto et al., 1983; Gorio et al., 1983) e os demais neuritos sofrem um processo de retração e degeneram (Sanes e Lichtman, 1999). A partir disso, as fibras musculares tornam-se monoinervadas (Gorio et al., 1983) e a função do músculo é recuperada.

Na expectativa de favorecer ou acelerar o reparo nervoso e a recuperação funcional, diversos recursos fisioterapêuticos tem sido investigados, dentre os quais a estimulação elétrica de alta voltagem recentemente tem merecido destaque.

## **2.4 Estimulação Elétrica de Alta Voltagem (EEAV)**

A EEAV se caracteriza por ser uma corrente de pulso monofásica de dois picos, com amplitude de pico máximo de até 500 V, durações de pulso de aproximadamente 50 a 200  $\mu$ s e frequências que variam de 1 até aproximadamente 120 Hz (Low e Reed, 2001).

Na literatura, a maioria dos estudos realizados com EEAV são relacionados ao seu efeito circulatório, na redução de edema (Taylor et al., 1997; Davini et al., 2005).

Davini et al. (2005) descrevem a ação circulatória e regenerativa da EEAV, apontando que o efeito circulatório é mais evidente quando aplicada a estimulação catódica (pólo negativo) no limiar motor e que a regeneração do tecido tegumentar ocorre com maior velocidade quando o eletrodo é aplicado sobre a lesão, com alternância da polaridade, iniciando-se com a aplicação catódica.

Robinson e Snyder-Mackler (2001) sugerem que o eletrodo ativo deve ser colocado sobre o local a ser tratado e seu tamanho deve ser menor, enquanto o eletrodo dispersivo deve ficar distante da área alvo e seu tamanho deve ser o dobro do ativo.

Como a EEAV possui polaridade definida (onda monofásica) pode ser efetiva para conter e absorver edemas agudos, assim como acelerar a reparação de tecidos dérmicos e subdérmicos e controlar a dor (Nelson, Hayes e Currier, 2003). Vários autores discutem seu efeito bactericida quando o cátodo é aplicado sobre a região a ser tratada (Unger et al., 1991; Szuminsky et al., 1994; Kitchen, 2003).

Segundo Karnes et al. (1995) a corrente de alta voltagem atua durante a formação do edema, modificando o comportamento endotelial, diminuindo a permeabilidade capilar em consequência da diminuição do tamanho dos poros capilares, restringindo a passagem de proteínas para o meio intersticial, limitando assim a formação do edema.

Taylor et al. (1997) sugerem que a forma de corrente e intensidade é importante e também apontam que a excitação produzida pela EEAV pode alterar as concentrações de cálcio intracelular, inibindo a formação do edema.

Low e Reed (2001) ainda apontam que, quando a EEAV é aplicada no limiar motor, promove efeito de bombeamento, favorecendo o metabolismo muscular devido ao aumento na liberação de dióxido de carbono, ácido láctico e outros metabólitos, aumentando o fluxo sanguíneo no músculo e tecidos ao redor, auxiliando na redução do edema.

A EEAV apresenta vantagens clínicas, pois são mínimos seus efeitos térmicos e eletroquímicos sob o eletrodo, estando maior densidade de corrente disponível para o local a ser tratado (Zoghi e Jaberzadeh, 2002).

Bettany, Fish e Mendel (1990), submeteram 20 sapos a lesões em hiperflexão do tornozelo, aplicando EEAV catódica sobre o edema ( $T= 75\mu s$ ,  $f= 120$  Hz), em quatro intervenções de 30 minutos com intervalos de 1 hora e meia. A volumetria foi realizada pré e pós-intervenção e 17, 20 e 24 horas após a indução da lesão. O objetivo era observar a influência da EEAV nos diferentes nos períodos. Sua efetividade foi justificada pela diminuição da permeabilidade vascular e pela indução da contração muscular, que resulta na compressão de vasos venosos e linfáticos, favorecendo o retorno venoso.

Taylor et al. (1992) aplicaram estimulação catódica sobre o edema pós-traumático, em sapos. A volumetria do membro tratado foi efetuada antes e após a indução da lesão, durante as primeiras 24 horas pós-lesão (1,5; 3; 4; 5; 8; 17; 20 e 24 horas). O protocolo utilizado foi: T= 5 a 8  $\mu$ s, f= 120 Hz, intensidade de 30 a 40 V, durante sessão única de 30 minutos. A EEAV provocou redução no tamanho dos poros da microcirculação, o que restringiu a passagem de proteínas plasmáticas e fluidos dos vasos para o interstício do tecido, havendo contenção na formação de edema após aplicação da EEAV na fase imediata e também 1,5; 3; 4 e 5 horas após o tratamento.

Garcia e Guirro (2005) selecionaram 15 voluntárias com idade entre 40 e 65 anos (51,13  $\pm$ 9,08) com mastectomia unilateral e apresentando como principal sequela pós-cirúrgica, linfedema secundário. O protocolo de tratamento consistiu da aplicação de EEAV por 20 minutos no membro afetado, durante 7 semanas (14 sessões), com os seguintes parâmetros: 50Hz, modo sincronizado, relação *on/off* de 3:9 segundos, *Rise/Decay* 2:1 segundo, polaridade negativa e amplitude necessária para contração muscular. A evolução do tratamento foi analisada pela perimetria (em seis pontos distintos) e pela volumetria pré e pós-tratamento, tendo havido redução do linfedema, justificado pelos autores devido ao incremento circulatório proporcionado pela EEAV.

Silva (2009) avaliou o efeito da EEAV aplicada em dias consecutivos sobre a cicatriz cirúrgica após axoniotmese (estimulação catódica, até o limiar motor por 30 minutos; Frequência de 100 Hz; Voltagem de 100 V; duração de pulso de 20  $\mu$ s e duração interpulso de 100  $\mu$ s) durante 21 dias. Ao analisar as características quantitativas e morfométricas do nervo isquiático regenerado, observou que o

recurso não influenciou o número de axônios regenerados, enquanto o diâmetro dos axônios, apesar de não ter alcançado os valores controle, foi significativamente maior que o grupo que não sofreu intervenção. Já o diâmetro das fibras nervosas e a espessura das bainhas de mielina recuperaram os valores controle, apontando o efeito positivo da EEAV sobre a maturação das fibras regeneradas, superando as expectativas de maturação apontadas na literatura. A recuperação funcional foi acelerada pela EEAV, tendo iniciado mais precocemente no grupo tratado. Esses resultados foram atribuídos ao efeito circulatório da estimulação catódica, que favoreceu o aporte de nutrientes e fatores neurotróficos importantes para o restabelecimento das características morfológicas e fisiológicas do nervo.

Considerando esses resultados, é necessário investigar se esses benefícios seriam mantidos quando a aplicação da EEAV fosse realizada em dias alternados, o que poderia facilitar a utilização desse recurso em humanos, reduzindo o tempo necessário ao tratamento.

### **3 OBJETIVO**

Investigar o efeito da Estimulação Elétrica de Alta Voltagem aplicada em dias alternados sobre as características morfométricas e funcionais do nervo isquiático de ratos após axoniotmese.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Aspectos Éticos

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de São Carlos, sob protocolo nº037/2008 (anexo 1).

### 4.2 Desenho do Estudo

Tratou-se de uma pesquisa do tipo experimental realizada no Laboratório de Pesquisa em Plasticidade Neuromuscular, do Programa de Pós-graduação em Fisioterapia da Faculdade de Ciências da Saúde, da Universidade Metodista de Piracicaba (UNIMEP).

### 4.3 Grupos Experimentais

Foram utilizados 20 ratos Wistar jovens, pesando 213,7g ( $\pm 10,2$ ), procedentes do Biotério Central da UNIMEP. Os animais foram divididos em 4 grupos (n=5):

- **Controle (CON)** - animais sem qualquer intervenção.
- **Desnervado (D)** - animais submetidos à lesão por esmagamento do nervo isquiático.
- **Desnervado + EEAV alternado (DEA)** - animais submetidos a lesão e subsequente aplicação de EEAV em dias alternados.

- **SHAM (S):** animais em que o nervo foi exposto e não esmagado, porém submetidos à EEAV em dias alternados.

#### **4.4 Procedimentos Experimentais**

##### **4.4.1 Análise Funcional da Marcha**

Para a análise do Índice Funcional do Ciático (IFC), utilizou-se uma passarela (8,2 x 42 cm) com uma caixa de fundo escuro numa das extremidades (Figura 1).

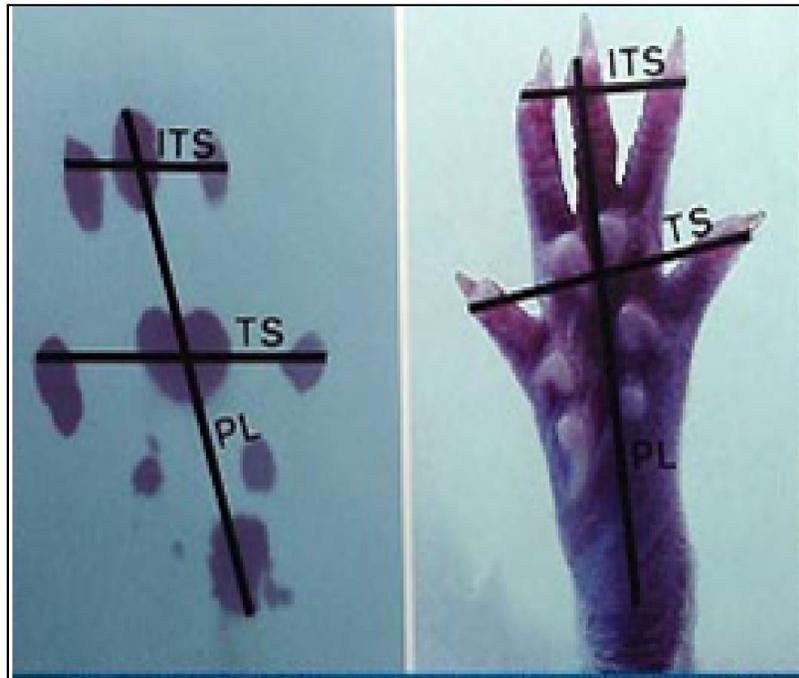
Após treino inicial, quando os animais foram colocados duas ou três vezes para caminhar na passarela para reconhecer o ambiente, os ratos foram colocados para caminhar na passarela revestida com papel sulfite branco, com as patas posteriores marcadas com tinta de impressão digital, a fim de realizar o registro das patas normal e experimental (Varejão et al., 2001; 2003; 2004).



**Figura 1:** Aparato utilizado para obtenção do Índice Funcional do Ciático (IFC), mostrando as pegadas do animal impressas em papel branco.

A partir das impressões plantares, foram obtidas as distâncias descritas a seguir, conforme (Figura 2):

1. Entre a extremidade do terceiro artelho e o calcâneo – comprimento da pegada (PL);
2. Entre o primeiro e o quinto artelho – largura da pegada (TS);
3. Entre o segundo e quarto artelho – largura intermediária da pegada (ITS).



**Figura 2:** Parâmetros de medidas de comprimento para cálculo do Índice Funcional do Ciático (IFC).

Fonte: Varejão et al. (2004).

As medidas foram tomadas das patas experimental (E) e normal (N), por meio de um paquímetro digital *MITUTOYO*<sup>®</sup>. Os valores obtidos foram aplicados na equação proposta por Bain, Mackinnon e Hunter (1989), antes (pré-operatório) e após o 7<sup>o</sup>, 14<sup>o</sup>, 21<sup>o</sup> dias da cirurgia de esmagamento do nervo isquiático.

Os resultados obtidos dessa equação expressam a perda funcional em termos percentuais, sendo que o valor 0 (zero) representa a função normal ou ausência de disfunção e o valor -100 (menos cem) representa a perda total da função nervosa. Portanto, quanto mais próximo de 0 (zero) o valor obtido, melhor a função (Varejão et al., 2001; 2003; 2004 ).

#### 4.4.2 Lesão nervosa

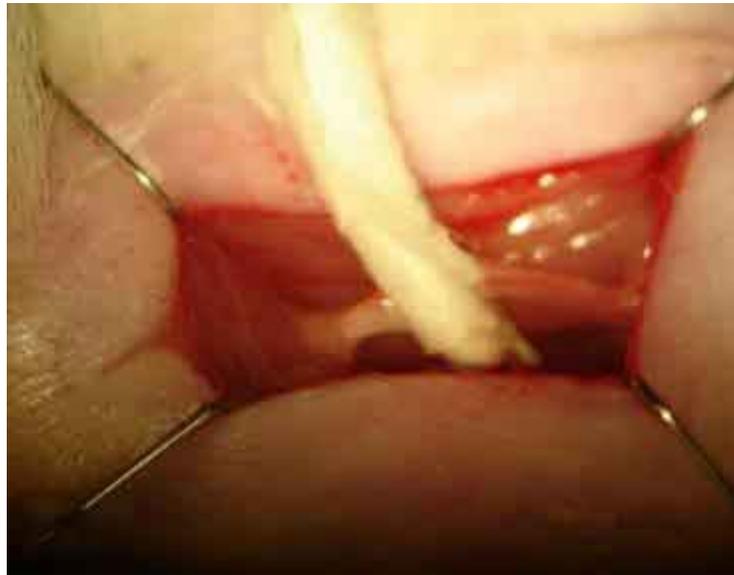
Os animais foram pesados e aqueles pertencentes aos grupos D e DEA foram submetidos à cirurgia para esmagamento do nervo isquiático, recebendo anestesia intramuscular de uma mistura de Ketalar<sup>®</sup> (Cloridrato de Ketamina - 50 mg/mL) e Rompum<sup>®</sup> (Cloridrato de Tiazina - 2g/100mL), na proporção 1:1, na dose de 0,3 mL/100g de massa corporal. Logo após, os animais foram posicionados em decúbito ventral e submetidos à tricotomia da região glútea e posterior da coxa esquerda, realizando-se uma incisão de 2 cm sobre a pele, sendo os músculos subjacentes divulsionados até exposição do nervo isquiático (Figura 3), que foi delicadamente separado do tecido conjuntivo adjacente e esmagado com uma pinça hemostática previamente preparada. Foram realizados quatro pinçamentos com duração de 20 segundos e intervalo de um segundo entre eles, de acordo com Fernandes et al. (2005) - Figura 4.

Os pinçamentos foram realizados a uma distância de 5 mm da região proximal ao ponto de ramificação do nervo isquiático.

Ao término desse procedimento, os planos muscular e cutâneo foram fechados com fio de sutura Ethicon 6-0.

Após recuperação anestésica, administrou-se 4 µL de dipirona sódica (500mg/mL) por via oral, com efeito analgésico e PVP (povidine) – I 10% (uso tópico) no local da incisão, a cada 12 horas, no primeiro e segundo dias pós-operatório.

Todos os animais foram mantidos individualmente em caixas de polietileno nos três primeiros dias, sendo após esta data colocados em grupo em gaiolas grandes durante 21 dias, com água e ração comercial à vontade, sob temperatura controlada e ciclo automático de iluminação de 12 horas claro/escuro.



**Figura 3:** Método utilizado para o esmagamento do Nervo.



**Figura 4:** Aspecto macroscópico do nervo imediatamente após o esmagamento. Notar a presença de lesão axonal sem perda de continuidade dos envoltórios conjuntivos.

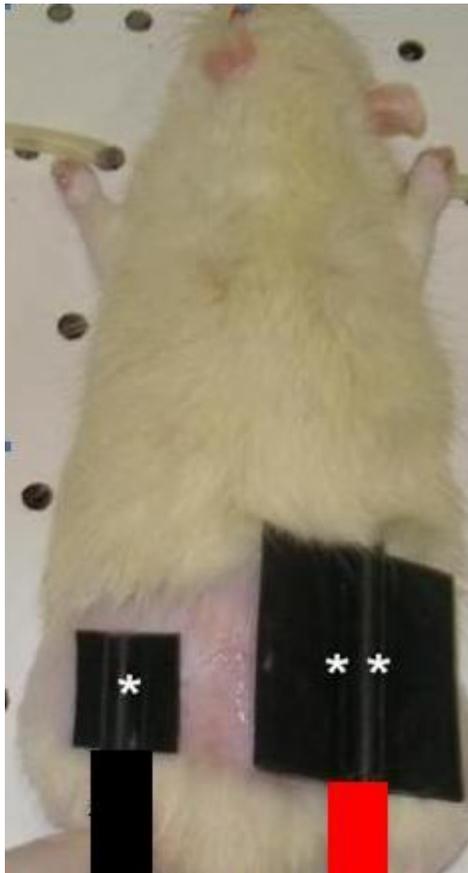
#### 4.4.3 Estimulação Elétrica de alta voltagem

O equipamento utilizado foi o *Neurodyn High Volt* - IBRAMED - ANVISA 10360310008 (Figura 5). O equipamento foi aferido por meio de um osciloscópio Tektronix TDS 210, estando todos os parâmetros físicos da corrente de acordo com o especificado no equipamento. O timer do equipamento também foi aferido a partir de três cronômetros da marca Technos, estando esse parâmetro de acordo com o especificado no equipamento.



**Figura 5:** Equipamento utilizado para intervenção: *Neurodyn High Volt* – IBRAMED.

A aplicação da EEAV nos grupos DEA e S, foi realizada após uma anestesia (Ketalar e Rompum - 0,15 mL/100 g de massa corporal) iniciada 24 horas após a cirurgia, com os seguintes parâmetros (Frequência de 100 Hz; tensão a partir de 100 V; duração do pulso de 20  $\mu$ s e intervalo interpulso 100  $\mu$ s), polaridade negativa (catódica) com intensidade no limiar motor, durante 30 minutos. Utilizaram-se eletrodos novos de silicone-carbono, sendo que o eletrodo ativo (dimensões de 2 x 2 cm) foi posicionado sobre a cicatriz cirúrgica e o dispersivo (dimensões de 4 x 4 cm) contralateral ao ativo, com 1 cm de distância entre eles (Figura 6). Utilizou-se gel como meio de acoplamento. A estimulação foi aplicada às segundas, quartas e sextas-feiras, durante 21 dias.



**Figura 6:** Posicionamento dos

eletrodos (\*) ativo e (\*\*) dispersivo durante a aplicação da EEAV.

#### 4.4.4 Coleta e processamento do nervo

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

O nervo isquiático esquerdo foi exposto cirurgicamente, como descrito previamente, e fixado *in situ* a 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 0,1 M, pH 7,3. Após esse procedimento os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical.

Este estudo demonstra os resultados da análise morfométrica do segmento nervoso distal à lesão.

Para análise da morfologia do nervo normal, os animais do grupo controle tiveram o nervo isquiático esquerdo seccionado na região correspondente à porção distal ao esmagamento nos demais grupos experimentais.

Os fragmentos do nervo isquiático dos animais dos 4 grupos foram mantidos em solução fixadora (Karnovsky) por 24 horas e pós-fixados em tetróxido de ósmio a 1 % em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,3, por duas horas, imersos em uranila 5 % durante 24 horas, para coloração em bloco, desidratados em soluções crescentes (30 % a 100 %) de acetona e incluídos em resina Araldite (UEGAMA).

Foram obtidos cortes transversais de 1  $\mu\text{m}$  com navalha de vidro, em ultramicrótomo LKB, que foram corados com Azul de Toluidina a 1 %, em solução aquosa de bórax a 1 %, para microscopia óptica.

## **4.5 Análise dos Dados**

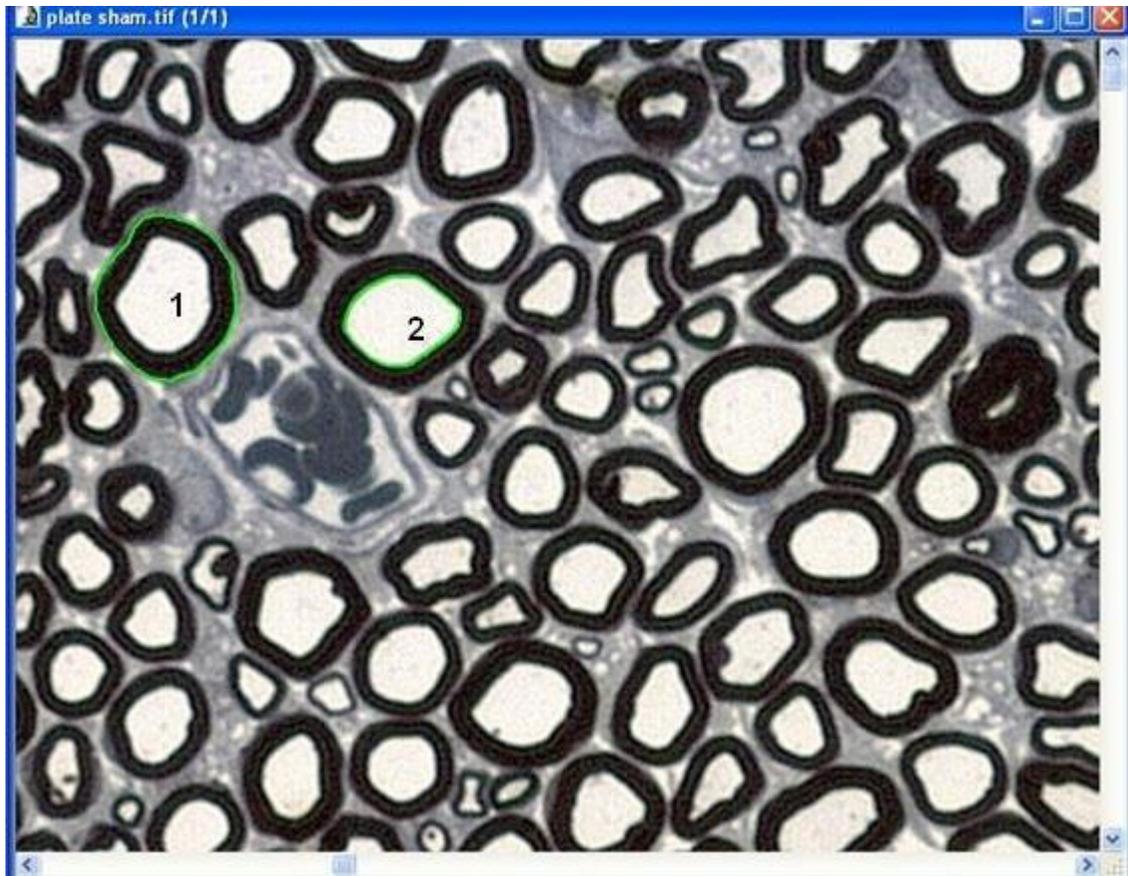
### **4.5.1 Análise Morfométrica**

A análise morfométrica foi realizada a partir de cortes da porção distal do nervo regenerado nos animais de todos os grupos.

Para observação dos cortes histológicos foi utilizado o microscópio de luz Olympus acoplado a um sistema analisador de imagens que utiliza o *software* Image-Pro Plus 6.2 – Media Cybernetics®. A calibração do sistema de análise de imagens para obtenção de medidas na unidade de micrometros ( $\mu\text{m}$ ) foi realizada com o auxílio de uma lâmina de calibração micrometrada ZEISS 5<sub>+100/100</sub> mm.

Foi analisado um corte histológico por animal em cada grupo, do qual foram obtidas imagens em objetiva de 10 vezes, para a observação de todo o nervo e em objetiva de 100 vezes, para a seleção dos campos para amostra. A amostra consistiu de 5 campos aleatoriamente definidos em cada corte.

As medidas foram realizadas de forma semi-automática, sendo cada fibra nervosa mielínica e axônio contornados com o *mouse* para obter os valores (em micrômetros), referentes ao diâmetro da fibra e diâmetro do axônio. A partir desses dados, a espessura da bainha de mielina foi calculada (Figura 7).



Fi

**gura 7:** Tela do *software* Image Pro Plus 6.2 (Media Cybernetics®), utilizado para análise (contornos verdes) dos diâmetros dos axônios (2) e das fibras nervosas (1), em corte transversal do nervo isquiático. Aumento=1000 x.

Os valores referentes à medida de cada axônio foram transferidos para o *software* Excel.

Seguindo a metodologia proposta por Santo Neto et al. (2004), foram analisados os parâmetros morfométricos apontados a seguir:

O diâmetro médio dos axônios de cada nervo foi obtido a partir da somatória dos diâmetros dos axônios, dividido pelo número de axônios mensurados. O cálculo do diâmetro médio das fibras seguiu a mesma lógica. Os valores de espessura das bainhas de mielina foram obtidos subtraindo-se o diâmetro do axônio

do diâmetro da fibra nervosa e, em seguida, dividindo-se por dois. A espessura média das bainhas de mielina também foi obtida dividindo-se a somatória das espessuras das bainhas de mielina pelo número de fibras nervosas analisadas.

O valor da razão G foi calculado pela divisão do diâmetro do axônio pelo diâmetro da fibra nervosa.

As fórmulas utilizadas foram as seguintes:

Diâmetro médio axônio:  $\frac{\sum \text{diâmetro axônio}}{\text{número axônio}}$

Diâmetro médio fibra:  $\frac{\sum \text{diâmetro fibra}}{\text{número fibra}}$

Espessura da bainha mielina:  $\frac{\text{diâmetro da fibra} - \text{diâmetro do axônio}}{2}$

2

Razão G:  $\frac{\text{diâmetro do axônio (média)}}{\text{diâmetro da fibra (média)}}$

#### **4.5.2 Análise do número de Axônios**

O número total de axônios em cada nervo foi calculado a partir da somatória do número obtido nos 5 campos, em objetiva de 100X, sendo estabelecida uma proporção desse valor com a área total do nervo, obtida em objetiva de 10X. De acordo com Santo Neto et al. (1998), utilizou-se as fórmulas a seguir, que demonstram como foram calculados a porcentagem da amostra e o número total de axônios em cada nervo:

$$\% \text{ amostra: } \frac{\Sigma \text{ área dos campos} \times 100}{\Sigma \text{ área do nervo}} = 5\%$$

$$\text{Número total de axônios: } \frac{\Sigma \text{ número axônio} \times 100}{\% \text{ amostra}}$$

#### **4.6 Análise Estatística**

Para análise estatística os dados foram processados no *software Statistical Package for Social Science for Personal Computer (SPSS/PC)* - versão 13.0.

Os dados foram apresentados por meio de média e desvio padrão. A normalidade foi verificada através do teste Shapiro-Wilk e a homocedasticidade foi verificada através do teste de Barket.

Para análise morfométrica foi utilizado o teste Anova (F) seguido de Tukey HSD.

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

Para as comparações dos dados, foi considerado o nível de significância de 5 %.

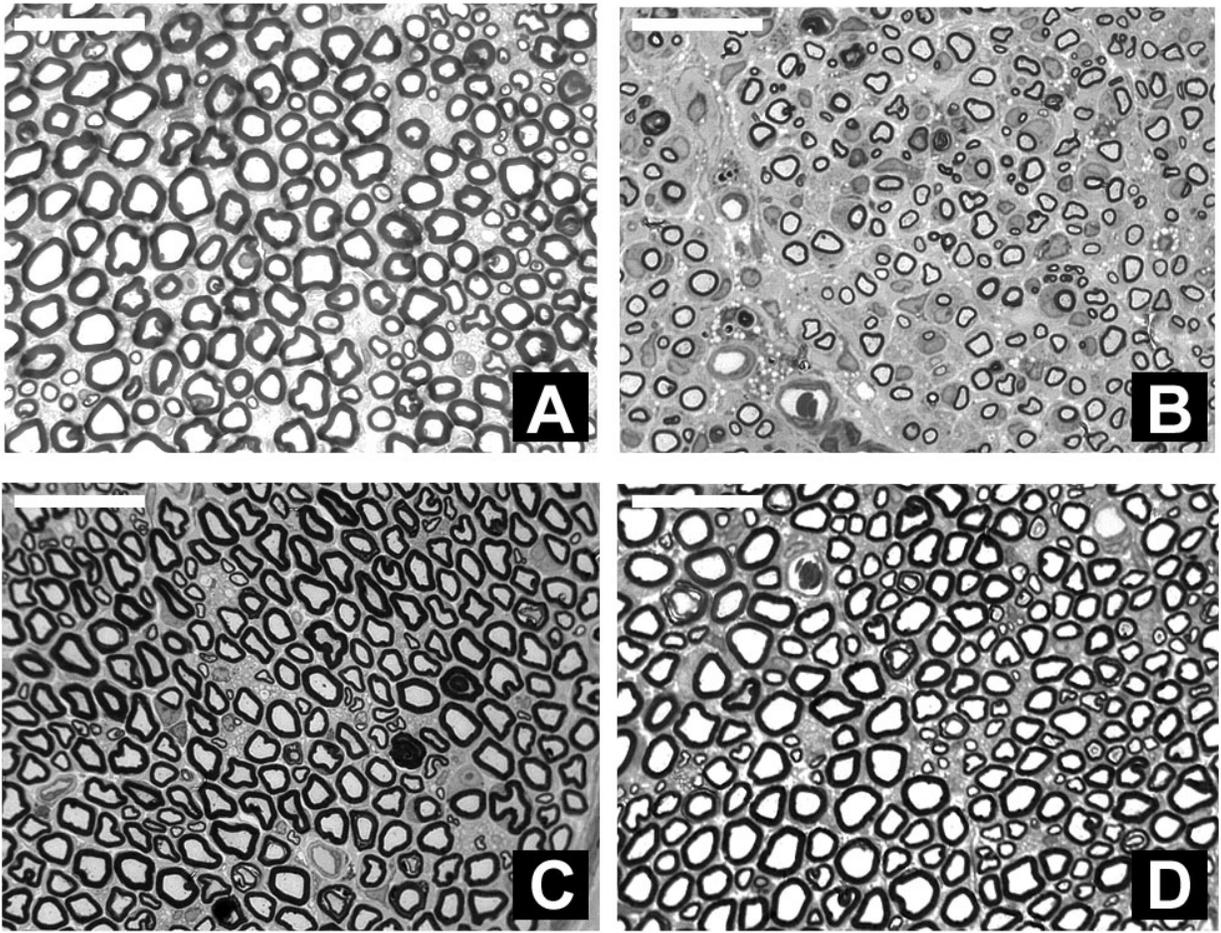
## **5 Resultados**

### **5.1 Análise Histológica**

Na figura 8 observam-se as características histológicas dos grupos CON, D, DEA e S.

O grupo CON (Figura 8A), apresentou axônios de tamanho normal, com espessura de mielina regular e proporcional ao diâmetro axonal. No grupo D (Figura 8B), há um aumento de tecido conjuntivo perineural e as fibras nervosas apresentam menor calibre.

No grupo DEA (Figura 8C), os axônios apresentam vários tamanhos e diâmetro axonal maior em relação ao grupo D. No grupo S (Figura 8D) observam-se axônios com diâmetro e espessura da bainha de mielina semelhantes ao grupo controle.

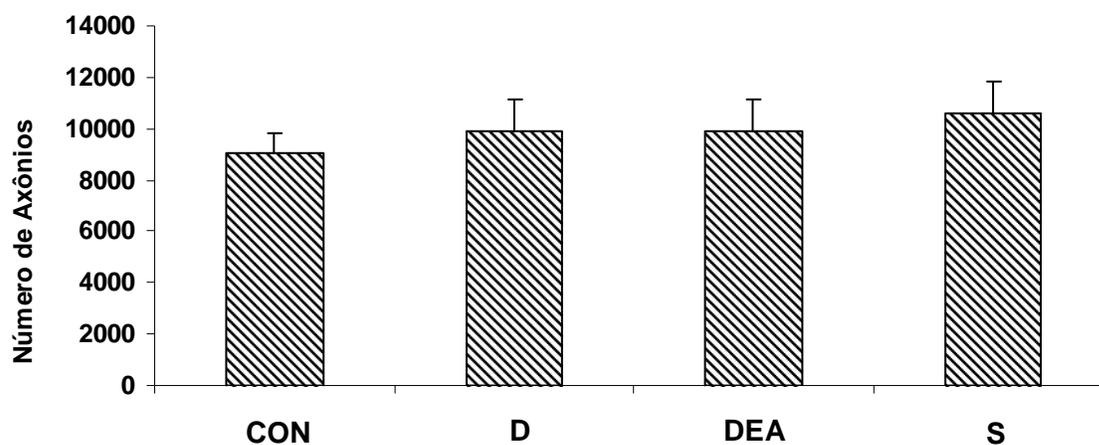


**Figura 8:** Micrografia em corte transversal do nervo isquiático dos grupos: Controle (A); Desnervado (B); Desnervado + EEAV Alternado (C) e Sham (D). Observar diferenças de calibres de axônios, espessura da bainha de mielina e tecido conjuntivo (perineural). Coloração: Azul de Toluidina; Barra = 20  $\mu\text{m}$ .

## 5.2 Análise Quantitativa

### 5.2.1 Número de axônios

A figura 9 expressa o número de axônios nos diferentes grupos estudados, não havendo diferença significativa entre eles.

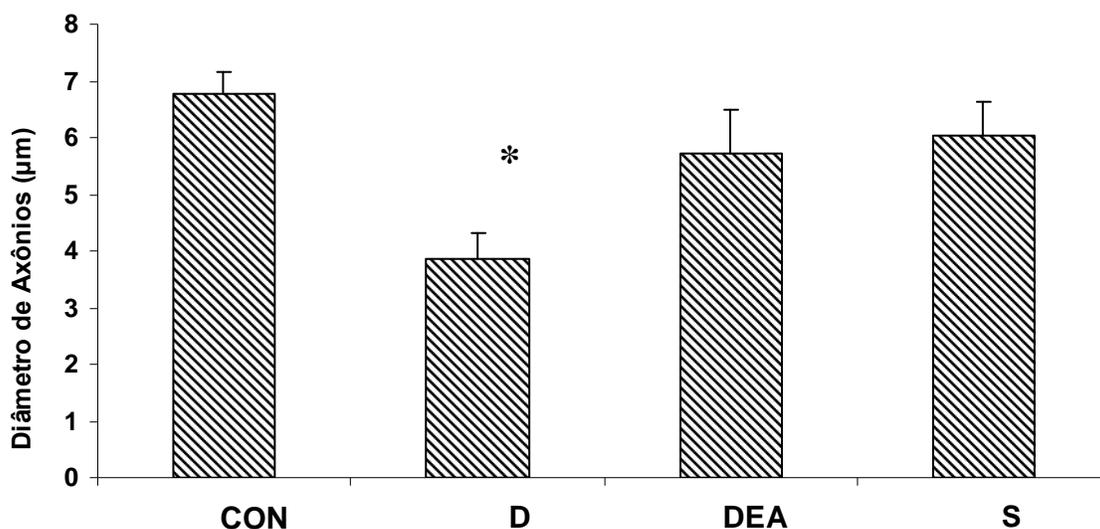


**Figura 9:** Número médio de axônios  $\pm$ DP nos grupos Controle (CON), Desnervado (D), Desnervado + EEAV alternado (DEA) e SHAM (S); ( $p=0,20$ ).

### 5.3 Análise Morfométrica

#### 5.3.1 Diâmetro dos Axônios

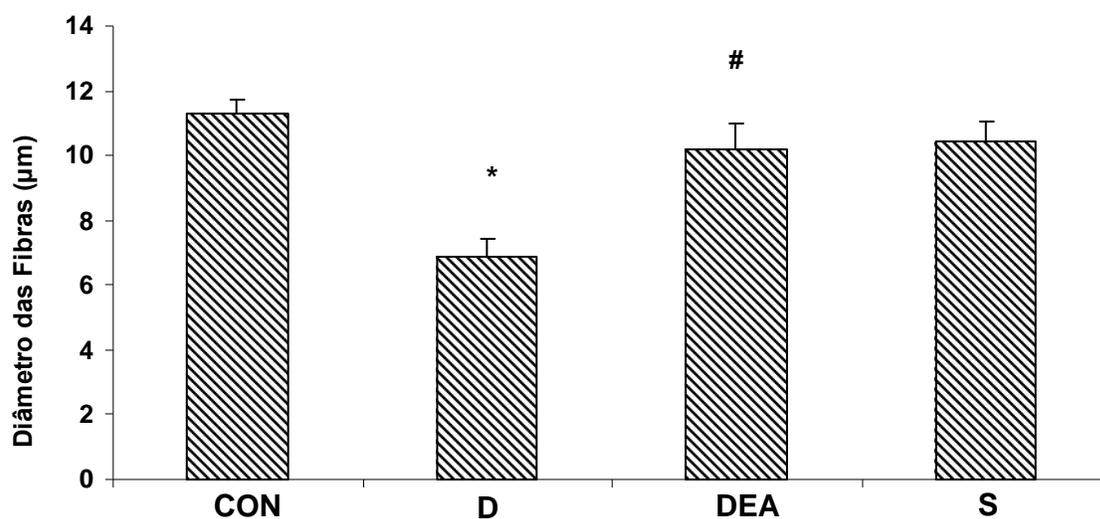
A figura 10 apresenta o diâmetro médio dos axônios nos diferentes grupos. O diâmetro dos axônios no grupo D atingiu 56,95% dos valores controle, alcançando 84,61% no grupo DEA e 89,49% no grupo S. O grupo D apresentou valores médios significativamente menores que os grupos CON, DEA e S.



**Figura 10:** Valores médios  $\pm$ DP do diâmetro dos axônios nos grupos: CON, D, DEA e S. (\*) difere dos demais grupos ( $p < 0,01$ ).

### 5.3.2 Diâmetro das Fibras Nervosas

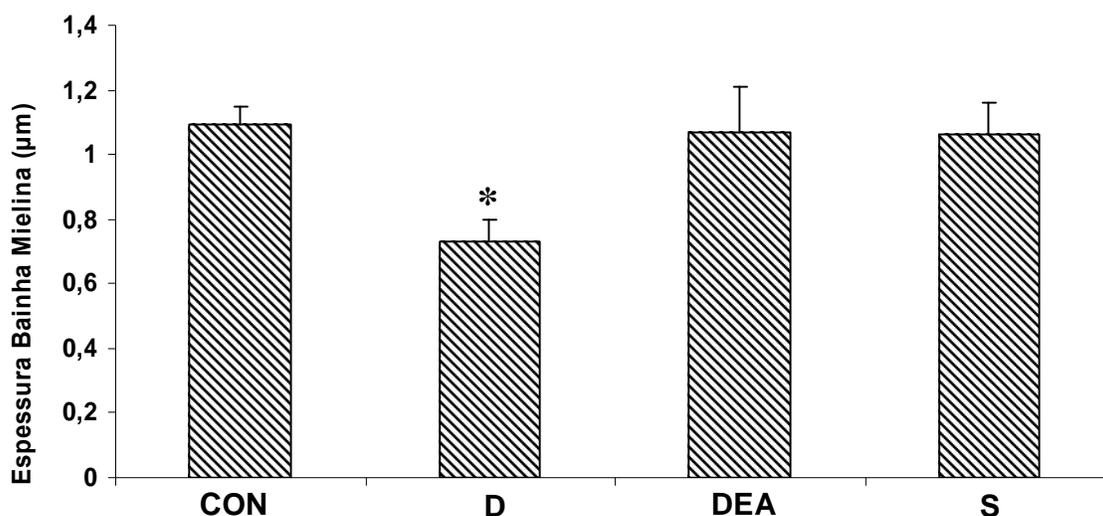
A figura 11 expressa o diâmetro das fibras nervosas nos diferentes grupos. Esses valores atingiram 60,79% do controle no grupo D; 90% no grupo DEA e 92,56% no grupo S. No grupo D os valores foram menores que nos grupos DEA, CON e S, enquanto no grupo DEA, os valores apenas foram menores que no grupo CON.



**Figura 11:** Valores médios  $\pm$  DP do diâmetro das fibras nervosas nos grupos: CON, D, DEA e S. (\*) difere dos grupos CON, DEA e S ( $p < 0,01$ ); (#) difere do grupo CON ( $p < 0,05$ ).

### 5.3.3 Espessura das Bainhas de Mielina

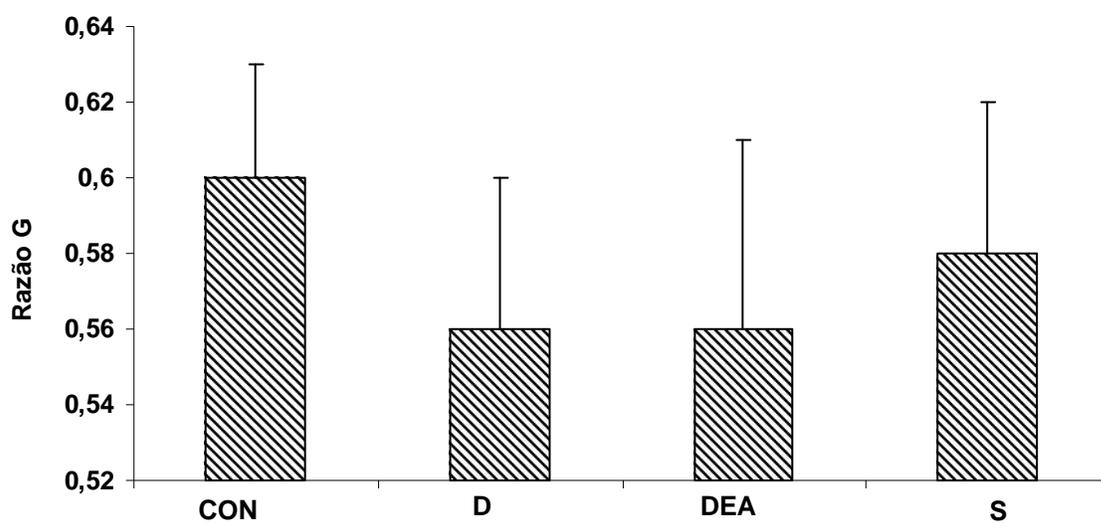
A figura 12 mostra a espessura das bainhas de mielina nos diferentes grupos, sendo que no grupo D representam 66,97% dos valores controle, no grupo DEA, 98,16% e no grupo S, 97,24%. O grupo D apresentou valores menores em relação aos grupos CON, DEA e S.



**Figura 12:** Valores médios  $\pm$ DP da espessura da bainha de mielina nos grupos: CON, D, DEA e S: (\*) difere dos demais grupos ( $p < 0,01$ ).

### 5.3.4 Razão G

A figura 13 mostra os valores de razão G nos diferentes grupos, não havendo diferença significativa entre eles.

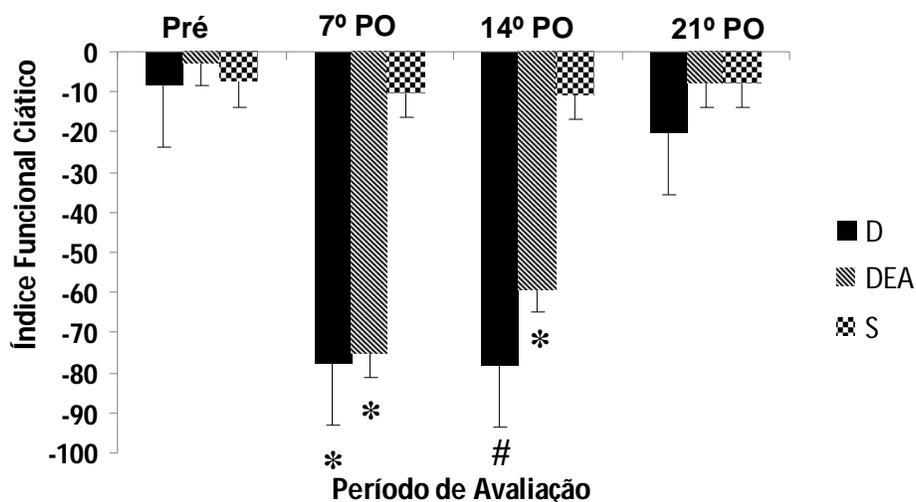


**Figura 13:** Valores médios  $\pm$ DP da razão G nos grupos: CON, D, DEA e S; ( $p > 0,05$ ).

## 5.4 Análise Funcional do Ciático

### 5.4.1 Análise Intergrupos

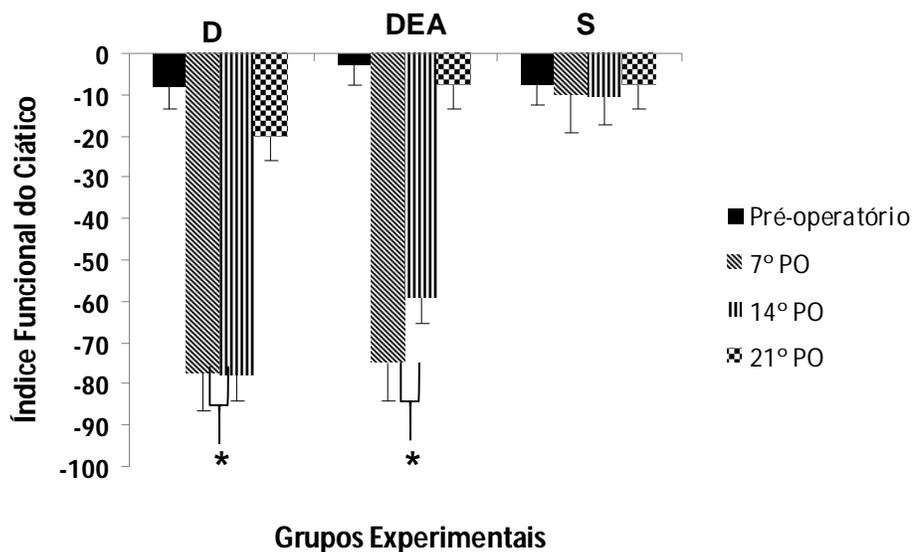
A Figura 14 demonstra os valores médios do IFC nos diferentes grupos e momentos da avaliação funcional. Na análise intergrupos verifica-se que, no pré-operatório, todos os grupos apresentaram função normal, porém no 7º e 14º dia pós-operatório (PO), esses valores diminuíram, indicando perda funcional significativa, alcançando valores próximos aos do período pré-operatório no 21º dia PO.



**Figura 14:** Comparação intergrupos do Índice Funcional do Ciático (IFC) nos grupos: Desnervado (D), Desnervado+Estimulação de Alta Voltagem (DEA) e SHAM + Estimulação Elétrica de Alta Voltagem (S), nos diferentes tempos. (\*) difere de S; (#) difere de DEA e S ( $p<0,05$ ).

#### 5.4.2 Análise Intragrupos

Uma comparação intragrupos dos valores do IFC nos diferentes períodos de avaliação (Figura 15) mostra que, entre o 7º e 14º PO, os grupos D e DEA apresentaram valores de IFC mais negativos em relação ao pré-operatório ( $p=0,00002$  e  $p=0,0000007$ , respectivamente) e 21º dia PO.



**Figura 15:** Comparação intragrupos do Índice Funcional do Ciático (IFC) nos grupos: Desnervado (D), Desnervado + Estimulação Elétrica de Alta Voltagem (DEA) e SHAM

+ Estimulação Elétrica de Alta Voltagem (S), nos diferentes tempos.(\*), difere do pré - operatório e 21<sup>o</sup> dia PO.

## 6 Discussão

A Estimulação Elétrica de Alta Voltagem (EEAV) é um recurso disponível na clínica, mas ainda pouco explorado. Sua utilização tem se restringido ao tratamento de edemas (Taylor et al., 1997; Robinson e Snyder-Mackler, 2001), de úlceras crônicas (Houghton, 2003; Davini et al., 2005) e no controle da dor (Robinson e Snyder-Mackler, 2001).

Os estudos disponíveis na literatura demonstram o papel da EEAV na aceleração da regeneração de úlceras cutâneas. Houghton (2003) argumenta que este recurso terapêutico promoveria uma alteração eletroquímica que envolve o aumento do fluxo sanguíneo no local da aplicação. Robinson e Snyder-Mackler (2001) destacam o aumento da perfusão vascular periférica causado pela EEAV, que ocorre devido à ativação de nervos autônomos que influenciam o tônus vascular e também pela contração muscular devida ao estímulo aplicado no limiar motor, que causa contração muscular rítmica durante a intervenção, promovendo o efeito de “bomba”.

O efeito da EEAV sobre o fluxo sanguíneo depende da tensão, frequência e local da estimulação (Bettany, Fish e Mendel, 1990). Nohr, Akers e Wessman (1987) aplicaram EEAV em ratos com estimulação catódica no limiar motor, tensão de 90 V e frequência variando de 2 a 120 Hz e observaram aumento do fluxo sanguíneo durante e após a intervenção.

O aumento do fluxo sanguíneo é fundamental para o sucesso do processo de regeneração, pois permite a chegada de macrófagos e outras células de defesa ao local da lesão. Segundo Jander et al. (1996) e Jander, Lausberg e Stoll et al.,

(1989), dois dias após a compressão do nervo isquiático, células T e macrófagos infiltram o local da lesão e, no quarto dia, encontram-se espalhados por toda a extensão do nervo distal à compressão. Esse recrutamento de macrófagos permite uma rápida retirada dos restos de axônio e mielina degenerados, material que aparentemente contém inibidores de crescimento de neuritos, como as glicoproteínas associadas à mielina (Qiu, Cai e Filbin, 2000). Stoll e Müller (1999) apontam evidências de que a vasta maioria dos restos de mielina degenerada seja removida por macrófagos hematogênicos. Esse processo de fagocitose se constitui num facilitador da regeneração nervosa.

Os resultados deste estudo permitem considerar que a regeneração e maturação axonal, das quais depende a recuperação funcional, tenham sido favorecidas pelo efeito circulatório da EEAV. Assim, ao provocar um aumento do fluxo sanguíneo no local da intervenção (sobre a cicatriz cirúrgica), a EEAV teria facilitado o recrutamento de macrófagos ao local da lesão.

Orida e Feldman (1982) discutem que a estimulação catódica propicia o aumento da densidade de macrófagos no local da lesão, pois os macrófagos tendem a migrar em direção ao ânodo. Isso justifica a escolha pela estimulação catódica neste estudo e, provavelmente, os resultados obtidos.

Durante a degeneração Walleriana, o ponto máximo da fagocitose da mielina por macrófagos ocorre entre 7 e 14 dias após a lesão (Stoll et al., 1989). Neste estudo, a análise morfométrica do nervo foi realizada após 21 dias da lesão, não sendo possível identificar alteração morfológica entre 7 e 14 dias, que permitisse apontar o possível efeito da EEAV no recrutamento de macrófagos durante a degeneração Walleriana, pois a análise histológica não foi realizada nesses

períodos, considerando a necessidade de sobrevivência dos animais durante 3 semanas. Entretanto, os resultados da análise funcional apontaram uma recuperação significativa no grupo submetido a EEAV em relação ao grupo não tratado, sugerindo que a fagocitose dos restos degenerados teria sido mais efetiva no grupo tratado. Esse resultado pode ser consequência do aumento no recrutamento de macrófagos para o local da lesão, permitindo supor que a circulação sanguínea no local teria sido aumentada pela EEAV.

Baichwal, Bigbee e DeVries (1988) observaram que os macrófagos que fagocitam a mielina durante a degeneração Walleriana produzem um meio condicionante que é mitogênico para as células de Schwann. De acordo com Ide et al. (1990) e Hall (1997), a lâmina basal das células de Schwann permanece íntegra durante a degeneração Walleriana, sobrevivendo à invasão de macrófagos durante o estágio agudo da degeneração e fornece suporte para os axônios em regeneração, participando da fagocitose dos restos de axônio e mielina degenerados e formando as bandas de “Büngner” ou tubos endoneurais, que irão direcionar os axônios em crescimento até o músculo.

A célula de Schwann apresenta em sua lâmina basal, proteínas que fornecem suporte aos axônios em crescimento no interior dos tubos endoneurais, sendo as mais importantes a laminina, localizada principalmente na superfície interna da célula, que é reconhecida pelos brotos axonais que então invadem a lâmina basal durante a regeneração (Fawcett e Keynes, 1990); e a fibronectina, um fator promotor de crescimento de neuritos (Gundersen, 1987).

Desta forma, é possível que a EEAV tenha favorecido o fluxo sanguíneo no local da lesão, havendo maior recrutamento de macrófagos para o local, o que

favoreceu a remoção dos restos degenerados que, além de atuar como barreira mecânica ao crescimento dos brotos axonais, também inibe o crescimento de neuritos. Presença de tubos endoneurais vazios, ou seja, livres do conteúdo de degeneração, somado à proliferação das células de Schwann, facilitada pela presença de macrófagos, com conseqüente ampliação da oferta de fatores tróficos ao crescimento axonal, justifica os resultados morfométricos e funcionais obtidos neste estudo.

Destaca-se a necessidade de investigação direcionada ao comportamento de macrófagos e células de Schwann nas diferentes fases do processo de regeneração nervosa. Uma análise quantitativa dessas células poderia elucidar essa questão. Da mesma forma, a variação dos parâmetros de intervenção também permitiriam conhecer as possibilidades oferecidas por este recurso que é de fácil aquisição, de custo razoável, não invasivo e indolor.

Outro aspecto importante relacionado à regeneração nervosa é a oferta de fatores neurotróficos. Segundo Funakoshi et al. (1993), algumas horas após o dano axonal, o nível e a atividade de mRNA de fatores de crescimento nervoso (NGF) aumenta drasticamente, havendo um segundo pico de expressão após 2 a 3 dias da lesão. Meyer et al. (1992) citam que há um aumento lento e contínuo de mRNA do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), que inicia no terceiro dia após a lesão e atinge seu nível máximo 3 a 4 semanas após. Essas neurotrofinas são produzidas por células de Schwann (Stoll e Müller, 1999), o que sugere que, ao favorecer a proliferação das células de Schwann por meio do recrutamento de macrófagos, maior quantidade de fatores de crescimento nervoso (NGF e BDNF) estaria

disponível no ambiente de regeneração, justificando os resultados encontrados neste estudo.

O único estudo disponível até o momento, que investigou o efeito da EEAV no processo de regeneração nervosa foi realizado por Silva (2009), que utilizou os mesmos parâmetros elétricos aplicados neste trabalho, no mesmo modelo experimental, porém com frequência de intervenção diária, concluindo que a maturação das fibras nervosas regeneradas e a recuperação funcional foram aceleradas pela EEAV. A autora atribui os resultados ao efeito circulatório da estimulação catódica, que favoreceu o aporte de nutrientes e fatores neurotróficos importantes para o restabelecimento das características morfológicas e fisiológicas do nervo.

Neste estudo, optou-se por incluir um grupo SHAM, no qual a EEAV foi aplicada sobre a cicatriz cirúrgica da pata em que o nervo foi exposto, mas não submetido a esmagamento. O objetivo era comprovar que não haveria influência do recurso utilizado sobre as características morfológicas e fisiológicas normais do nervo isquiático.

O número de axônios observado em todos os grupos deste estudo não foi diferente entre os grupos. Esses dados se assemelham aos observados por Silva (2009). Entretanto, após 2 a 4 semanas do esmagamento do nervo observa-se 2 a 3 vezes mais axônios na porção distal à lesão (Toft, Fugleholm e Schmalbruch, 1988), uma vez que cada axônio proximal emite dois a três brotos que seguem em direção ao alvo (Burnett e Zager, 2004).

Neste estudo, tanto o diâmetro dos axônios quanto o das fibras nervosas regeneradas, bem como a espessura das bainhas de mielina, foram maiores no

grupo submetido à intervenção em relação àquele não tratado. Esse resultado justifica-se, provavelmente, pelo incremento circulatório promovido pela EEAV, conforme discutido anteriormente, o que, por si só, favorece a regeneração nervosa. Esses resultados ratificam aqueles obtidos por Silva (2009), que aplicou intervenção diariamente, sugerindo que a aplicação em dias alternados é suficiente para obter favorecimento no processo de regeneração nervosa periférica e recuperação funcional.

Este é um aspecto relevante para a prática clínica, pois com as limitações de tempo impostas pela rotina de trabalho e inúmeras atividades desempenhadas diariamente, é desejável dispor de formas de tratamento que requisitem menor tempo possível e ofereçam resultados eficientes.

Futuros estudos devem ser direcionados a humanos com lesão nervosa periférica, uma vez que se trata de um recurso já utilizado na clínica, porém não explorado ainda para o tratamento da lesão nervosa periférica.

No que se refere à qualidade de regeneração, os dados morfométricos apontam a eficácia do recurso utilizado, pois segundo Schroder (1972), após compressão do nervo, onde a regeneração nervosa ocorre espontaneamente, é possível que o diâmetro dos axônios atinja os valores controle após 6 meses. Neste estudo, após 21 dias da lesão, o grupo não tratado atingiu 56,95 % dos valores controle, enquanto o grupo tratado com EEAV atingiu 84,61 % no mesmo intervalo de tempo.

O diâmetro das fibras nervosas atingiu 60,79 % dos valores controle no grupo não tratado, enquanto o grupo tratado com EEAV atingiu 90 %.

Quanto à espessura das bainhas de mielina, o grupo não tratado atingiu 66,97 % dos valores controle, enquanto o grupo tratado com EEAV atingiu 98,16 % apenas 21 dias após a lesão, superando o esperado, de acordo com Schroder (1972), que aponta que a espessura da bainha de mielina atinge 79 % do valor normal após um ano.

Esses resultados demonstram o efeito benéfico da EEAV para a regeneração e maturação de nervos lesados.

A razão G, que corresponde à divisão do diâmetro do axônio pelo diâmetro da fibra nervosa, reflete a velocidade de condução do impulso nervoso através do nervo. Esse parâmetro foi recuperado em todos os grupos, estando dentro dos padrões de normalidade para uma velocidade de condução nervosa ideal, ou seja, entre 0,5 e 0,7 (Ansellin, Fink e Davey, 1997), caracterizando a proporcionalidade entre diâmetro do axônio e diâmetro das fibras nervosas, sugerindo que, em todos os grupos, a velocidade de condução nervosa teria sido recuperada.

Silva (2009) obteve 79,94 % de recuperação do diâmetro dos axônios regenerados em relação aos valores controle no grupo tratado com EEAV, enquanto o grupo não tratado recuperou apenas 52,45 %. O diâmetro das fibras nervosas atingiu 96,50 % dos valores controle no grupo tratado e 58,16 % no grupo não tratado. A espessura das bainhas de mielina atingiu 100 % dos valores controle no grupo tratado e 65,78 % no grupo não tratado.

Os dados morfométricos obtidos neste estudo ratificam aqueles obtidos por Silva (2009) e sugerem que não há necessidade de intervenção diária utilizando

a EEAV, uma vez que resultados semelhantes são obtidos com intervenção em dias alternados.

Quanto à funcionalidade do nervo regenerado, a análise intergrupos apontou que os valores de IFC no período pré-operatório estiveram dentro dos padrões de normalidade, ou seja, entre 0 e -20, caracterizando função normal, enquanto entre o 7º e o 14º dia após desnervação os grupos D e DEA apresentaram valores próximos a -100, caracterizando perda funcional. Entretanto, o grupo DEA apresentou melhora significativa da função já aos 14 dias após a lesão, demonstrando o efeito da EEAV em acelerar a recuperação da função do nervo após axoniotmese. Apesar de os valores não terem se igualado no 21º dia pós-operatório, a diferença não foi significativa nesse período, demonstrando que a recuperação da funcionalidade do nervo ocorreu no grupo tratado com EEAV e também naquele não tratado.

Apesar disso, a literatura aponta que o tempo transcorrido entre a lesão e a reinervação muscular é crucial para a recuperação funcional, pois a desnervação causa redução da área de secção transversa do músculo, ou seja, atrofia muscular, bem como proliferação de tecido conjuntivo intramuscular (Fernandes et al., 2005), o qual atua como barreira mecânica ao suprimento sanguíneo para as fibras musculares, contribuindo para a atrofia (Caierão et al., 2008), além de interferir com a reinervação muscular, atuando como barreira mecânica à reconexão do terminal nervoso com os receptores da junção neuromuscular (Carter et al., 1998).

Desta forma, um recurso terapêutico que acelera a regeneração nervosa e a reinervação muscular, como é o caso da EEAV, reduziria o tempo de desnervação e, conseqüentemente, a atrofia e proliferação conjuntiva no músculo, favorecendo as

condições estruturais do músculo a ser reinervado. Essa condição muscular, somada à reinervação e recuperação funcional mais precoce poderia tornar mais favorável o prognóstico de recuperação e garantir um retorno precoce às atividades laborais do indivíduo após lesão nervosa periférica.

## **7 Conclusão**

Os dados obtidos neste estudo permitem concluir que a EEAV, aplicada em dias alternados, acelerou a regeneração nervosa e recuperação funcional após lesão por esmagamento em ratos.



## REFERÊNCIAS \*

Anders JJ, Geuna S, Rochkind S. Phototherapy promotes regeneration and functional recovery of injured peripheral nerve. *Neurol. Res.* 2004; 26: 233-239.

Ansselin AD, Fink T, Davey DF. Periperal nerve regeneration through nerve guides seeded with Schwann cells. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 1997; 23: 387-398.

Baichwal RR, Bigbee JW, DeVries GH. Macrophage-mediated myelin-related mitogenic factor for cultured Schwann cells. *Proc Natl Acad Sci.* 1988; 1701-1705.

Bain JR, Mackinnon SE, Hunter DA. Functional evaluation of complete sciatic, peronal, and posterior tibial nerve lesions in the rat. *Plast Reconstr Surg.* 1989; 83(1): 129-38.

Bettany JA, Fish DR, Mendel FC. High voltage pulsed direct current: effect on edema formation after hyperflexion injury. *Arch Phys Rehabil* 1990; 71: 677-681.

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

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

---

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

Caierão QM, Betini J, Teodori RM, Minamoto VB. O efeito do intervalo da estimulação elétrica no músculo desnervado de rato. Ver. Bras.Fisiot. 2008; 12(2): 143-148.

Carmignoto G, Finesso M, Siliprandi R, Gorio A. Muscle reinnervation- I. Restoration of transmitter release mechanisms. Neurosci. 1983; 8(3): 393-401.

Carter AJ, Kristmundsdottir F, Gilmour J, Glasby MA. Changes in muscle cytoarchitecture after peripheral nerve injury and repair. J Hand Surg [Br} 1998; 23(3): 365-369.

Crisci AR, Ferreira AL. Low-intensity ultrasound accelerates the regeneration of the sciatic nerve after neurotomy in rats. Ultrasound Med Biol. 2002; 28:1335-1341.

Colohan AR, Pitts LH, Rosegay H. Injury to the peripheral nerves. In: Feliciano DV Moore EE, Mattox KL, eds. Trauma. 3rd ed. Stamford, Conn: Appleton & Lange 1996; 853-62.

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

Davini R, Nunes CV, Guirro ECO, Guirro RRJ et al. Tratamento de úlceras cutâneas crônicas por meio da estimulação elétrica de alta voltagem. Rev.Ciên. Méd. 2005; 14 (3): 249-258.

Dubový P. Schwann cells and endoneurial extracellular matrix molecules as potencial cues for sorting of regenerated axons: A review. Anat Sci International. 2004; 79: 198-208.

Eberstein A, Eberstein S. Eletrical stimulation of denervated muscle: is it worthwhile? Med Sci Sports Exerc. 1996; 28 (12): 1463-1469.

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

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

Ferreira AS. Lesões Nervosas Periféricas: Diagnóstico e tratamento. 2ª ed. São Paulo: Santos; 2001.

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

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

Funakoshi H, Frisen J, Barbany G, Timmusk T, Zachrisson O, Verge VM, Persson H. Differential expression of mRNAs for neurotrophins and their receptors after axotomy of the sciatic nerve. *J Cell Biol.* 1993; 123:455-465.

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

Gorio A, Carmignoto G, Finesso M, Polato P, Nunzi Mg. Muscle reinnervation –II Sprouting, synapse formation and repression. *Neurosci.* [S.L]. 1983; 8(3):403-16.

Grant GA, Goodkin, R, Kliot M. Evaluation and surgical management of peripheral nerve problems. *Neurosurgery* 1999; 44(4): 825-39.

Gundersen RW. Response of sensory neurites and growth cones to patterned substrata of laminin and fibronectin in vitro. *Dev Biol.* 1987; 121:423-431.

Guyton AC, Hall JE. *Tratado de Fisiologia Médica.* 10<sup>a</sup> edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

Hall S. Axonal regeneration through acellular muscle grafts. *J Anat.* 1997; 190(1):57-71.

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

Ide C. Peripheral nerve regeneration. *Neurosci Res.* 1996; 25: 101-121.

Ide C, Osawa T, Tohyama K. Nerve regeneration through allogeneic nerve grafts, with special reference to the role of the Schwann cell basal lamina. *Prog Neurobiol.* 1990; 34(1):1-38.

Jander S, Pohl J, Gillen C, Stoll G. Differential expression of interleukin-10 mRNA in Wallerian degeneration and immune-mediated inflammation of the rat peripheral nervous system. *J Neurosci Res.* 1996; 43:254-259.

Jander S, Lausberg F, Stoll G. Differential recruitment of CD8+ macrophages during Wallerian degeneration in the peripheral nervous and central nervous system. *Brain Pathol.* 2001; 11:27-38.

Karnes JL, Mendel FC, Fish DR, Burton HW. High-voltage pulsed current: its influence on diameters of histamine-dilated arterioles in hamster cheek pouches. *Arch Phys Med Rehabil.* 1995; 76: 381- 386.

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

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

Lee SK, Wolfe SW. Peripheral nerve injury and repair. J Am Acad Orthop Surg. 2000; 8: 243-52.

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

Low J, Reed A. Eletroterapia explicada: princípios e prática. Manole: São Paulo; 2001, 484-485p.

Lundborg G. Nerve injury and repair- achallenge to the plastic brain. J Peripher Nerv Syst. 2003; 8: 209-226.

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

Meyer M , Matsuoka I, Wetmore C, Olson L, Thoenen H. Enhanced synthesis of brain-derived neurotrophic factor in the lesioned peripheral nerve: different mechanisms are responsible for the regulation of BDNF and NGF mRNA. *J Cell Biol.* 1992; 119: 45-54.

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

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

Nelson RM, Hayes KWE, Currier DP. *Eletroterapia Clínica.* 3ª ed. Manole: São Paulo: 2003.

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

Omura T, Sano M, Omura K, Hasegawa T, Doi M, Sawada T. Different expressions of BDNF, NT3 and NT4 in muscle and nerve after various types of peripheral nerve injuries. *J Peripher Nerv Syst.* 2005; 10: 293-300.

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

Pachioni CAS, Mazzer N, Barbieri CH, Fazan VPS, Padovani CR, Moro CA, et al. Lesão por esmagamento do nervo isquiático de ratos: estudo da vascularização. *Acta Ortop Bras.* 2006; 14(4): 203-7.

Qiu J, Cai D, Filbin MT. Glial inhibition of nerve regeneration in the mature mammalian CNS. 2000). *Glia.* 2000; 29:166-174.

Robinson, L.R. Traumatic injury to peripheral nerves. *Muscle Nerve.* 2000; 23:863-873.

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

Sanes JR, Lichtman JW. Development of the vertebrate neuromuscular junction. *Annu Rev Neurosci* 1999; 22:389-442.

Santo Neto H, Teodori RM, Somazz MC, Marques MJ. Axonal regeneration through muscle autografts submitted to local anaesthetic pretreatment. *Br J Plast Surg.* 1998; 51(7): 555-560.

Santo Neto H, Pertille A, Teodori RM, Somazz MC, Marques MJ. Primary nerve repair by muscle autografts prepared with local anaesthetic. *Microsurgery*. 2004; 24(3); 187-193.

Seddon HJ. *Surgical disorders of the peripheral nerves*, 2ª edição. New York: Churchill Livingstone; 1975. Apud Robinson, L.R. Traumatic injury to peripheral nerves. *Muscle Nerve*. 2000; 23:863-873.

Silva A S. Regeneração nervosa e recuperação funcional após estimulação elétrica de alta voltagem [Dissertação de Mestrado]. 41p. Piracicaba: UNIMEP; 2009.

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

Sobral LL, Oliveira LS, Takeda SYM, Somazz MC, Montebelo MIL, Teodori RM. Exercício imediato *versus* tardio na regeneração do nervo isquiático de ratos após axoniotmese: Análise morfométrica e funcional. *Rev. Bras. Fisiot*. 2008; 12 (4):311-316.

Stoll G, Griffin JW, Li CY, Trapp BD. Wallerian degeneration in the peripheral nervous system: participation of both Schwann cells and macrophages in myelin degradation. *J Neurocytol*. 1989; 18:671-683.

Stoll G, Muller HW. Nerve injury, axonal degeneration and neural regeneration: Basic insights. *Brain Pathol.* 1999; 9:313-325.

Sunderland S. The connective tissues of peripheral nerves. *Brain.* 1965; 88 (4); 841-854.

Sunderland, S. *Nerves and nerve injuries*, 2<sup>a</sup> ed. New York: Churchill Livingstone; 1978. Apud Robinson, L.R. Traumatic injury to peripheral nerves. *Muscle Nerve.* 2000; 23:863-873.

Szuminsky NJ, Albers AC, Unger P, Eddy JG. Effect of narrow, pulsed high voltages on bacterial viability. *Phys Ther.* 1994; 74(7): 660-667.

Takeda SYM, Oliveira LS, Sobral LL, Teodori RM, Somazz MC, Montebello MIL. Regeneracion nervosa periférica en ratones expuestos a um ambiente enriquecido. *Rev Neurol.* 2008; 48: 3.

Taylor K, Fish DR, Mendel FM, Burton HW. Effect of electrically induced muscle contractions on posttraumatic edema formation in frog hind limbs. *Phys Ther.* 1992; 72:127-132.

Taylor K, Mendel FC, Fish Dr, Hard R, Burtom Hw. Effect of high-voltage pulsed current and alternating current on macromolecular leakage in hamster cheek pouch microcirculation. *Phys Ther.* 1997; 77(12): 1729-1740.

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

Unger P, Eddy J, Raimastry AS. A controlled study of the effect of high voltage pulsed current (HVPC) on wound heading. *Phys Ther* 1991; 71: Suppl:119.

Varejão ASP, Meek MF, Ferreira AJA, Patrício JAB, Cabrita AMS. Functional evaluation of peripheral nerve regeneration in the rat: walking track analysis. *J Neurosci Methods*. 2001; 108: 1-9.

Varejão ASP, Cabrita AM, Geuna S, Melo- Pinto P, Filipe VM, Gramsbergen A et al. Toe out angle: a Fuctional index for the evaluation of sciatic nerve recovery in the rat model. *Exp Neurol*. 2003; 183(2): 695-9.

Varejão ASP, Melo-Pinto P, Meek MF, Filipe VM, Bulas-Cruz J. Methods for the experimental functional assessment of rat sciatic nerve regeneration. *Neurol Res*. 2004; 26(2): 186-194.

Zoghi M, Jaberzadeh S. Effects of high voltage electro-auriculotherapy on experimental pain threshold. *Phys Ther*. 2002; 88(11): 658-666.



## ANEXO 1



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

---

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

Protocolo nº 037/2008

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

São Carlos, 16 de setembro de 2008.

  
Prof.<sup>ca</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Keico Okino Nonaka

Presidente da Comissão de Ética em Experimentação Animal

