

**UNIVERSIDADE METODISTA DE PIRACICABA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DO  
MOVIMENTO HUMANO**

**Efeito do ácido alfa-lipóico e ácido hialurônico-carboximetilcelulose  
sobre a regeneração nervosa e recuperação funcional em ratos  
após neurotmese**

Fernando Alípio Rollo Neto

2018

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

FERNANDO ALÍPIO ROLLO NETO

**Efeito do ácido alfa-lipóico e ácido hialurônico-carboximetilcelulose sobre a regeneração nervosa e recuperação funcional em ratos após neurotmesa**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências do Movimento Humano, da Universidade Metodista de Piracicaba, para obtenção do Título de Mestre em Ciências do Movimento Humano.

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

PIRACICABA

2018

Dedico esse trabalho a minha família dentro e fora do mundo acadêmico, que me fizeram acreditar em minha capacidade e competência. Dedico a Deus que iluminou e Abençoou esse caminho de muitos obstáculos e grandes conquistas.

## AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por estar sempre ao meu lado, por iluminar minhas decisões, por perdoar minhas falhas e fraquezas, por renovar minhas forças diariamente onde quer que eu esteja, por todas as bênçãos e todo o amor que derramai sobre esse seu humilde e devoto servo.

Ao meu avô paterno **Fernando**, por ser o meu exemplo de vida, minha grande inspiração, o ser humano no qual eu me espelho até hoje, sua falta é sentida todos os dias, tenho orgulho em carregar o seu nome, e por ter tido a honra e o privilégio de receber tantos ensinamentos inesquecíveis, o senhor foi o meu ídolo, meu herói. Te amarei eternamente Vô.

À minha mãe **Elizabeth**, por estar sempre me apoiando, incentivando e me enchendo de oportunidades sem medir esforços, por sempre acreditar no meu potencial, por ter me dado tanto amor incondicional, e por ter tido um papel fundamental na minha decisão de dar mais esse passo na vida acadêmica e profissional.

Ao meu pai **Fernando**, por todo o carinho, amor e compreensão, pelas conversas mansas que me traziam paz em dias difíceis, e por ter me proporcionado meios para uma estadia agradável em Piracicaba.

Ao meu amado irmão **Renan**, minha companhia de vida, uma pessoa ímpar no mundo pra mim, e que mesmo distante compartilha das minhas derrotas e vitórias.

À minha orientadora **Rosana Macher Teodori**, por ter escolhido esse paraense desconhecido, por ter acreditado em minha capacidade, por me propor grandes desafios que me fizeram um profissional melhor, por ter me

orientado nesse projeto e em outros, por ter me transmitido muito conhecimento sem o qual não seria possível a realização desse trabalho, por ter me dado muitos conselhos e puxões de orelhas nas horas certas, e acima de tudo, por todo o carinho que teve comigo durante todo esse período, cuidando de mim como uma verdadeira mãe. Obrigado por tudo.

À minha querida vó **Rosa**, por todo o carinho ao longo de minha vida, pelo seu lindo sorriso que aqueceu o meu coração em muitos dias de frio.

À minha amada **Milene**, que mudou a minha vida, me apoiou muito nessa difícil jornada, não poupando esforços para criar um ambiente ideal para que eu pudesse me dedicar exclusivamente ao meu mestrado, por ter abdicado de muitos momentos a dois em prol dos meus compromissos acadêmicos, por ter aguentado um relacionamento à distância, e por ter superado todos os outros diversos obstáculos para ficarmos juntos. Te amo.

Aos meus familiares de Santo André (**Rollo, Murilo, Joyce, Murilinho, Daniele, Gisele**), mas em especial a minha amada madrinha **Socorro**, por todo o carinho de mãe que sempre teve comigo, e por me fazer sentir verdadeiramente em casa em todos os momentos em que eu pude visitá-la. Amo vocês.

Aos meus familiares de Belém, mas em especial aos meus tios, tias e primas (**Eneida, Anne, Amanda, Edilma, Tadeu**), por acreditarem no meu sonho, e por me apoiarem durante todo esse caminho, através de palavras ou mesmo me fornecendo meios para eu trilhar essa jornada.

Aos meus queridos companheiros em Piracicaba (**Patrícia, Ana, Kiko, Darcy, André, Maiza, Cida, Carol, Cassiana e Mariana**), sem dúvidas vocês foram muito importantes para que os meus dias em Piracicaba, longe da

família, se tornassem mais prazerosos. Pessoas das quais eu sempre terei alegria em lembrar.

Aos meus amigos paraenses (**Alessandro Medeiros, Bruno Gusmão, Jefferson Kelvin, Breno Almeida, Alexandre Maia, John Gentil, Rodrigo Bastos, Tina Cobain e Romulo Martins**) por fazerem parte da minha vida e de toda a minha história.

Ao meu grande amigo/irmão **Renan Brasil**, por tantos anos de amizade verdadeira, por sempre poder contar com você não importando o momento ou o obstáculo, por tantas histórias hilárias e inesquecíveis. Obrigado por tudo.

À **Mariela Maneschy**, por ser a minha amiga e parceira dentro e fora do meio acadêmico, por tantas histórias inesquecíveis vividas e compartilhadas nessa nossa trajetória, por ter sido uma das grandes incentivadoras para que eu prestasse o mestrado. Obrigado por tudo amiga.

Ao **Rafael Schimith**, por ter sido um grande irmãozão que eu tive o privilégio de conhecer e conviver durante essa minha nova jornada acadêmica, por ter me acolhido sem nem mesmo me conhecer, por tantos momentos inesquecíveis, por me arrancar tantos sorrisos em momentos difíceis, e que pretendo levar ao meu lado pelo resto dos meus dias.

A todos os professores do PPG – Ciências do Movimento Humano, especialmente aos professores **Carlos Silva, Delaine Bigaton, Adriana Pertille e Marlene Moreno**, por toda a contribuição dada à dissertação e nesses dois anos de mestrado. Sem dúvida vocês contribuíram bastante para a minha formação como mestre.

“Homens realmente grandes, não nascem grandes, tornam-se grandes”.

(The Godfather)

## RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da associação entre ácido hialurônico carboximetilcelulose (HA-CMC) e ácido alfa lipóico (AL), bem como da associação de ambos, sobre a regeneração nervosa e recuperação funcional após autoenxerto de nervo em ratos. Trinta ratos Wistar ( $179.88 \pm 23,92$  g) foram divididos em 5 grupos ( $n=6$ ), Controle (C), Lesão (L), Lesão + Ácido Lipóico (LL), Lesão + Ácido Hialurônico (LH), Lesão + Ácido Lipóico + Ácido Hialurônico (LLH). Após anestesia (cloridrato de cetamina –  $1,16$  g/10mL e cloridrato de xilazina –  $2$  g/100 mL, proporção 3:2, dose =  $0,09$  mL/100g e  $0,06$  mL/100g massa corporal, respectivamente), o nervo isquiático esquerdo foi seccionado nos grupos L, LL, LH e LLH, sendo retirado um segmento de 8 mm, que foi invertido a  $180^\circ$  e reconectado por 2 pontos de sutura epineural em cada extremidade. Aos grupos LH e LLH, foi administrado  $0,2$  mL de uma solução de HA-CMC ao redor do nervo submetido a autoenxerto de nervo. Aos animais dos grupos LL e LLH foi administrada uma solução de ácido  $\alpha$ -Lipóico, por via orogástrica, em concentração de  $100$  mg/kg, após 24 horas da lesão (7 x/semana, 8 semanas). Realizou-se o registro da marcha (pré-operatório,  $7^\circ$ ,  $14^\circ$ ,  $21^\circ$ ,  $28^\circ$ ,  $35^\circ$ ,  $42^\circ$ ,  $49^\circ$ ,  $56^\circ$  dias de pós-operatório (PO)). O nervo isquiático de todos os animais foi processado para análise morfométrica e quantitativa (INSTAT, version 3). Para a análise morfométrica e funcional foram utilizados os testes ANOVA One - Way seguido do teste de Tukey HSD. Considerou-se  $p \leq 0,05$ . A massa do músculo sóleo em todos os grupos lesados foi menor que no controle ( $p < 0,05$ ). Em todos os grupos lesados o IFC estava próximo de  $-100$  a partir do  $7^\circ$  PO em relação ao pré-operatório ( $p < 0,05$ ), não tendo sido recuperados os valores de normalidade até o  $56^\circ$  dia PO. Todos os grupos lesados apresentaram densidade de área de tecido conjuntivo maior comparado ao grupo controle ( $p < 0,05$ ), não havendo diferença significativa entre os diferentes tratamentos ( $p > 0,05$ ). O número de axônios foi maior nos grupos LH e LLH em relação ao controle ( $p < 0,05$ ). O diâmetro dos axônios, diâmetro das fibras nervosas e espessura das bainhas de mielina foram menores nos grupos lesados em comparação aos achados no grupo controle ( $p < 0,05$ ), não havendo diferença entre os grupos submetidos à lesão ( $p > 0,05$ ). A razão G estava dentro dos valores de normalidade em todos os grupos. Conclui-se que a administração de HA-CMC ou de AL após autoenxerto de nervo em ratos, assim como a associação de ambos tratamentos, não favoreceu a regeneração nervosa e recuperação funcional, sendo este processo extremamente complexo em lesões nervosas graves que exigem autoenxertos.

**Palavras-chave:** plasticidade neuronal, ácido lipóico, ácido hialurônico, regeneração nervosa periférica, autoenxerto de nervo, recuperação funcional.

## ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effect of the association between hyaluronic acid carboxymethyl cellulose (HA-CMC) and alpha lipoic acid (LA), as well as the association of both, on the nerve regeneration and functional recovery after nerve autograft in rats. Thirty Wistar rats ( $179.88 \pm 23.92$  g) were divided into 5 groups (n=6), Control (C), Lesion (L), Lesion + LA (LL), Lesion + HA-CMC (LH) Lesion + LA + HA-CMC (LLH). After anesthesia (ketamine hydrochloride-1.16 g/10ml and xylazine hydrochloride-2 g/100mL, proportion 3:2, dose ratio = 0.09 mL/100g weight and 0.06 mL/100g body weight, respectively), the left sciatic nerve was sectioned in the animals of the groups L, LL, LH and LLH, being withdrawn a 8 mm segment, which was reversed 180° and reconnected by two epineural suture at each end. It was administered 0.2 mL of a HA-CMC solution around the nerve in the animals of the groups LH and LLH. After 24 hours of the injury a solution of LA (100 mg/kg) was administered (7 times/week, 8 weeks) to the animals of groups LL and LLH. The sciatic functional index (SFI) was registered on pre operative day and on 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56 postoperative (PO) days. The sciatic nerve of all animals has been processed for morphometric and quantitative analysis. For morphometric and functional analysis it was used the ANOVA One-Way test followed by the Tukey HSD. It was considered  $p \leq 0.05$ . The mass of the soleus muscle in all injured groups was less than in the control ( $p < 0.05$ ). In all injured groups the SFI was around-100 from 7 PO compared to the pre-operative day ( $p < 0.05$ ) and the normal values were not recovered until the 56th PO day. All injured groups showed connective tissue area density increased compared to the control group ( $p < 0.05$ ). Among the different treatments there were no significant differences ( $p > 0.05$ ). The number of axons was greater in groups LH and LLH compared to the control group ( $p < 0.05$ ). The diameter of the axons, the diameter of the nerve fibers and the myelin sheath thickness were smaller than control in all injured groups ( $p < 0.05$ ), and there were no difference between the groups ( $p > 0.05$ ). The G ratio was within normal values in all groups. We concluded that the intraoperative administration of HA-CMC or oral administration of LA after nerve autograft in rats, as well as the association of both treatments, not favored the nerve regeneration and functional recovery, being this process extremely complex in severe nerve damage requiring autografts.

**Keywords:** neuronal plasticity, lipoic acid, hyaluronic acid, peripheral nerve regeneration, nerve autograft, functional recovery.

**Lista de Abreviaturas**

AL: Ácido alfa-lipóico;

AMP: Adenosina monofosfato;

AMPC: Adenosina monofosfato cíclico;

AMPK: Proteína quinase ativada pela adenosina monofosfato;

ATP: Adenosina tri-fosfato;

C: Grupo controle;

CEUA: Comissão de ética no uso de animais;

CMC: Carboximetilcelulose;

E: Pata experimental;

FACIS: Faculdade de Ciências da Saúde;

GLUT-4: Transportador de glicose do tipo 4;

GTP: Guanosina tri-fosfato;

HA: Ácido hialurônico;

HA-CMC: Ácido hialurônico carboximetilcelulose;

IFC: Índice Funcional do Ciático;

IGF-1: Fator de crescimento semelhante a insulina tipo 1;

IL-1: Interleucina 1;

IL-6: Interleucina 6;

IT: Largura Intermediária da Pegada;

L: Grupo Lesão;

LH: Lesão hialurônico;

LL: Grupos lesão Lipóico;

LLH: Lesão + Ácido lipóico + Ácido hialurônico carboximetilcelulose;

MMP-1: Metaloproteinase 1;

MMP-2: Metaloproteinase 2;

MMP-9: Metaloproteinase 9;

mTOR: proteína quinase alvo da rapamicina em mamíferos;

mTORC1: Complexo 1 da proteína quinase alvo da rapamicina em mamíferos;

N: Pata normal;

NF- $\kappa$ B: Fator nuclear kappa B;

PGC-1: Co-ativador 1 do receptor ativado por proliferador de peroxissoma gama;

PL: Comprimento da Pegada;

PO: Pós-operatórios;

TNF- $\alpha$ : Fator de necrose tumoral alfa;

tPA: Ativador do plasminogênio tecidual;

TS: Largura da Pegada;

UNIMEP: Universidade Metodista de Piracicaba.

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS	23
3 MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1 Aspectos Éticos	24
3.2 Grupos Experimentais	24
3.3 Análise Funcional da Marcha	25
3.4 Procedimento para Lesão Nervosa	27
3.5 Administração do ácido $\alpha$ -lipóico	29
3.6 Aplicação do ácido hialurônico-carboximetilcelulose	29
3.7 Coleta do Material	29
3.8 Análise dos Dados	30
3.8.1 Análise Morfométrica do Nervo Isquiático	30
3.8.2 Análise do Número de Axônios	32
3.9 Análise da Densidade do Tecido Conjuntivo	32
3.10 Análise Estatística	33
4 RESULTADOS	35
4.1 Índice Funcional do Ciático (IFC)	36
4.1.1 Análise do IFC	36
4.2 Análise Histológica	39
4.3 Análise Morfométrica	40
4.4 Planimetria do Tecido Conjuntivos	41
5 DISCUSSÃO	43
LIMITAÇÕES DO ESTUDO	61
CONCLUSÃO	62
REFERÊNCIAS	63
ANEXO	84

## 1. INTRODUÇÃO

Lesões nervosas periféricas normalmente decorrem de acidentes automobilísticos, mas também podem ser causadas por lesões penetrantes ou por tração nervosa excessiva (IJKEMA-PAASSEN et al., 2004). A consequência é uma perda sensório-motora no território de inervação (GIGO-BENATO et al., 2010; IJKEMA-PAASSEN et al., 2004; MACHADO, 2000) sendo o prognóstico complexo, especialmente quando o nervo é seccionado (BURNETT; ZAGER, 2004).

Estima-se que 50.000 pessoas sofrem lesões nervosas decorrentes de episódios traumáticos a cada ano na América do Norte, dado que sinaliza a relevância deste problema como uma questão de saúde pública (EVANS, 2001; MILLESI, 2000). No Brasil, o dado mais recente é de um estudo retrospectivo (1989 a 2004) de 456 casos de lesões traumáticas de nervo, no qual a secção completa representava 41% dos casos (KOUYOUMDJIAN, 2006).

As lesões nervosas foram classificadas primeiramente por Seddon (1943), citado por Burnett e Zager (2004), que consideraram o grau de comprometimento estrutural e o prognóstico de recuperação: Neuropraxia (tipo I) caracterizada por um bloqueio localizado da condução nervosa, com leve comprometimento da bainha de mielina e preservação da continuidade axonal, reversível espontaneamente em aproximadamente 30 dias; Axoniotmese (tipo II), caracterizada por compressão ou esmagamento do nervo, com interrupção da continuidade axonal, estando os envoltórios conjuntivos e a microcirculação preservados, na qual se observa a presença de degeneração Walleriana e a regeneração axonal ocorre de forma espontânea e processual; Neurotmese

(tipo III), caracterizada pela ruptura completa do nervo, com consequente descontinuidade entre o sistema nervoso central e a periferia, que exige reconstrução cirúrgica.

Na neurotmele e na axoniotmele, a regeneração nervosa é possível, porém, diferentemente de outros tecidos do corpo, a regeneração de nervos é lenta e frequentemente incompleta. Segundo Grinsell e Keating (2014), menos da metade dos pacientes submetidos a reparo cirúrgico recuperam uma boa função motora ou sensorial.

O gerenciamento das lesões traumáticas do nervo é influenciado por vários fatores, incluindo a localização da lesão, o tipo de lesão, o tamanho da perda de segmento nervoso, o tempo transcorrido da lesão, além do envolvimento de tecidos moles na lesão. Apesar do ambiente ser permissivo ao crescimento no sistema nervoso periférico (SNP), lesões nervosas importantes em humanos têm potencial de recuperação espontânea muito limitado (PALISPIS; GUPTA, 2017).

Regeneração nervosa periférica é um fenômeno complexo que envolve uma série de mudanças moleculares, celulares e em níveis teciduais (CÁMARA-LEMARROY; GUZMÁN-DE LA GARZA; FERNÁNDEZ-GARZA, 2010; GEUNA et al., 2009; NAVARRO; VERDÚ; BUTÍ, 1994; TETZLAFF et al., 1991). As mudanças biológicas são ainda mais dramáticas quando ocorre perda de um segmento nervoso. Nos casos em que um autoenxerto de nervo não é uma opção, um envoltório de nervo artificial (prótese de nervo) é necessário para reconectar os cotos nervosos e restabelecer o contato com os alvos distais (BATTISTON et al., 2009; DEUMENS et al., 2010; GONZALEZ-PERES; UDINA; NAVARRO, 2013).

Diversas estratégias têm sido investigadas no sentido de se obter um dispositivo inovador, por meio da engenharia de tecidos, que favoreçam a regeneração e reparo das lesões nervosas periféricas, incluindo, entre outros: a administração sistêmica de fármacos neuroprotetores; a liberação local e controlada de fatores neurotróficos e/ou outras citocinas neuroativas; o desenvolvimento de materiais biomiméticos que imitem as propriedades do ambiente dos nervos periféricos; a implantação de envoltórios superficiais contendo moléculas bioativas; e a estimulação local por meio de agentes físicos pró-regenerativos (GEUNA et al., 2016).

Avanços nas técnicas microcirúrgicas para tratamento das lesões nervosas periféricas têm ocorrido, mas nenhuma técnica até o momento consegue garantir a total recuperação e normalização da função neuromuscular, sendo os resultados clínicos limitados (GIGO-BENATO; GEUNA; ROCHKIND, 2005), fato que reafirma a importância de estudos que investiguem recursos que possam facilitar ou acelerar a recuperação funcional.

A literatura especializada aponta diversas alternativas cirúrgicas para o reparo da lesão nervosa periférica. Dentre elas, destacam-se os enxertos nervosos (SHORES, 1996) e as técnicas de tubulização com envoltórios constituídos a partir de diferentes materiais (AZIZI et al., 2015; DING et al., 2010; KALBERMATTEN et al., 2009; LI et al., 2010), sendo o autoenxerto de nervo por microsutura epineural considerado padrão ouro devido à sua atratividade anatômica e possível reparação fascicular (GRINSELL; KEATING, 2014; LUNDBORG, 2000).

Inúmeras condutas têm sido descritas na literatura, mas nenhuma tem promovido resultados equivalentes ou superiores aos dos autoenxertos com

comprimentos superiores a 3 cm (COLEN; CHOI; CHIU, 2009). Pfister et al. (2011) destacam que, apesar do reparo adequado do nervo no local do enxerto, a taxa de regeneração axonal no homem é lenta (1 a 2 mm/dia).

Enxertos de nervo autólogos oferecem um ambiente permissivo e estimulante para a regeneração nervosa, incluindo as lâminas basais das células de Schwann, fatores neurotróficos e moléculas de adesão (SIEMIONOW; BRZEZICKI, 2009). Além da especificidade tecidual, o enxerto de nervo minimiza a distância entre os cotos nervosos facilitando o processo de regeneração (WONG; PIANTA; MASTELLA, 2012).

Os enxertos de nervo são propostos sempre que a sutura do nervo não for possível sem uma determinada tensão (LUNDBORG, 1987). Os enxertos podem ser obtidos da mesma pessoa (autoenxerto), de outro ser humano (aloenxerto) ou de outra espécie (xenoenxerto) e o nervo mais utilizado para este fim é o nervo sural (LEE; WOLFE, 2000).

Além da reconexão cirúrgica do nervo danificado, diversos instrumentos terapêuticos têm sido utilizados com a finalidade de aprimorar o processo de regeneração nervosa periférica com vistas à recuperação funcional mais precoce. Entre eles destacam-se os recursos farmacológicos, utilizando o ácido alfa-lipóico (AZIZI et al., 2015; DEMIR et al., 2014; TURAMANLAR et al., 2015), o ácido hialurônico (BARRREIROS et al., 2014; PARK et al., 2011a; SMIT et al., 2004), entre outros, além de recursos físicos, como a estimulação elétrica (MENDONÇA; BARBIERI; MAZZER, 2003; OLIVEIRA et al., 2008; TEODORI et al., 2011a), ultrassom (CÂMARA et al., 2011; MOHAMMED; AL-MUSTAFAWI; KAKA, 2007; MONTE-RASO et al., 2006), laser de baixa intensidade (BUCHAIM et al., 2015; REIS et al., 2008; ROSA JUNIOR et al.,

2016; SILVA-COUTO et al., 2012) e exercícios físicos (OLIVEIRA et al., 2008; SOBRAL et al., 2008; TEODORI et al., 2011b).

O ácido alfa-lipóico (AL) é um micronutriente com propriedades neuroprotetoras e antioxidantes, utilizado no tratamento das doenças de Alzheimer e Parkinson, dos distúrbios da dor, da polineuropatia diabética e das neuropatias (WANG et al., 2011). Atua no suporte metabólico às células nervosas, modulando a liberação de citocinas neurotróficas, reduzindo o processo inflamatório e aprimorando o funcionamento das fibras nervosas, além de inibir a degeneração retrógrada, promovendo a neuroproteção e neurorregeneração (ZIEGLER, 2004).

Vários estudos demonstraram que o AL pode diminuir lesões por isquemia-reperfusão no córtex cerebral (PACKER; TRITSCHLER; WESSEL, 1997), coração (FREISLEBEN, 2000) e nos nervos periféricos (MITSUI et al., 1999). Além disso, Senoglu et al. (2009) mostraram que a administração intraperitoneal do AL após axoniotmese do nervo isquiático reduziu as espécies reativas de oxigênio, favorecendo a regeneração nervosa. Também tem sido atribuído ao AL o aumento da atividade da proteína quinase ativada pela adenosina monofosfato (AMPK) em músculos esqueléticos de ratos obesos propensos à diabetes, acompanhado por melhora do metabolismo da glicose e oxidação de ácidos graxos (LEE et al., 2005; SHEN et al., 2007).

Fares et al. (2013) apontam que a metaloproteinase 2 (MMP-2) parece funcionar como regulador sobre do processo inflamatório, pois gera aumento das citocinas anti-inflamatórias e diminuição das citocinas inflamatórias, assim como, níveis séricos de metaloproteinase 9 (MMP-9) correlacionam-se positivamente com os níveis séricos das citocinas inflamatórias, indicando

comportamentos opostos entre a MMP-2 e MMP-9. Segundo Alleva et al. (2008), o AL promove uma indução seletiva de MMP-2 e inibição da MMP-9, induzindo a migração celular, e minimizando os eventos inflamatórios associados.

Uma dieta contendo AL poderia contribuir para uma recuperação melhor sucedida de lesões nervosas periféricas. As fontes alimentares que possuem em sua constituição o ácido alfa-lipóico na forma de lipolisina são: espinafre, brócolis, tomate, além do rim, coração e fígado de animais (GHIBU et al., 2009).

Outro recurso terapêutico que tem sido utilizado para favorecer o processo de regeneração nervosa periférica é o ácido hialurônico (HA), um componente natural da matriz extracelular que, juntamente com a matriz de fibrina-hialuronato, desempenha importante papel na recuperação de lesões, reduzindo a cicatriz perineural, à aderência pós-operatória e favorecendo a regeneração axonal em nervos periféricos (SCHIMIZZI et al., 2006; SECKEL et al., 1995).

Carboximetilcelulose (CMC) é um polissacarídeo biocompatível que age como uma barreira física, podendo reduzir a aderência no nervo periférico após lesão. Seu efeito na redução da fibrose epidural após cirurgia espinal foi relatado por Isik et al. (1999) e por Rodgers et al. (2003).

Os agentes anti-aderência são disponíveis em várias formas farmacêuticas, variando de acordo com as suas características físicas: líquido, gel ou membrana. Os produtos que contém o componente HA-CMC se apresentam na forma de membrana ou solução.

O HA-CMC em sua forma de membrana é comercialmente disponível como Seprafilm (Genzyme, Cambridge MA, EUA). A comprovação da eficácia do Seprafilm na prevenção da aderência pós-cirúrgica na região abdominal levou ao uso generalizado dessa membrana no campo experimental e clínico (BECK et al., 2003). Entretanto, poucos relatos sobre a utilização da membrana HA-CMC para a prevenção de aderência no nervo periférico foram identificados (ADANALI et al., 2003; AGENOR et al., 2017; MAGILL et al., 2009), uma vez que esta membrana é relativamente rígida em relação aos nervos, o que confere algumas restrições físicas na sua utilização para o reparo de lesão nervosa (PARK et al., 2011b).

Adanali et al. (2003) em um estudo utilizando coelhos jovens submetidos a transecção do nervo isquiático, observaram que uma associação entre HA e CMC na forma de membrana envolvendo externamente o nervo lesado foi efetiva para reduzir a aderência aos tecidos vizinhos durante a regeneração, havendo evidente redução da fibrose intra e extraneural.

Magill et al. (2009) avaliaram ratos adultos submetidos à secção do nervo isquiático e observaram que uma associação entre HA e CMC, na forma de membrana envolvendo externamente o nervo lesado, foi efetivo para reduzir o tecido cicatricial perineural.

Agenor et al. (2017) avaliaram o efeito de uma associação entre HA e CMC administrada no interior de tubos de silicone utilizados como ponte entre os cotos nervosos seccionados do nervo isquiático de ratos, observando inibição de crescimento axonal quando o HA-CMC entrava em contato direto com o segmento nervoso lesado.

Yamamoto et al. (2010) justificam que a associação entre HA e CMC permite um retardo na absorção do HA, o que prolonga a duração do seu efeito anti-aderência.

Recentemente, uma solução de HA-CMC foi desenvolvida (Guardix-sol; Biorane, Seoul, Coréia), quimicamente idêntica à membrana HA-CMC, porém mais apropriada e de fácil aplicabilidade a um nervo periférico, não havendo restrições para seu uso relacionadas à forma ou extensão da lesão (LEW et al., 2010).

Tem sido atribuído ao HA e suas derivações a redução da formação de tecido cicatricial resultante de processos cirúrgicos no nervo (MAGILL et al., 2009).

O HA estimula a produção de interleucina 1 (IL-1) (HIRO et al., 1986), uma citocina derivada de macrófagos e monócitos, que estimula a proliferação e maturação de linfócitos (GERY; GERSHON; WAKSMAN, 1972; LIPSKY et al., 1983), induz febre (DINARELLO; WOLFF, 1982), estimula a proliferação de fibroblastos (SCHMIDT et al., 1982) e a acelera a reabsorção de proteoglicanos (SAKLATVALA; SARFIELD; PILSWORTH, 1983). Além disso, estimula a produção de colagenase (DAYER et al., 1977) e a síntese dos proteoglicanos (BOCQUET et al., 1986) e deprime a síntese de colágeno (GOWEN et al., 1984; PUJOL et al., 1984) em células sinoviais e condrócitos articulares, sendo essas ações relacionadas ao processo destrutivo da sinóvia no quadro da artrite reumatóide.

Em monócitos e macrófagos, a biossíntese de interleucina 6 (IL-6) pode ser estimulada especialmente por toxina bacteriana, mas há produção de IL-6 a partir de monócitos periféricos após estimulação por IL-1. Em fibroblastos e

células endoteliais, as citocinas endógenas IL-1 e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), desempenham um papel importante na produção de IL-6, agindo através de dois sistemas de segundo-mensageiro: proteína quinase C e AMPc (adenosina monofosfato cíclico). Então, a IL-1 e o TNF- $\alpha$  seriam responsáveis pela amplificação dos efeitos biológicos de IL-6 (SEHGAL; WALTHER; TAMM, 1987; SHALABY et al., 1989; TOSATO; JONES, 1990; ZHANG et al., 1988).

O HA e seus derivados tem o efeito de otimizar a matrix extracelular (ADANALI et al., 2003; MAGILL et al., 2009). HA regula a motilidade dos leucócitos, a aderência e a fagocitose, e então ele suprime a formação de cicatriz causada pelo processo de infiltração de células inflamatórias para o tecido lesado (GOLDBERG; TOOLE, 1987). O revestimento do campo cirúrgico com HA desde o início ao final da cirurgia pode reduzir a formação de cicatriz (IKEDA et al., 2003).

GAGO et al. (2003) observaram que a membrana de HA-CMC não afetou a expressão do fator de transformação de crescimento beta 1, do colágeno tipo 1, da matriz de metaloproteinase 1 (MMP-1) e MMP-2, do inibidor de da MMP-1 tecidual , e do ativador do plasminogênio tecidual (tPA), mas que age como uma barreira física contra a aderência aos tecidos vizinhos.

Diante do exposto e considerando que: a) o HA-CMC promove a redução da aderência dos tecidos adjacentes ao nervo, além de reduzir da formação de tecido cicatricial resultante de processos cirúrgicos em nervos de ratos (PARK et al., 2011b); b) que o AL possui um efeito neuroprotetor, além de favorecer o fluxo sanguíneo neural, a condução do impulso nervoso e a neuroregeneração (ZIEGLER, 2004); c) que até o momento não foram identificados relatos sobre a utilização da solução de HA-CMC associada ao AL

no tratamento da lesão nervosa do tipo neurotmesa; a hipótese deste estudo é que AL e o HA-CMC, assim como a associação entre ambos, poderia favorecer a regeneração nervosa e a recuperação funcional em ratos submetidos a neurotmesa.

## 2. OBJETIVOS

### Geral

Avaliar o efeito da associação entre ácido hialurônico carboximetilcelulose (HA-CMC) e ácido alfa lipóico (AL) sobre a regeneração nervosa e recuperação funcional após autoenxerto de nervo em ratos.

### Específicos

Avaliar as características quantitativas, morfométricas e funcionais do nervo isquiático regenerado, considerando:

- o número de axônios,
- o diâmetro dos axônios,
- o diâmetro das fibras nervosas,
- a espessura das bainhas de mielina,
- a razão G,
- a densidade de área do tecido conjuntivo neural,
- a massa muscular,
- a funcionalidade para a marcha.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Aspectos Éticos**

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Metodista de Piracicaba – UNIMEP, sob protocolo nº 02/16 (Anexo 1).

#### **3.2 Grupos Experimentais**

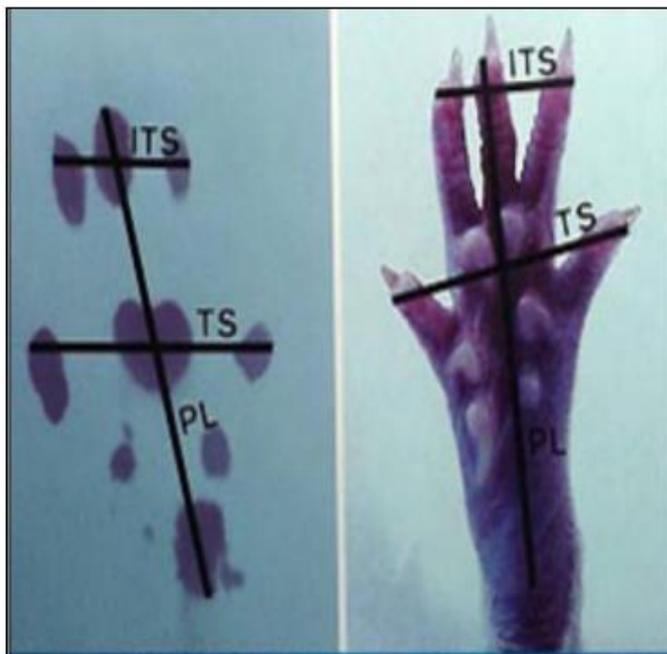
Trinta ratos da linhagem Wistar, com idade entre 6 e 7 semanas e massa corporal média de  $179.88 \pm 23,92$  g, foram selecionados para o estudo e mantidos no Biotério da Faculdade de Ciências da Saúde – Universidade Metodista de Piracicaba (FACIS-UNIMEP) em gaiolas coletivas de polietileno (4 a 6 animais por gaiola), com ventilação adequada, ciclo automático de iluminação claro/escuro de 12 horas e livre acesso à água e ração peletizada. Os animais foram aleatoriamente divididos em 5 grupos ( $n = 6$ ), conforme mostra o quadro 1:

**Quadro 1:** Descrição dos grupos experimentais e procedimentos.

<b>GRUPO</b>	<b>SIGLA</b>	<b>DESCRIÇÃO</b>
CONTROLE	C	sem qualquer intervenção
LESÃO	L	secção do nervo isquiático + autoenxerto de nervo
LESÃO + ÁCIDO LIPÓICO	LL	secção do nervo isquiático + autoenxerto de nervo + administração de ácido lipóico
LESÃO + ÁCIDO HIALURÔNICO	LH	secção do nervo isquiático + autoenxerto de nervo + aplicação de ácido hialurônico
LESÃO + ÁCIDO LIPÓICO + ÁCIDO HIALURÔNICO	LLH	secção do nervo isquiático + autoenxerto de nervo + administração de ácido lipóico + aplicação de ácido hialurônico

### 3.3 Análise Funcional da Marcha

Os animais foram treinados a caminhar no dispositivo utilizado para análise funcional da marcha (DE MEDINACELLI; FREED; WYATT, 1982) e, para o registro das pegadas, o animal foi colocado em um corredor com dimensões 42 x 8,2 cm, com acesso a uma caixa escura, onde foi colocada uma tira de papel sulfite A4 branco para registro das pegadas. Para isso, as patas pélvicas dos animais foram marcadas com tinta de impressão digital e o animal posicionado no início do corredor, por onde caminha em direção ao ambiente escuro, deixando impressas as faces plantares das patas normal e experimental (DE MEDINACELLI; FREED; WYATT, 1982; VAREJÃO et al., 2004).



**Figura 1.** Parâmetros para mensuração das pegadas. PL: (print length); ITS: intermediate toes spread; TS: toe spread. **Fonte:** Varejão et al. (2004).

O registro das impressões plantares foi realizado no período pré-operatório em todos os grupos experimentais e utilizado como parâmetro inicial para comparação e avaliação dos registros pós-operatórios (PO) que foram obtidos no 7<sup>o</sup>, 14<sup>o</sup>, 21<sup>o</sup>, 28<sup>o</sup>, 35<sup>o</sup>, 42<sup>o</sup>, 49<sup>o</sup> e 56<sup>o</sup> dias PO, de acordo com o grupo experimental.

Para o cálculo do Índice Funcional do Ciático (IFC) foi utilizado um paquímetro digital (MITUTOYO®), registrando-se a distância entre a extremidade do terceiro dedo e o calcâneo - Comprimento da Pegada (PL); a distância entre o primeiro e o quinto dedo - Largura da Pegada (TS) e a distância entre o segundo e quarto dedo - Largura Intermediária da Pegada (IT) das patas experimental (E) e normal (N), como sugerido por Bain, Mackinnon e Hunter (1989) e Varejão et al. (2004), conforme mostra a figura 1.

Os valores encontrados foram organizados na fórmula definida por Bain, Mackinnon e Hunter (1989):

$$SFI = - 38.3 \frac{(EPL-NPL)}{NPL} + 109.5 \frac{(ETS-NTS)}{NTS} + 13.3 \frac{(EIT-NIT)}{NIT} - 8.8$$

Os dados obtidos expressam a perda funcional em termos percentuais, sendo que valores entre 0 e -20 representam função normal ou ausência de disfunção e entre -21 e -100, perda da função, sendo que, quanto mais próximo de -100 (menos cem), maior a disfunção (BAIN; MACKINNON; HUNTER, 1989).

### 3.4 Procedimento para lesão nervosa

Previamente à desnervação, os animais foram pesados e anestesiados com uma mistura de cloridrato de cetamina (1,16 g/10 mL) e cloridrato de xilazina (2 g/100 mL), na proporção de 3:2, em dose de 0,09 mL/100 g de peso corporal e 0,06 mL/100 g de massa corporal, respectivamente.

Após anestesia, os animais foram posicionados em decúbito ventral e submetidos à tricotomia e assepsia da região glútea esquerda. A seguir, uma incisão cirúrgica de aproximadamente 2 cm foi realizada sobre a pele acompanhando-se o trajeto de projeção do nervo isquiático. Os planos cutâneo e muscular foram afastados, permitindo a exposição e o acesso ao nervo.

Sob microscópio cirúrgico (DF Vasconcelos<sup>®</sup>) o nervo isquiático foi cuidadosamente separado do tecido conjuntivo adjacente utilizando-se uma tesoura microcirúrgica (Roca<sup>®</sup>) e um bastão de vidro com ponta curva.

Uma fita de papel milimetrado foi posicionada paralelamente ao nervo para mensurar e padronizar o comprimento do fragmento nervoso (8 mm). Uma importante consideração metodológica sobre autoenxerto de nervo em ratos é o comprimento máximo do defeito do nervo isquiático, que deve ser limitado a 1,5 cm (GEUNA, 2015). Portanto, neste estudo o tamanho do *gap* no nervo, e conseqüentemente, do autoenxerto, respeitou a maioria dos trabalhos científicos que utilizam o rato como modelo experimental (CHEN; YU, STRICKLAND, 2007; MAURÍCIO et al., 2011) e consideram um *gap* de 8 a 10 mm no nervo isquiático para implante, pois segundo Amado et al. (2010) e Gu et al. (2011), o uso de envoltórios neurais sem incorporação de fatores de crescimento para reparar defeitos do nervo isquiático de ratos tem possibilitado recuperação morfológica e funcional apenas quando o *gap* tem até 10 mm.

Em seguida, o nervo isquiático foi seccionado com tesoura microcirúrgica (Roca®). Nos grupos L, LL, LH e LLH, o fragmento seccionado foi invertido a 180° e imediatamente fixado aos cotos nervosos proximal e distal por dois pontos de sutura epineural em cada extremidade, com fio monofilamento nylon 10-0 Dermalon®. Foram mantidos 180° de distância entre cada ponto de sutura, para garantir o adequado acoplamento entre os cotos e o enxerto. A manipulação dos segmentos nervosos e do fragmento do enxerto foi delicada para evitar tensão ao nervo.

Após este procedimento os planos muscular e cutâneo foram suturados com fio de algodão 6-0 Ethicon® e foi administrado 4 µL de analgésico dipirona sódica 500 mg/mL (via oral) e PVP (Povidine) – I 10% (uso tópico) no local da incisão, a cada 12 horas, no primeiro e segundo dia pós-operatório, quando os animais estavam alocados em gaiolas individuais.

Considerando que a interação entre os animais é uma forma de estímulo à atividade motora, a partir do 3º dia da lesão, todos os animais foram alocados em grupos de 4 a 6, de acordo com o grupo experimental, em gaiola grande, onde permaneceram até completar 8 semanas, quando os nervos foram coletados para análise. O mesmo procedimento foi adotado para os animais do grupo C, não submetidos à lesão nervosa.

### **3.5 Administração do ácido $\alpha$ -lipóico**

Foi administrada uma solução de AL numa concentração de 100 mg/kg/dia nos grupos LL e LLH, por via orogástrica, utilizando-se uma seringa de 5 mL acoplada a uma sonda de Gavagem IC 810 de aço inox BD-12, diâmetro da cânula de 1,2 mm, com esfera 2,3 mm, raio de 40 mm e comprimento de 54 mm. A aplicação teve início 24 horas após a lesão nervosa e foi realizada diariamente, durante 8 semanas, realizada no período da manhã entre 8 e 10 horas.

### **3.6 Aplicação do ácido hialurônico-carboximetilcelulose**

Nos grupos LH e LLH foi administrado 0,2 mL de solução HA-CMC ao redor do nervo, incluindo o local de reparo, segundo protocolo definido por Park et al. (2011b).

### **3.7 Coleta do Material**

Transcorrido o tempo previsto para o experimento (56 dias), os animais foram pesados e anestesiados da mesma forma que para a cirurgia de lesão nervosa.

O nervo isquiático esquerdo foi exposto cirurgicamente e fixado *in situ* à 4°C durante 10 minutos com fixador de Karnovsky (KARNOVSKY, 1965) modificado, contendo 1% de paraformaldeído e 2% de glutaraldeído em tampão cacodilato de sódio a 0,1 M, pH 7.3. Em seguida, as porções correspondentes à região distal à lesão foram retiradas e mantidas em solução fixadora (Karnovsky) por 24 horas e pós-fixadas em tetróxido de ósmio a 1% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7.3 por duas horas, imersas em uranila 5% durante 24 horas, para coloração em bloco, desidratadas em soluções crescentes (30% a 100%) de acetona e incluídas em resina Araldite 502 (Electron Microscopy Sciences®).

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

Após a coleta dos nervos, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical.

### **3.8 Análise dos Dados**

Para análise dos dados morfométricos e funcionais, o pesquisador foi cegado, não tendo conhecimento do grupo ao qual pertenciam as lâminas histológicas, assim como as pegadas registradas para o teste funcional.

#### **3.8.1 Análise Morfométrica do Nervo Isquiático**

A análise morfométrica foi realizada a partir de cortes transversais da região distal à lesão nervosa nos animais dos grupos L, LL, LH e LLH, bem

como do segmento correspondente nos animais do grupo C, em microscópico de luz Olympus® - BX 41-BF, acoplado a uma câmera de vídeo Infinity Lite®.

As imagens foram transferidas para um computador, que contém o *software* Image-Pro Plus 6.2 – Media Cybernetics®, para se obter o número de axônios e o diâmetro das fibras nervosas e dos axônios, a partir dos quais foram calculadas a espessura das bainhas de mielina e a razão G.

O sistema foi calibrado para obtenção de medidas na unidade de micrômetros (µm), com o auxílio de uma lâmina de calibração micrometrada ZEISS 5+100/100 mm.

Foi analisado um corte por animal em cada grupo, do qual foram obtidas imagens em objetiva de 10 x, para a observação de todo o nervo e em objetiva de 100 x, para a seleção dos campos para amostra. A amostra consistiu de 5 campos aleatoriamente definidos em cada corte, sendo possível normalizar e congelar as imagens para análise morfométrica.

As medidas foram realizadas de forma semi-automática, sendo cada fibra nervosa mielínica e axônio contornados pelo mouse para obter os valores (em micrômetros) referentes ao diâmetro das fibras e diâmetro dos axônios, respectivamente. Esses valores foram transferidos para o Excel, constituindo uma lista de dados.

A seguir, são apresentadas as fórmulas utilizadas para calcular o diâmetro médio dos axônios, diâmetro médio das fibras, espessura média da bainha de mielina e razão G, respectivamente:

$$\text{Diâmetro médio axônios} = \frac{\sum \text{diâmetro axônios}}{N^{\circ} \text{ axônios}}$$

$$\text{Diâmetro médio fibras} = \frac{\sum \text{diâmetro fibras}}{N^{\circ} \text{ fibras}}$$

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

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

### 3.8.2 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. Para isso, foi estabelecida a proporção entre este valor e a área total do nervo, obtida em objetiva de 10x. As fórmulas a seguir mostram como foram calculados a porcentagem da amostra e o número total de axônios em cada nervo (onde \* corresponde à multiplicação), respectivamente (SANTO NETO et al., 1998):

$$\text{amostra (\%)} = \frac{\sum \text{área dos campos}}{\sum \text{área do nervo}} * 100$$

$$N^{\circ} \text{ total de axônios} = \frac{\sum N^{\circ} \text{ axônios}}{\text{amostra (\%)}} * 100$$

### 3.9 Análise da Densidade de Área de Tecido Conjuntivo do Nervo Isquiático

A densidade relativa de área do tecido conjuntivo neural foi determinada utilizando-se um microscópio de luz BX 41 (Nikon®) acoplado a uma câmera

Infinity Lite (Lumenera®) que captura as imagens e envia para um sistema de análise de imagens (Image Pró Plus 6.2 - Media Cybernetics®).

Para obtenção da densidade da área de tecido conjuntivo, foram considerados 5 campos aleatoriamente definidos nas lâminas histológicas para cada animal de cada grupo, em ampliação de 1000 x, totalizando 30 campos por grupo experimental. Foi realizada uma planimetria por contagem de pontos, onde se aplicou uma máscara reticulada com 29 linhas verticais e 39 linhas horizontais, contendo 1131 intersecções de reta.

O número de intersecções de retas que incidiram sobre o tecido conjuntivo nos nervos analisados foi registrado e, em seguida, dividiu-se o número de intersecções que incidiram sobre o tecido conjuntivo pelo número total de intersecções. Após encontrar o valor referente em todos os 5 campos de cada animal, somou-se esses 5 valores, e o resultado dessa soma foi multiplicado por 5, considerando que a amostra analisada correspondeu a 5% da área total do nervo, resultando na densidade relativa de área de tecido conjuntivo (em porcentagem).

### **3.10 Análise Estatística**

A análise estatística foi realizada através do INSTAT – Graphpad Software – Versão 3 (2000) Inc – San Diego, California, USA.

Adotou-se o nível de significância  $\alpha \leq 0,05$ . Assim, foram considerados significativos os parâmetros e/ou funções lineares de seus níveis, tais que  $p \leq 0,05$ .

Todos os procedimentos inferenciais, isto é, os testes de hipóteses e as estimativas por intervalo (intervalos de confiança), foram precedidos por testes

de homogeneidade de variâncias (Levene) e de normalidade (Shapiro-Wilk), que também possibilitaram a escolha entre procedimentos paramétricos e não paramétricos.

Todas as variáveis atenderam as pressuposições de normalidade e homogeneidade de variâncias e, portanto, foram adotados os métodos da estatística paramétrica: análise de variância (ANOVA One - Way) e posterior comparação múltipla de médias de grupos por meio do teste de Tukey HSD.

#### 4. RESULTADOS

A Tabela 1 mostra os valores médios e respectivos desvios padrões da massa corporal dos animais dos diferentes grupos experimentais.

**Tabela 1:** Valores de média  $\pm$  DP da massa corporal dos animais dos grupos Controle (C), Lesado (L), Lesado + Lipóico (LL), Lesado + Hialurônico (LH) e Lesado + Lipóico + Hialurônico (LLH), antes (Pré) e após (Pós) o período de tratamento.

Grupos	Massa Corporal Pré (g)	Massa Corporal Pós (g)
<b>C</b>	166.22 $\pm$ 7.56	380.02 $\pm$ 27.67 *
<b>L</b>	196.46 $\pm$ 17.49	405.41 $\pm$ 39.17 *
<b>LL</b>	185.39 $\pm$ 41.19	356.98 $\pm$ 59.35 *
<b>LH</b>	178.74 $\pm$ 12.87	368.30 $\pm$ 18.60 *
<b>LLH</b>	172.59 $\pm$ 20.92	339.66 $\pm$ 32.18 *

(\*) Difere do respectivo Pré.

Todos os grupos apresentaram um aumento significativo de massa corporal ao longo do experimento ( $p < 0,05$ ), não havendo diferença significativa entre os grupos ( $p > 0,05$ ) antes ou após o período de tratamento.

A Tabela 2 mostra os valores médios e respectivos desvios padrões do peso do músculo sóleo dos animais dos diferentes grupos experimentais ao término do período de tratamento.

**Tabela 2:** Valores de média  $\pm$  DP da massa do músculo sóleo dos animais dos grupos Controle (C), Lesado (L), Lesado + Lipóico (LL), Lesado + Hialurônico (LH) e Lesado + Lipóico + Hialurônico (LLH).

<b>Grupos</b>	<b>Massa músculo Sóleo (g)</b>
<b>C</b>	0.13 $\pm$ 0.01
<b>L</b>	0.09 $\pm$ 0.01 *
<b>LL</b>	0.04 $\pm$ 0.01 *†
<b>LH</b>	0.06 $\pm$ 0.02 *†
<b>LLH</b>	0.05 $\pm$ 0.01 *†

(\*) Difere do C; (†) Difere do L.

Os animais de todos os grupos lesados apresentaram redução da massa do músculo sóleo em relação ao grupo controle após 56 dias da lesão ( $p < 0,05$ ). A massa do músculo sóleo nos grupos LL, LH, LLH foi significativamente menor que no grupo L ( $p < 0,05$ ).

#### **4.1 Índice Funcional do Ciático (IFC)**

Para o IFC a análise de variância foi realizada considerando-se, além do fator intergrupos, o fator intragrupos, com o objetivo de verificar a existência de interação entre eles, buscando investigar a possível ocorrência de comportamentos diferentes no decorrer do tempo, de acordo com o grupo.

##### **4.1.1 Análise do IFC**

A Tabela 3 mostra os valores médios do e respectivos desvios padrões do IFC nos diferentes grupos experimentais e nos diferentes tempos da avaliação funcional da marcha.

**Tabela 3:** Valores de média  $\pm$  DP do Índice Funcional do Ciático (IFC) nos grupos Lesado (L), Lesado + Lipóico (LL), Lesado + Hialurônico (LH), e Lesado + Lipóico + Hialurônico (LLH) nos diferentes tempos de análise. PO = Pós operatório.

Período de Análise (dias)	Grupos			
	L	LL	LH	LLH
Pré	-5.21 $\pm$ 10.81	-7.31 $\pm$ 8.14	-10.40 $\pm$ 13.63	-5.87 $\pm$ 9.05
7º PO	-82.10 $\pm$ 10.38*	-76.48 $\pm$ 9.19*	-72.47 $\pm$ 12.25*	-80.59 $\pm$ 6.51*
14º PO	-92.46 $\pm$ 7.20*	-81.96 $\pm$ 6.52*†	-84.28 $\pm$ 2.01*†	-93.50 $\pm$ 4.80*†‡£
21º PO	-93.81 $\pm$ 7.59*	-87.43 $\pm$ 6.60*	-92.31 $\pm$ 7.88*‡	-89.02 $\pm$ 5.65*
28º PO	-87.28 $\pm$ 6.37*	-88.40 $\pm$ 9.88*	-92.41 $\pm$ 7.19*‡	-88.26 $\pm$ 3.08*
35º PO	-80.12 $\pm$ 11.91*	-72.48 $\pm$ 10.88*§	-82.91 $\pm$ 4.97*	-83.46 $\pm$ 2.60*
42º PO	-84.42 $\pm$ 24.34*	-69.53 $\pm$ 11.45*#§	-84.50 $\pm$ 16.21*	-81.66 $\pm$ 7.80*€
49º PO	-73.01 $\pm$ 22.99*#	-70.90 $\pm$ 6.09*#§	-81.51 $\pm$ 8.66*	-84.07 $\pm$ 9.00*
56º PO	-69.13 $\pm$ 12.74*€#	-73.25 $\pm$ 9.81*	-72.51 $\pm$ 16.99*#§	-83.39 $\pm$ 3.14*

**Intragrupos:** (\*) Difere do respectivo Pré-operatório; (‡) Difere do respectivo 7ºPO; (€) Difere do respectivo 14ºPO; (#) Difere do respectivo 21ºPO; (§) Difere do respectivo 28ºPO.

**Intergrupos:** (†) Difere do L14ºPO; (£) Difere do LH14ºPO e do LL14ºPO.

No período pré-operatório todos os grupos apresentaram valores entre 0 e -20, indicando função normal. Porém, estes valores diminuíram a partir do 7º dia pós-operatório (PO) ( $p < 0,0001$ ), o que representa uma perda funcional consequente à lesão nervosa.

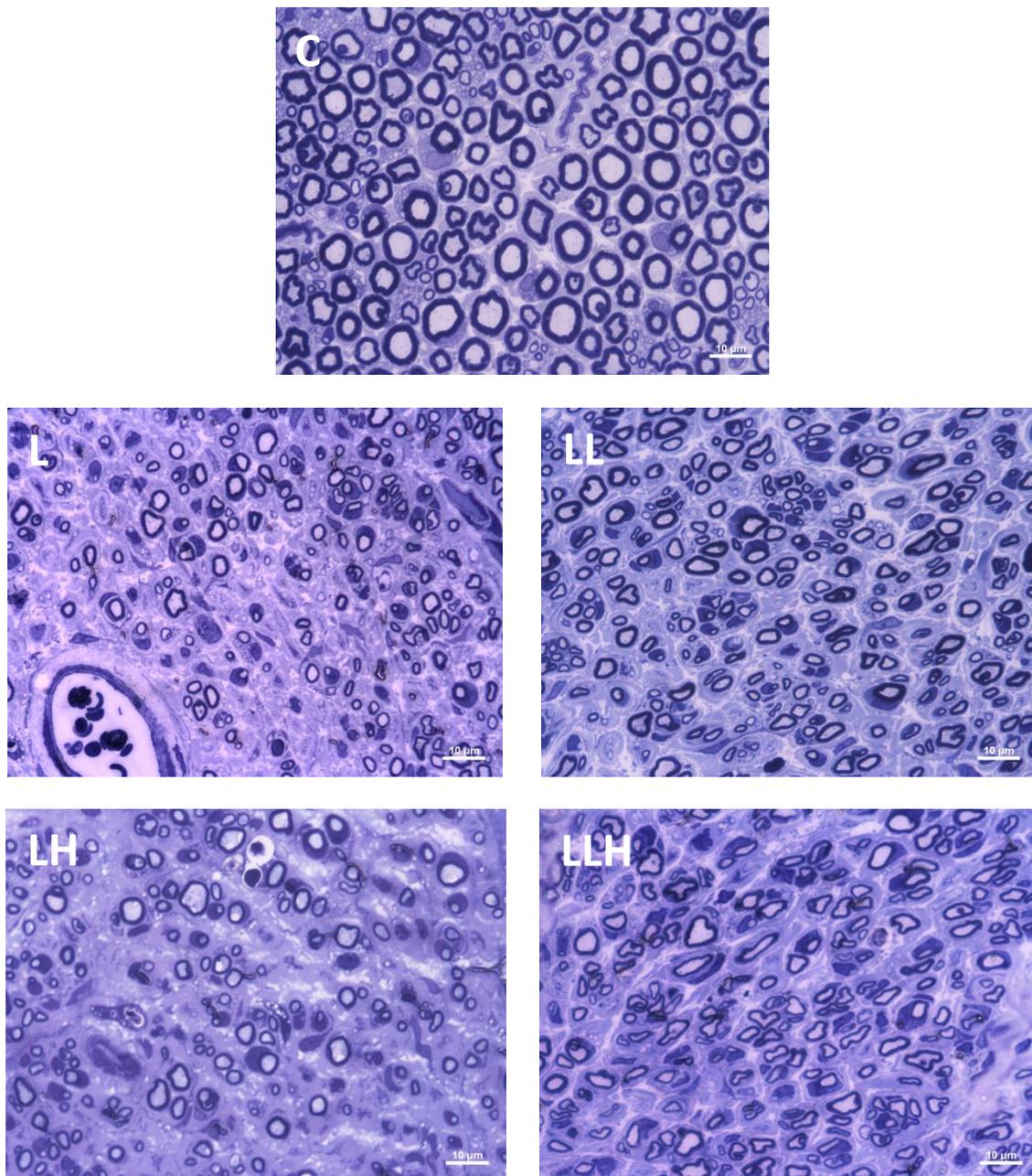
Uma análise intragrupos mostrou que o grupo L apresentou valores menos negativos de IFC no 56º em comparação ao 14º PO, assim como aconteceu com o 49º e 56º quando comparado com o 21º PO ( $p < 0,0001$ ). O grupo LL apresentou valores menos negativos de IFC no 42º e 49º em comparação ao 21º PO, se comportando da mesma forma nos 35º 42º 49º em relação ao seu respectivo 28º PO ( $p < 0,001$ ).

O grupo LH apresentou valores mais negativos de IFC no 21º e 28º PO quando comparado ao 7º PO, no 56º PO o IFC foi menos negativo que nos respectivos 21º e 28º PO ( $p < 0,0001$ ). O grupo LLH apresentou valores mais negativos de IFC no 14º em comparação ao 7º PO. No 42º PO o IFC foi menos negativo que no 14º PO ( $p < 0,0001$ ).

Uma análise intergrupos mostrou que os grupos LL, LH apresentaram valores de IFC menos negativos que o grupo L no 14º PO e que o LLH apresentou valores mais negativos que os demais grupos lesados no mesmo período ( $p < 0,0009$ ).

## 4.2 Análise histológica

Na figura 3 observam-se as características histológicas do nervo isquiático nos diferentes grupos experimentais.



**Figura 3:** Micrografia em corte transversal do nervo isquiático dos animais dos grupos: Controle (C), Lesado (L), Lesado + Lipóico (LL), Lesado + Hialurônico (LH) e Lesado + Lipóico + Hialurônico (LLH) nos diferentes tempos de análise. Barra = 10 µm.

Os nervos do grupo controle apresentaram características histológicas de nervos normais, incluindo o diâmetro dos axônios, o diâmetro das fibras nervosas e a espessura das bainhas de mielina, assim como a área de tecido conjuntivo. Nos grupos L, LL, LH, LLH o diâmetro dos axônios e das fibras nervosas e a espessura das bainhas de mielina aparentam ser menores que no grupo controle, enquanto a área de tecido conjuntivo aparenta ser maior. As diferenças quantitativas serão apresentadas na análise morfométrica.

### 4.3 Análise Morfométrica

A tabela 4 apresenta os valores médios e respectivos desvios padrões do número de axônios, diâmetro dos axônios, diâmetro das fibras nervosas, espessura da bainha de mielina e razão G.

**Tabela 4:** Valores médios  $\pm$  DP do número de axônios, diâmetro dos axônios ( $\varnothing$  Axônio), diâmetro das fibras ( $\varnothing$  Fibra), espessura das bainhas de mielina e razão G, nos grupos Controle (C), Lesado (L), Lesado + Hialurônico (LH), Lesado + Lipóico (LL) e Lesado + Lipóico + Hialurônico (LLH).

Grupos	N° Axônios	$\varnothing$ Axônios	$\varnothing$ Fibras	Espessura Mielina	Razão G
<b>C</b>	8050 $\pm$ 1613	7.70 $\pm$ 0.84	11.25 $\pm$ 0.77	1.77 $\pm$ 0.13	0.68 $\pm$ 0.03
<b>L</b>	13393 $\pm$ 3921	2.93 $\pm$ 0.17*	5.00 $\pm$ 0.25*	1.03 $\pm$ 0.16*	0.58 $\pm$ 0.05*
<b>LL</b>	12313 $\pm$ 3966	2.81 $\pm$ 0.22*	5.00 $\pm$ 0.31*	1.09 $\pm$ 0.08*	0.56 $\pm$ 0.02*
<b>LH</b>	14790 $\pm$ 325*	2.77 $\pm$ 0.30*	4.79 $\pm$ 0.26*	1.00 $\pm$ 0.09*	0.57 $\pm$ 0.04*
<b>LLH</b>	14430 $\pm$ 4001*	3.06 $\pm$ 0.33*	5.15 $\pm$ 0.40*	1.04 $\pm$ 0.17*	0.59 $\pm$ 0.05*

(\*) Difere do C.

O número de axônios nos grupos lesados nota-se que os grupos submetidos a tratamento com HA-CMC apresentaram número de axônios

significativamente maior em relação ao grupo controle ( $p < 0,05$ ). Entre os grupos lesados não houve diferença no número de axônios ( $p > 0,05$ ).

Os diâmetros de axônios de todos os grupos lesados foram menores que os achados no grupo controle ( $p < 0,05$ ), não havendo diferença significativa entre os diferentes tratamentos. O mesmo resultado foi observado em relação aos diâmetros das fibras nervosas e à espessura das bainhas de mielina ( $p < 0,05$ ).

Quanto aos valores de razão G, apesar das diferenças apontadas na tabela 3, todos os grupos apresentam valores entre 0,5 e 0,7, considerados normais de acordo com Anselin, Fink e Davey (1997).

#### 4.4 Planimetria do tecido conjuntivo

A tabela 5 apresenta os valores médios e respectivos desvios padrões da densidade de área de tecido conjuntivo dos animais nos diferentes grupos experimentais.

**Tabela 5:** Valores médios  $\pm$  DP da densidade da área de tecido conjuntivo nos grupos Controle (C), Lesado (L), Lesado + Lipóico (LL), Lesado + Hialurônico (LH) e Lesado + Lipóico + Hialurônico (LLH).

Grupos	Densidade de Área de Tecido conjuntivo (%)
C	8.37 $\pm$ 0.73
L	15.84 $\pm$ 2.06 *
LL	15.51 $\pm$ 2.62 *
LH	16.74 $\pm$ 1.78 *
LLH	14.95 $\pm$ 2.48 *

(\*) Difere do C.

Não houve diferença significativa na densidade de área de tecido conjuntivo entre os grupos lesados ( $p > 0,05$ ). Entretanto, todos os grupos lesados apresentaram densidade de área de tecido conjuntivo maior quando comparados com o grupo controle ( $p < 0,05$ ). Entre os diferentes tratamentos após a lesão não se observou diferença significativa ( $p > 0,05$ ).

## 5. DISCUSSÃO

A hipótese de que o AL e o HA-CMC, assim como a associação entre ambos, poderia favorecer a regeneração nervosa e a recuperação funcional em ratos submetidos à neurotmesa se baseia no fato de que a cicatrização intra e extraneural compromete a recuperação após neurotmesa (KOOPMANS; HASSE; SINIS, 2009; McDONALD et al., 2006; NGEOW et al., 2011; PARK et al., 2011b) e, portanto, a utilização de um agente farmacológico capaz de reduzir a formação de cicatriz pós-operatória, como o HA-CMC (PARK et al., 2011a), atuando como uma barreira física anti-aderência (SIKKINK; ZEEBREGTS; REIJNEN, 2007), associado a outro agente farmacológico com papel neuroprotetor, como o AL (ZIEGLER, 2004), poderia favorecer a regeneração nervosa e recuperação funcional.

Os resultados mostraram que o tratamento com o HA-CMC, com AL, ou com ambos, não foi efetivo para estimular a regeneração nervosa e a recuperação funcional após neurotmesa em ratos, assim como para evitar a perda de massa muscular consequente à desnervação.

A recuperação funcional após neurotmesa tem evoluído lentamente desde o desenvolvimento de técnicas de reparo microcirúrgico há mais de 50 anos, a partir do advento do microscópio cirúrgico. Ao longo do tempo, apenas um pequeno refinamento de técnicas cirúrgicas tem ocorrido. No entanto, até os dias atuais, para muitos pacientes a recuperação é incompleta e eles desenvolvem invalidez ao longo da vida. O reparo direto do nervo (neurorrafia) produz os melhores resultados e, quando há necessidade de inserção de um material para servir como ponte entre os cotos do nervo lesado, os

autoenxertos de nervo ainda são considerados o tratamento padrão-ouro (GRINSELL; KEATING, 2014; LUNDBORG, 2000).

O procedimento de reparo utilizado neste estudo foi o autoenxerto de nervo. Entretanto, segundo Park et al. (2011b), a presença de cicatriz intra e extraneural comprometem a recuperação da lesão, pois o tecido conjuntivo adjacente pode causar uma compressão ou mesmo restrição sobre o nervo, podendo gerar tração e compressão dos vasos intraneurais, favorecendo um quadro isquêmico no nervo. Além disso, a presença de cicatriz no leito nervoso pode gerar lesões por compressão crônica (dos axônios regenerados) e perda do deslizamento normal do nervo (MAGILL et al., 2009).

Do ponto de vista intraneural, a barreira mecânica ao crescimento axonal compromete a condução nervosa (KOOPMANS; HASSE; SINIS, 2009; PARK et al., 2011b), o que reflete diretamente na recuperação funcional.

A administração de HA-CMC na forma de membrana ou de solução tem sido praticada em determinados procedimentos cirúrgicos com sucesso, como em cirurgia endoscópica de seios da face (KIM et al., 2007), cirurgias abdominais, pélvicas, cirurgias de tendões da mão e cirurgias espinhais (PARK et al., 2011b). Em lesões de nervos periféricos, os poucos estudos encontrados serão discutidos a seguir, entretanto, alguns utilizam o HA-CMC na forma de membrana e outros na forma de solução. A solução de HA-CMC é mais adequada que na forma de membrana, pois segundo Park et al. (2011b), a membrana é um filme sólido muito rígido em relação ao nervo, enquanto na forma de solução, que é altamente viscosa, o HA-CMC adere aos tecidos e, após vários dias, é hidrolisado, absorvido e sofre excreção renal (PARK et al., 2011a).

Ozgenel (2003) avaliou o efeito da administração tópica de ácido hialurônico por meio de uma esponja de gelatina embebida com 0.3 mL de HA (Orthovisc), sobre a cicatrização e regeneração do nervo isquiático em ratos após 4 e 12 semanas da secção e sutura direta dos cotos. Um grupo de ratos recebeu uma solução salina de 0,3 mL (Controle) e o outro recebeu uma solução de 0,3 mL de HA (Lesado). Metade de dos nervos foram coletados após 4 semanas, e a outra metade após 12 semanas de pós-operatório, em ambos os grupos. A funcionalidade para a marcha apresentou melhora significativa nas 10 e 12 semanas pós-operatórias nos grupos tratados com HA. A espessura da cicatriz perineural foi significativamente reduzida nos grupos tratados nas 4 e 12 semanas ( $p < 0,05$ ), enquanto os diâmetros das fibras nervosas e dos axônios foram significativamente maiores nos grupos tratados com HA em ambos os períodos, o que refletiu em maior velocidade de condução nervosa, demonstrando que a aplicação tópica de HA intensifica o processo de regeneração do nervo, controlando a formação de cicatriz perineural.

Park et al. (2011b) avaliaram o efeito da solução de HA-CMC sobre a formação de cicatriz perineural consequente à secção e sutura direta dos cotos no nervo isquiático de ratos após 3, 6, 9 e 12 semanas da lesão. Observaram que todos os animais tratados com HA-CMC o grau de aderência do nervo (aderência perineural), o número de fibroblastos e o número de células inflamatórias foram significativamente menores em relação ao controle - que também teve o nervo lesado, porém tratado com salina - em todos os tempos de avaliação. Apontam que a administração intraoperatória de uma solução de HA-CMC sobre a lesão teve efeito favorável sobre a formação de cicatriz

extraneural e sobre a aderência do nervo aos tecidos adjacentes, além de favorecer a organização histomorfológica do nervo no local de reparo. Estes autores não realizaram análise morfométrica do nervo regenerado, nem avaliação funcional.

Neste estudo, a cicatrização extraneural e a aderência do nervo aos tecidos adjacentes não foi avaliada, pois o objetivo foi verificar o comportamento do tecido conjuntivo intraneural e a regeneração axonal frente a uma condição de menor cicatrização que seria possibilitada pelo HA-CMC e ao favorecimento da regeneração, que seria possibilitado pelo AL.

Após 8 semanas da lesão e exposição intraoperatória ao HA-CMC, a densidade de área de tecido conjuntivo intraneural ainda era significativamente maior que no grupo controle, o que sugere que o HA-CMC, da forma como utilizado, não foi efetivo para inibir a formação de cicatriz intraneural. O número de axônios quase duplicou nos grupos LH e LLH em relação ao controle, porém o diâmetro dos axônios e das fibras nervosas, assim como a espessura das bainhas de mielina, não alcançaram valores próximos ao controle. A funcionalidade para a marcha também não foi recuperada.

O fato de que o HA-CMC não reduziu a formação de cicatriz intraneural poderia justificar a pobre recuperação morfológica e funcional dos animais tratados com HA-CMC e com a associação HA-CMC + AL. Entretanto, fatores relacionados à regeneração nervosa após neurotmesa merecem consideração, como por exemplo, a necessidade dos axônios em regeneração atravessarem uma primeira cicatriz no local da conexão cirúrgica entre o coto proximal e o enxerto e, ao percorrer os tubos endoneurais no enxerto, atravessarem uma segunda cicatriz no local de conexão entre o enxerto e o coto nervoso distal. A

presença de cicatriz, portanto, atuaria como uma dupla barreira mecânica ao avanço dos brotos axonais na condição de autoenxerto de nervo.

Ainda é importante considerar que, quando os tubos endoneurais são interrompidos, como é o caso da neurotmese, os axônios em regeneração não estão mais confinados às suas bainhas originais e podem entrar no tecido adjacente ou em tubos endoneurais inapropriados, não conseguindo reinervar os seus próprios órgãos alvo. A consequência disso é uma pobre recuperação funcional, que geralmente é proporcional à gravidade da lesão (BURNETT; ZAGER, 2004). Portanto, aqueles axônios que conseguem atravessar o local da sutura, avançar no interior do enxerto e alcançar o coto nervoso distal, ainda podem enfrentar diversas barreiras antes de reinervar seus alvos.

Griffin et al. (2014) destacam as limitações para uma recuperação bem sucedida após neurotmese seguida de reparo cirúrgico, quais sejam: velocidade de crescimento axonal, que segundo Lundborg (1987), em animais submetidos a neurotmese é de 2,0 a 3,5 mm/dia e na axionotmese é de 3,0 a 4,5 mm/dia, enquanto em humanos essa taxa de crescimento não é linear, mas estima-se que seja de aproximadamente 1 a 2 mm/dia; necessidade dos axônios atravessarem o local de coaptação cirúrgica, o que pode impedi-los de povoar completamente o coto nervoso distal (McDONALD et al., 2006); mal alinhamento dos axônios motores e sensitivos, ou seja, se os axônios motores entrarem erroneamente nos órgãos alvo sensoriais, são "suprimidos" em um processo chamado reinervação motora preferencial (AL-MAJED et al., 2000; BRUSHART et al., 1998; MADISON et al., 1999); axônios motores podem reinervar músculos inapropriados (IJKEMA-PAASSEN; MEEK; GRAMSBERGEN, 2002); e atrofia pós desnervação dos músculos alvo após

longo período de inatividade (EGGERS et al., 2010). Além disso, Ygge (1989) demonstrou que após transecção distal do nervo isquiático de ratos, como realizado neste estudo, ocorre perda de 7% dos neurônios inferiores, o que também limita a recuperação funcional.

O HA-CMC estimula a produção da IL-1 (HIRO et al., 1986). Segundo Argilés et al. (2003), as citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$  e IL-1) exercem um papel relevante na indução e promoção de caquexia, promovendo perda de peso, quebra de proteína do músculo esquelético e de gordura, além de elevar o gasto energético em animais e pacientes. Esse quadro poderia justificar a perda de massa do músculo sóleo nos animais tratados com HA-CMC neste estudo.

Shinohara et al. (1990) destacam, ainda, que apesar de todos os mecanismos intrincados que ocorrem durante o processo de regeneração nervosa periférica, a marcação retrógrada de neurônios em regeneração apontou que até 51% das fibras nervosas formam conexões inapropriadas após lesão nervosa significativa em embriões humanos.

Portanto, é possível que diversos destes fatores tenham contribuído para os resultados obtidos neste estudo, havendo necessidade de investigar novas alternativas com potencial de combater os fatores que comprometem uma boa recuperação após neurotinese.

Barreiros et al. (2014) aplicaram hidrogel de ácido HA de maneira intraoperatória no local do esmagamento do nervo isquiático de ratos e avaliaram o diâmetro das fibras nervosas regeneradas após 4 e 8 semanas da lesão. Nos dois períodos avaliados o diâmetro das fibras nervosas foi

significativamente maior no grupo submetido a tratamento com HA que no grupo não tratado, entretanto, os valores controle não foram alcançados.

O que diferencia o estudo de Barreiros et al. (2014) do presente estudo é o tipo de lesão e a não associação entre HA e CMC. É possível que a recuperação morfológica do nervo tenha sido bem sucedida por se tratar de axoniotmese, pois segundo Maggi, Lowe e Mackinnon (2003), neste tipo de lesão os envoltórios conjuntivos do nervo são preservados e os axônios regeneram em ordem anatômica, no interior dos tubos endoneurais originais.

Bontioti, Kanje e Dahlin (2003) correlacionaram o grau de crescimento e direcionamento axonal, avaliado por imunocitoquímica de neurofilamentos, à recuperação da função da marcha nos membros escapulares de ratos após axoniotmese e neurotmese. Observaram que não houve mau direcionamento do crescimento axonal na axoniotmese, enquanto muitas fibras estavam mal direcionadas após neurotmese (sutura direta dos cotos) e um número ainda maior de fibras estava mal direcionada após autoenxerto de nervo e citam que os resultados coincidem com os alcançados por Bodine-Fowler et al., 1997; Lundborg, 2000; Valero-Cabre e Navarro, 2001, que utilizaram o modelo do nervo isquiático.

Além disso, na axoniotmese, a regeneração nervosa é mais rápida, sendo que os axônios podem atravessar o segmento de lesão em 8 a 15 dias e regenerar ao longo do segmento distal do nervo a uma taxa de 1 a 5 mm/dia (SUNDERLAND, 1968), enquanto na neurotmese essa taxa de regeneração é mais lenta (1 mm/dia) e pode levar meses ou anos para alcançar os músculos alvo, dependendo da distância a ser alcançada (GAGLIARDO et al., 2015).

Apesar de haver relatos de que o ácido HA e seus derivados pode promover regeneração de nervos através do realinhamento da matriz de fibrina e de que pode fornecer um ambiente adequado para o crescimento axonal, assim como de que a associação entre o HA e CMC (HA-CMC) é efetivo para promover regeneração nervosa periférica (ADANALI et al., 2003; PARK et al., 2011b), também há relato de que o HA-CMC inibe o crescimento axonal quando colocado em contato direto com os axônios em um local de lesão, quando os cotos nervosos proximal e distal são colocados no interior de um tubo de silicone preenchido com HA-CMC (AGENOR et al., 2017).

Neste estudo, a inibição do crescimento axonal na presença de HA-CMC em contato direto com o nervo não ocorreu, pois o número de axônios regenerados nos grupos LH e LLH, bem como suas características morfométricas não diferiu dos demais grupos submetidos à lesão nervosa.

Agenor et al. (2017) avaliaram o efeito do HA-CMC na forma de membrana (Seprafilm) como limitante do crescimento axonal. Após secção e sutura epineural (sutura direta dos cotos), envolveram o nervo isquiático de ratos, incluindo o local da sutura, com uma membrana de HA-CMC. Após 28 dias, não houve diferença no número de axônios mielínicos ou em qualquer medida qualitativa de regeneração nervosa em relação ao grupo de animais que sofreu lesão nervosa e não recebeu qualquer tratamento. Eles concluíram que quando a membrana de HA-CMC era colocada envolvendo o nervo reparado por sutura, não havia qualquer efeito tóxico sobre o nervo. Além disso, se o nervo for realinhado, como ocorre numa sutura epineural, pouco ou nenhum efeito inibitório sobre a regeneração axonal é observado.

Considerando o uso do AL no tratamento da lesão nervosa periférica em ratos, Demir et al. (2014) apontam que o AL acelera a recuperação morfológica e funcional após axoniotmese. Os autores atribuem este resultado aos efeitos anti-inflamatório e anti-apoptótico do AL. No presente estudo a lesão realizada foi a neurotmese e, por este motivo, acredita-se que os resultados obtidos nas variáveis morfológicas e funcionais tenham apresentado valores aquém dos níveis de normalidade.

Com relação à perda de massa no músculo sóleo, que foi comum após a lesão nervosa, pois reflete a desnervação, torna-se importante considerar a ação da AMPK e da mTOR (proteína quinase alvo da rapamicina em mamíferos).

A AMPK é uma enzima que induz uma cascata de eventos intracelulares em resposta à mudança da carga energética celular (JACOB et al., 1999, KONRAD et al., 1999), funcionando como um indicador de combustível intracelular, sendo ativado por uma queda na relação da adenosina trifosfato e adenosina monofosfato (ATP/AMP) (HARDIE; SAKAMOTO, 2006), mecanismo pelo qual a AMPK é ativada e, conseqüentemente, estimula a absorção de glicose, a oxidação de ácidos graxos e a biogênese mitocondrial no músculo esquelético, aumentando a expressão do GLUT-4 (transportador de glicose do tipo 4) e PGC-1 (co-ativador 1 do receptor ativado por proliferador de peroxissoma gama) (JESSEN et al., 2003; WINDER; HARDIE, 1999; ZONG et al., 2002).

A mTOR é uma via de sinalização que integra nutriente (leucina), hormônios (insulina; *insulin-like growth factor-1*, IGF-1) e estado energético ATP e GTP (guanosina tri-fosfato) (PRUZNAK et al., 2008), onde a AMPK é um

regulador negativo do mTORC1 (complexo 1 da proteína quinase alvo da rapamicina em mamíferos), reduzindo a síntese proteica muscular em condições de estresse energético, como hipóxia, exercício de alta intensidade ou glicopenia celular (HARDIE; SAKAMOTO, 2006), Minokoshi et al. (2002) consideram como papel fundamental nesse processo a relação entre ativação da via da AMPK e inibição da via da mTOR, uma vez que o aumento da atividade da AMPK estimula as concentrações de leptina e adiponectina na corrente sanguínea a fim de aumentarem vias catabólicas, como oxidação de ácidos graxos. Por outro lado, no hipotálamo, a adiponectina em conjunto com a leptina e insulina, age diminuindo a atividade da AMPK, e ativando neuropeptídeos hipotalâmicos responsáveis pela diminuição da fome (Unger, 2003), reduzindo a ingesta alimentar e reduzindo proteínas, o que possivelmente motivou a perda de massa do músculo sóleo dos animais dos grupos submetidos à lesão do nervo isquiático e que receberam tratamento com AL neste estudo.

A lesão nervosa periférica gera estimulação do TNF- $\alpha$ , iniciando uma sinalização em cascata, levando ao aumento no fator nuclear kappa B (NF -  $\kappa$ B), o qual regula a expressão de MMP-9 (BOND et al., 2001; RIBEIRO et al., 1996). Shubayev e Myers (2000) observaram que 3 horas após uma lesão no nervo periférico, o TNF- $\alpha$  passa a desempenhar uma ação chave na indução do aumento da MMP-9 no tecido nervoso, onde esta regula a ação de citocinas inflamatórias.

Segundo Kim et al. (2007) o ácido alfa-lipóico inibe a matriz MMP-9 e a supressão da via do NF- $\kappa$ B sob condições de níveis elevados de TNF- $\alpha$  e glicose. A inibição da matriz MMP-9 promovida pelo AL gera uma indução

seletiva de MMP-2 (ALLEVA et al., 2008), onde esta parece ter um desempenho regulatório, devido a sua correlação positiva com citocinas anti-inflamatórias e negativa com citocinas inflamatórias (FARES et al., 2013). No presente estudo a administração do AL não apresentou ação reguladora positiva frente ao processo inflamatório gerado pela lesão nervosa, apontando a necessidade em se pesquisar os efeitos do AL em doses maiores e por períodos mais prolongados.

Mitsui et al. (1999) submeteram ratos à isquemia do nervo isquiático durante 3 a 5 horas, seguida de reperfusão e administraram uma dose de 100mg/Kg de ácido alfa-lipóico, observando efeitos neuroprotetores nos nervos submetidos à isquemia por 3 horas, mas não naqueles cujo aporte sanguíneo foi interrompido por 5 horas. Eles justificaram que a reperfusão gera um aumento abrupto de radicais livres no período de reoxigenação do tecido submetido à isquemia moderada, onde durante a reperfusão é possível observar o máximo de dano tecidual, inicialmente atribuído à produção de radicais livres de oxigênio como consequência da lesão.

Antioxidantes como o AL desempenham um importante papel na prevenção e tratamento de lesão por radicais livres e dano oxidativo (FREISLEBEN, 2000; GILGUN-SHERKI; MELAMED; OFFEN, 2001).

Neste estudo, a dose de AL utilizada foi 100 mg/Kg, tomou por base os resultados de Senoglu et al. (2009). Eles administraram 100 mg/Kg por via intraperitoneal, 24 horas e, novamente, 1 hora antes da axoniotmese no nervo isquiático de ratos e observaram que o AL teve efeito antioxidante sobre o nervo lesado. Entretanto, não realizaram uma análise morfométrica do nervo, o

que impossibilita uma análise comparativa com os resultados do presente estudo. Além disso, neste estudo o tipo de lesão foi a neurotmease.

Do ponto de vista do tempo de sobrevivência dos animais, a literatura aponta que o crescimento axonal de ratos após neurotmease se dá numa velocidade média de 2 a 3 mm por dia (FAWCETT; KEYNES, 1986; NAVARRO; VIVÓ; VALERO-CABRÈ, 2007) e que a sobrevivência dos animais por períodos mais longos poderia ser prejudicada pela administração diária de ácido lipóico, que poderia trazer efeitos adversos aos animais, como alterações metabólicas e funcionais das enzimas hepáticas. Portanto, optou-se pela adoção de um período de 8 semanas de sobrevivência, uma vez que, axônios mielínicos estariam presentes no nervo distal a partir da 5ª ou 6ª semana após do procedimento cirúrgico (FIELDS; ELLISMAN, 1986; LE BEAU; ELISMAN; POWELL, 1988).

Um dos mecanismos pelos quais o AL favorece a neuroregeneração é pela inibição da degeneração retrógrada após lesão nervosa (ZIEGLER, 2004). Como o efeito do AL sobre a regeneração nervosa não foi evidenciado neste estudo, sugere-se a necessidade de investigar outras variáveis, como por exemplo, uma variação da dose utilizada, os seus efeitos frente ao equilíbrio das vias AMPK e mTOR, ou mesmo a administração de AL prévia à lesão.

Na clínica, o uso do ácido alfa-lipóico de forma prévia a uma lesão traumática de nervo, que acontece de forma abrupta e inesperada, não se justifica, porém, uma adição nutricional de tal substância no plano alimentar global possibilitaria ao indivíduo uma melhor recuperação no caso de lesão nervosa (GHIBU et al., 2009).

A avaliação funcional em animais submetidos a lesões nervosas periféricas e que estão em processo de regeneração, é um aspecto desafiador,

pois o nervo é capaz de regenerar de forma espontânea, sem qualquer tipo de tratamento, mas alcançar uma recuperação funcional adequada após reparo microcirúrgico do nervo quase nunca é possível (BATTISTON et al., 2009; SUNDERLAND, 1968). Este aspecto é especialmente importante em lesões que afetam o membro superior em humanos. Desta forma, destaca-se a importância da avaliação morfométrica e funcional do nervo regenerado.

Di Gerônimo et al. (2009) avaliaram 112 indivíduos com síndrome do túnel do carpo, tratados com doses do ácido alfa-lipóico e com uma preparação de multivitamínico B. Observaram que o grupo tratado com ácido alfa-lipóico apresentou melhora significativa em comparação ao grupo tratado com multivitamínico, tanto dos sintomas quanto do déficit funcional.

Segundo Burnett e Zager (2004), para recuperar a função do membro desnervado, não é necessária uma completa recuperação da arquitetura do nervo, entretanto, uma recuperação morfológica bem sucedida, está relacionada a uma melhor recuperação funcional.

Por este motivo, este estudo considerou uma análise morfológica e funcional e, ao final de 8 semanas, nenhum grupo desnervado alcançou recuperação funcional, pois os valores de IFC variaram entre -69 e -83 quando, de acordo com De Medinaceli, Freed e Wyatt (1982), o valor de normalidade da função encontra-se entre 0 e -20, indicando que a recuperação morfológica do nervo ainda está em processo de desenvolvimento.

Demir et al. (2014) avaliaram o efeito neuroprotetor do ácido lipóico administrado por via orogástrica (doses de 25 e 50 mg/kg), em ratos submetidos a axoniotmese no nervo isquiático e observaram que após 4 semanas de tratamento o padrão funcional da marcha dos ratos que receberam

AL foi melhor que daqueles que não receberam tratamento. Além disso, o diâmetro dos axônios e o diâmetro das fibras nervosas foi maior nos ratos que receberam tratamento com AL. Este é outro indicador da influência do AL na aceleração da regeneração nervosa e recuperação funcional, porém, o tipo de lesão é axionotmese, que difere da neurotmese realizada neste estudo.

Os resultados apresentados na literatura reforçam a influência tanto do ácido alfa lipóico, quanto do ácido hialurônico no aprimoramento do processo de regeneração axonal e recuperação funcional. Entretanto, os autores citados utilizaram técnicas de lesão menos agressivas que a utilizada no presente estudo. Há possibilidade que o tecido nervoso possa contribuir com a liberação de citocinas anti-inflamatórias para a recuperação do nervo lesado, sendo esta resposta dependente da gravidade da lesão (SACERDOTE et al., 2013; WANG et al., 2012).

É possível que o tipo de lesão utilizada no presente estudo (neurotmese seguida por autoenxerto de nervo) tenha exercido uma influência direta nos resultados, já que nesses casos, podem acontecer inúmeras intercorrências, como a presença de cicatriz em ambos os locais da sutura, um possível crescimento axonal funcionalmente inadequado no interior de tubos endoneurais (BURNETT; ZAGER, 2004), o período do tratamento (8 semanas), sendo recomendável uma análise com períodos maiores de sobrevivência afim de observar os efeitos do HA-CMC e do AL, de maneira isolado ou associada e sua influência na morfologia e do nervo lesado, entre outras possíveis variáveis.

A recuperação em casos de axionotmese se dá em maior proporção, possivelmente pela presença de menor quantidade de cicatriz - que atua como

um obstáculo físico - uma vez que não ocorre uma secção no epineuro, não se fazendo necessário uma reconexão cirúrgica dos cotos nervosos. Além disso, após a desnervação ocorre aumento do tecido conjuntivo e atrofia do órgão desnervado, variáveis essas inversamente proporcionais à recuperação funcional. Como a recuperação da lesão após axoniotmese no rato ocorre num período de 21 a 28 dias após a lesão (CARMIGNOTO et al., 1983; GORIO et al., 1983) e após neurotmese a recuperação inicia de 50 a 60 dias após a lesão (SANTO NETO et al., 2004), o prognóstico de recuperação funcional na neurotmese é comprometido pela desnervação em si e também pela atrofia muscular e proliferação conjuntiva nos músculos desnervados, o que pode justificar os resultados deste estudo.

O número de axônios no grupo controle estava dentro dos parâmetros de normalidade, enquanto nos grupos lesados foram maiores que nos demais grupos, não diferindo entre si. O diâmetro dos axônios, diâmetro das fibras nervosas e espessura das bainhas de mielina acompanharam o padrão de normalidade nos grupos controle e grupos não submetidos à lesão nervosa, estando reduzidos em todos os grupos lesados.

A razão G é a variável correspondente à velocidade de condução do impulso nervoso, e o valor padrão de normalidade da velocidade de condução nervosa fica entre 0,5 e 0,7 (ANSSELIN; FINK; DAVEY, 1997). Neste estudo, os valores de razão G ficaram dentro da normalidade, demonstrando uma proporção adequada entre diâmetro do axônio e diâmetro da fibra nervosa, sugerindo que, em todos os grupos, a velocidade de condução nervosa teria sido recuperada.

Atkins et al. (2006) observaram que existe uma relação inversamente proporcional entre quantidade de tecido cicatricial presente na área de reparo cirúrgico, com a extensão da regeneração nervosa. Nesse sentido, é possível que a presença de tecido cicatricial intraneural consequente ao processo de reparo da lesão nervosa, além da cicatriz extraneural nos locais de sutura epineural no presente estudo, tenha limitado sobremaneira os efeitos do ácido hialurônico e ácido alfa-lipóico.

Outro aspecto a ser considerado é que, no caso de neurotmeze acompanhada de autoenxerto de nervo, como ocorreu neste estudo, a manipulação cirúrgica do nervo e o número de suturas epineurais são maiores que na neurotmeze seguida de sutura direta dos cotos, sem interposição de enxerto, o que se constitui num fator adicional que limita os efeitos do ácido hialurônico e do ácido alfa-lipóico e a recuperação morfológica e funcional do nervo.

Segundo Carter et al. (1998), a proliferação de tecido conjuntivo intersticial dificulta a troca de substâncias entre as fibras musculares e o leito vascular, atuando como uma barreira mecânica ao crescimento axonal e à difusão de fatores de crescimento nervoso durante a reinervação muscular. Apesar de não ter sido realizada uma análise morfológica dos músculos desnervados neste estudo, a literatura aponta que as alterações musculares comuns após desnervação pode contribuir para prejudicar a recuperação funcional.

Neste estudo, os grupos LL, LH e LLH apresentaram no segmento distal um número de axônios superior ao valor encontrado no grupo controle. Esse comportamento foi descrito por Lundborg (2000), como consequência do

processo de regeneração do nervo periférico, onde cada axônio da porção proximal origina vários brotos que atravessam a área da lesão e crescem no interior de tubos de células de Schwann no enxerto e nervo distal. Por isso, o número de axônios regenerados nos grupos submetidos à lesão nervosa quase duplicaram em relação ao grupo controle.

Quanto às características morfométricas dos axônios regenerados, nota-se que apesar do número de axônios ser maior que no controle, a maturação das fibras regeneradas não alcançou valores próximos à normalidade, o que reflete na ausência de recuperação funcional.

Da mesma forma, a massa do músculo sóleo reinervado não se recuperou, pois após longo período de inatividade devido à perda de função muscular causada pela desnervação, os músculos que os nervos em regeneração estão tentando reinervar sofreram atrofia por desnervação (EGGERS et al., 2010).

Desta forma, nota-se que os processos de regeneração nervosa e recuperação funcional são extremamente complexos e não dependem apenas da reconexão cirúrgica, mas de um alinhamento perfeito entre os fascículos da porção proximal com a porção distal do nervo, o que é mais difícil alcançar quando se utiliza autoenxerto de nervo, do controle de fatores relacionados à redução da cicatrização decorrente de procedimentos cirúrgicos no nervo, ou do uso de fármacos que favoreçam a regeneração. Diversos outros fatores ainda necessitam de controle para que uma boa recuperação seja alcançada, especialmente nos casos de neurotmesa.

Os resultados deste estudo sugerem a importância de um alinhamento perfeito entre os fascículos da porção proximal com a porção distal do nervo lesado, o que é mais difícil alcançar quando se utiliza autoenxerto de nervo.

## **6. LIMITAÇÕES DO ESTUDO**

Como limitações do estudo consideram-se: 1 - o fato de não terem sido administradas diferentes doses de ácido alfa-lipóico, pois isso ampliaria excessivamente o número de animais no estudo; 2 - a necessidade de se coletar a área do nervo correspondente ao local da sutura, afim de verificar o efeito real do ácido hialurônico sobre a quantidade de tecido cicatricial e aderência pós cirúrgica; 3 - a não utilização de técnicas específicas para coloração do tecido conjuntivo.

## 7. CONCLUSÃO

A aplicação intraoperatória de HA-CMC ou a administração oral de AL, assim como a associação de ambos tratamentos em ratos submetidos a autoenxerto de nervo, não favoreceu a regeneração nervosa e recuperação funcional após 56 dias de tratamento.

Após neurotmeze seguida de autoenxerto de nervo o tratamento com HA-CMC ou AL facilitou a atrofia do músculo desnervado, sugerindo ser este um tratamento inadequado, pois causaria prejuízo ao processo de recuperação funcional.

Considera-se que o processo de regeneração nervosa e recuperação funcional em lesões nervosas graves, que exigem autoenxertos, seja altamente complexo e não dependa apenas da reconexão dos cotos nervosos, do controle da cicatrização no local da sutura ou de fármacos que favoreçam a regeneração. Os resultados deste estudo apontam para a necessidade de novas investigações que contribuam para o equacionamento deste problema.

## REFERÊNCIAS

ADANALI, G.; VERDI, M.; TUNCEL, A.; ERDOGAN, B.; KARGI, E. Effects of hyaluronic acid-carboxymethylcellulose membrane on extraneural adhesion formation and peripheral nerve regeneration. **Journal of Reconstructive Microsurgery**, v. 19, n. 1, p. 29-36, 2003.

AGENOR, A.; DVORACEK, L.; LEU, A. L.; HUNTER, D. A.; NEWTON, P.; YAN, Y.; JOHNSON, P. J.; MACKINNON, S. E.; MOORE, A. M.; WOOD, M. D. Hyaluronic acid/carboxymethylcellulose directly applied to transected nerve decreases axonal outgrowth. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 105, n. 3, p. 568-574, 2017.

AL-MAJED, A. A.; NEUMANN, C. M.; BRUSHART, T. M.; GORDON, T. Brief electrical stimulation promotes the speed and accuracy of motor axonal regeneration. **Journal of Neuroscience**, v. 20, n. 7, p. 2602-2608, 2000.

ALLEVA, R.; TOMASETTI, M.; SARTINI, D.; EMANUELLI, M.; NASOLE, E.; DI DONATO, F.; BORGHI, B.; SANTARELLI, L.; NEUZIL, J.  $\alpha$ -Lipoic acid modulates extracellular matrix and angiogenesis gene expression in non-healing wounds treated with hyperbaric oxygen therapy. **Molecular Medicine**, v. 14, n. 3-4, p. 175, 2008.

AMADO, S.; RODRIGUES, J. M.; LUÍS, A. L.; ARMANDA-DA-SILVA, P. A.S.; VIEIRA, M.; GARTNER, A.; SIMÕES, M. J.; VELOSO, A. P.; FORNARO, M.; RAIMONDO, S.; VAREJÃO, A. S. P.; GEUNA, S.; MAURÍCIO, A. C. Effects of collagen membranes enriched with in vitro-differentiated N1E-115 cells on rat sciatic nerve regeneration after end-to-end repair. **Journal of Neuro Engineering and Rehabilitation**, v. 7, n. 1, p. 7, 2010.

\* Baseadas na norma NBR 6023, de 2002, da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT).

ANSSELIN, A. D.; FINK, T.; DAVEY, D. F. Peripheral nerve regeneration through nerve guides seeded with adult Schwann cells. **Neuropathology and Applied Neurobiology**, v. 23, n. 5, p. 387-398, 1997.

ARGILÉS, J. M.; MOORE-CARRASCO, R.; FUSTER, G.; BUSQUETS, S.; LÓPEZ-SORIANO, F. J. Cancer cachexia: the molecular mechanisms. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 35, n. 4, p. 405-409, 2003.

ATKINS, S.; SMITH, K. G.; LOESCHER, A. R.; BOISSONADE, F. M.; O'KANE, S.; FERGUSON, M. W. J.; ROBINSON, P. P. Scarring impedes regeneration at sites of peripheral nerve repair. **Neuro Report**, v. 17, n. 12, p. 1245-1249, 2006.

AZIZI, S.; HESHMATIAN, B.; AMINI, K.; RAISI, A.; AZIMZADEH, M. Alpha-lipoic acid loaded in chitosan conduit enhances sciatic nerve regeneration in rat. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**, v. 18, n. 3, p. 228-233, 2015.

BAIN, J. R.; MACKINNON, S. E.; HUNTER, D. A. Functional evaluation of complete sciatic, peroneal, and posterior tibial nerve lesions in the rat. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 83, n. 1, p. 129-136, 1989.

BARREIROS, V. C. P.; DIAS, F. J.; IYOMASA, M. M.; COUTINHO-NETTO, J.; SOUSA, L. G.; FAZAN, V. P. S.; ANTUNES, R. S.; WATANABE, L.; ISSA, J. P. M. Morphological and morphometric analyses of crushed sciatic nerves after application of a purified protein from natural latex and hyaluronic acid hydrogel. **Growth Factors**, v. 32, n. 5, p. 164-170, 2014.

BATTISTON, B.; RAIMONDO, S.; TOS, P.; GAIDANO, V.; AUDISIO, C.; SCEVOLA, A.; PERROTEAU, I.; GEUNA, S. Tissue engineering of peripheral nerves. **International Review of Neurobiology**, v. 87, p. 227-249, 2009.

\* Baseadas na norma NBR 6023, de 2002, da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT).

BECK, D. E.; COHEN, Z.; FLESHMAN, J. W.; KAUFMAN, H. S.; GOOR, H. V.; WOLFF, B. G. A prospective, randomized, multicenter, controlled study of the safety of Seprafilm® adhesion barrier in abdominopelvic surgery of the intestine. **Diseases of The Colon & Rectum**, v. 46, n. 10, p. 1310-1319, 2003.

BOCQUET, J.; DAIREAUX, M.; LANGRIS, M.; JOUIS, V.; PUJOL, J. P.; BELIARD, R.; LOYAU, G. Effect of a interleukin-1 like factor (mononuclear cell factor) on proteoglycan synthesis in cultured human articular chondrocytes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 134, n. 2, p. 539-549, 1986.

BODINE-FOWLER, S. C.; MEYER, R. S.; MOSKOVITZ, A.; ABRAMS, R.; BOTTE, M. J. Inaccurate projection of rat soleus motoneurons: a comparison of nerve repair techniques. **Muscle & Nerve**, v. 20, n. 1, p. 29-37, 1997.

BOND, M.; CHASE, A. J.; BAKER, A. H.; NEWBY, A. C. Inhibition of transcription factor NF-kappa B reduces matrix metalloproteinase -1, -2 and -9 production by vascular smooth muscle cells. **Cardiovasc Res**, v. 50, n. 3, p. 556-565, 2001.

BONTIOTI, E. N.; KANJE, M.; DAHLIN, L. B. Regeneration and functional recovery in the upper extremity of rats after various types of nerve injuries. **Journal of the Peripheral Nervous System**, v. 8, n. 3, p. 159-168, 2003.

BRUSHART, T. M.; GERBER, J.; KESSENS, P.; CHEN, Y.; ROYALL, R. M. Contributions of pathway and neuron to preferential motor reinnervation. **Journal of Neuroscience**, v. 18, n. 21, p. 8674-8681, 1998.

BUCHAIM, R. L.; ANDREO, J. C.; BARRAVIERA; B.; FERREIRA JUNIOR, R. S.; BUCHAIM, D. V.; ROSA JUNIOR, G. M.; OLIVEIRA, A. L. R.; RODRIGUES, A. C. Effect of low-level laser therapy (LLLT) on peripheral nerve regeneration

\* Baseadas na norma NBR 6023, de 2002, da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT).

using fibrin glue derived from snake venom. **Injury**, v. 46, n. 4, p. 655-660, 2015.

BURNETT, M. G.; ZAGER, E. L. Pathophysiology of peripheral nerve injury: a brief review. **Neurosurgical Focus**, v. 16, n. 5, p. 1-7, 2004.

CÂMARA, C. N. S.; BRITO, M. V. H.; SILVEIRA, E. L.; SILVA, D. S. G.; SIMÕES, V. R. F.; PONTES, R. W. F. Histological analysis of low-intensity laser therapy effects in peripheral nerve regeneration in Wistar rats. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 26, n. 1, p. 12-18, 2011.

CÂMARA-LEMARROY, C. R.; GUZMÁN-DE LA GARZA, F. J.; FERNÁNDEZ-GARZA, N. E. Molecular inflammatory mediators in peripheral nerve degeneration and regeneration. **Neuroimmunomodulation**, v. 17, n. 5, p. 314-324, 2010.

CARTER, D. R.; BEAUPRÉ, G. S.; GIORI, N. J.; HELMS, J. A. Mechanobiology of skeletal regeneration. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 355, p. S41-S55, 1998.

CARMIGNOTO, G.; FINESSO, M.; SILIPRANDI, R.; GORIO, A. Muscle reinnervation—I. Restoration of transmitter release mechanisms. **Neuroscience**, v. 8, n. 3, p. 393-401, 1983.

CHEN, Z.; YU, W.; STRICKLAND, S. Peripheral regeneration. **Annu. Rev. Neurosci**, v. 30, p. 209-233, 2007.

COLEN, K. L.; CHOI, M.; CHIU, D. T. W. Nerve grafts and conduits. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 124, n. 6, p. 386e-394e, 2009.

DAYER, J.; GRAHAM, R.; RUSSEL, G.; KRANE, S. M. Collagenase production by rheumatoid synovial cells: stimulation by a human lymphocyte factor. **Science**, v. 195, n. 4274, p. 181-183, 1977.

\* Baseadas na norma NBR 6023, de 2002, da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT).

DE MEDINACELI, L.; FREED, W. J.; WYATT, R. J. An index of the functional condition of rat sciatic nerve based on measurements made from walking tracks. **Experimental Neurology**, v. 77, n. 3, p. 634-643, 1982.

DEMIR, R.; YAYLA, M.; AKPINAR, E.; CAKIR, M.; CALIKOGLU, C.; OZEL, L.; OZDEMIR, G.; MERCANTEPE, T. Protective effects of alpha-lipoic acid on experimental sciatic nerve crush injury in rats: assessed with functional, molecular and electromicroscopic analyses. **International Journal of Neuroscience**, v. 124, n. 12, p. 935-943, 2014.

DEUMENS, R.; BOZKURT, A.; MEEK, M. F.; MARCUS, M. A. E.; JOOSTEN, E. A. J.; WEIS, J.; BROOK, G. A. Repairing injured peripheral nerves: bridging the gap. **Progress in Neurobiology**, v. 92, n. 3, p. 245-276, 2010.

DI GERONIMO, G.; CACCESE, A. F.; CARUSO, L.; SOLDATI, A.; PASSARETTI, U. Treatment of carpal tunnel syndrome with alpha-lipoic acid. **Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.**, v. 13, n. 2, p. 133-139, 2009.

DINARELLO, C. A.; WOLFF, S. M. Molecular basis of fever in humans. **The American Journal of Medicine**, v. 72, n. 5, p. 799-819, 1982.

DING, F.; WU, J.; YANG, Y.; HU, W.; ZHU, Q.; TANG, X.; LIU, J.; GU, X. Rapid repair and regeneration of damaged rabbit sciatic nerves by tissue-engineered scaffold made from nano-silver and collagen type I. **Injury**, v. 41, n. 5, p. 522-527, 2010.

EGGERS, R.; TANNEMAAT, M. R.; EHLERT, E. M.; VERHAAGEN, J. A spatio-temporal analysis of motoneuron survival, axonal regeneration and neurotrophic factor expression after lumbar ventral root avulsion and implantation. **Experimental Neurology**, v. 223, n. 1, p. 207-220, 2010.

\* Baseadas na norma NBR 6023, de 2002, da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT).

EVANS, G. R. D. Peripheral nerve injury: a review and approach to tissue engineered constructs. **The Anatomical Record**, v. 263, n. 4, p. 396-404, 2001.

FARES, R. C. G.; GOMES, J. A. S.; GARZONI, L. R.; WAGHABI, M. C.; SARAIVA, R. M.; MEDEIROS, N. I.; OLIVEIRA-PRADO, R.; SANGENIS, L. H. C.; CHAMBELA, M. C.; ARAÚJO, F. F.; TEXEIRA-CARVALHO, A.; DAMÁSIO, M. P.; VALENTE, V. A.; FERREIRA, K. S.; SOUSA, G. R.; ROCHA, M. O. C.; CORREA-OLIVEIRA, R. Matrix metalloproteinases 2 and 9 are differentially expressed in patients with indeterminate and cardiac clinical forms of Chagas disease. **Infection and Immunity**, v. 81, n. 10, p. 3600-3608, 2013.

FAWCETT, J. W.; KEYNES, R. J. Muscle basal lamina: a new graft material for peripheral nerve repair. **Journal of Neurosurgery**, v. 65, n. 3, p. 354-363, 1986.

FIELDS, R. D.; ELLISMAN, M. H. Axons regenerated through silicone tube splices: I. Conduction properties. **Experimental Neurology**, v. 92, n. 1, p. 48-60, 1986.

FREISLEBEN, H. Lipoic acid reduces ischemia-reperfusion injury in animal models. **Toxicology**, v. 148, n. 2, p. 159-171, 2000.

GAGLIARDO, A.; TOIA, F.; MAGGI, F.; MARIOLO, A. V.; CILINO, M.; MOSCHELLA, F. Clinical neurophysiology and imaging of nerve injuries: preoperative diagnostic work-up and postoperative monitoring. **Plastic and Aesthetic Research**, v. 2, n. 4, p. 149-155, 2015.

GAGO, L. A.; SAED, G. M.; CHAUHAN, S.; ELHAMMADY, E. F.; DIAMOND, M. P. Seprafilm (modified hyaluronic acid and carboxymethylcellulose) acts as a physical barrier. **Fertility and Sterility**, v. 80, n. 3, p. 612-616, 2003.

\* Baseadas na norma NBR 6023, de 2002, da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT).

GERY, I.; GERSHON, R. K.; WAKSMAN, B. H. Potentiation of the T-lymphocyte response to mitogens. **Journal of Experimental Medicine**, v. 136, n. 1, p. 128-142, 1972.

GEUNA, S.; RAIMONDO, S.; RONCHI, G.; DI SCIPIO, F.; TOS, P.; CZAJA, K.; FORNARO, M. Histology of the peripheral nerve and changes occurring during nerve regeneration. **International Review of Neurobiology**, v. 87, p. 27-46, 2009.

GEUNA, S. The sciatic nerve injury model in pre-clinical research. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 243, p. 39-46, 2015.

GEUNA, S.; RAIMONDO, S.; FREGNAN, F.; HAASSTERT-TALINI, K.; GROTHE, C. In vitro models for peripheral nerve regeneration. **European Journal of Neuroscience**, v. 43, n. 3, p. 287-296, 2016.

GHIBU, S.; RICHARD, C.; VERGELY, C.; ZELLER, M.; COTTIN, Y.; ROCHETTE, L. Antioxidant properties of an endogenous thiol: alpha-lipoic acid, useful in the prevention of cardiovascular diseases. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 54, n. 5, p. 391-398, 2009.

GIGO-BENATO, D.; RUSSO, T. L.; TANAKA, E. H.; ASSIS, L.; SALVINI, T. F.; PARIZOTTO, N. A. Effects of 660 and 780 nm low-level laser therapy on neuromuscular recovery after crush injury in rat sciatic nerve. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 42, n. 9, p. 833-842, 2010.

GIGO-BENATO, D.; GEUNA, S.; ROCHKIND, S. Phototherapy for enhancing peripheral nerve repair: a review of the literature. **Muscle & Nerve**, v. 31, n. 6, p. 694-701, 2005.

\* Baseadas na norma NBR 6023, de 2002, da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT).

GILGUN-SHERKI, Y.; MELAMED, E.; OFFEN, D. Oxidative stress induced-neurodegenerative diseases: the need for antioxidants that penetrate the blood brain barrier. **Neuropharmacology**, v. 40, n. 8, p. 959-975, 2001.

GOLDBERG, R. L.; TOOLE, B. P. Hyaluronate inhibition of cell proliferation. **Arthritis & Rheumatology**, v. 30, n. 7, p. 769-778, 1987.

GONZALEZ-PEREZ, F.; UDINA, E.; NAVARRO, X. Extracellular matrix components in peripheral nerve regeneration. **Int. Rev. Neurobiol.**, v. 108, p. 257-275, 2013.

GORIO, A.; CARMIGNOTO, G.; FINESSO, M.; POLATO, P.; NUNZI, M. G. Muscle reinnervation—II. Sprouting, synapse formation and repression. **Neuroscience**, v. 8, n. 3, p. 403-416, 1983.

GOWEN, M.; WOOD, D. D.; IHRIE, E. J.; MEATS, J. E.; GRAHAM, R.; RUSSEL, G. Stimulation by human interleukin 1 of cartilage breakdown and production of collagenase and proteoglycanase by human chondrocytes but not by human osteoblasts in vitro. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 797, n. 2, p. 186-193, 1984.

GRIFFIN, M. F. MALAHIAS, M.; HINDOCHA, S.; KHAN, W. S. Suppl 1: Peripheral Nerve Injury: Principles for Repair and Regeneration. **The Open Orthopaedics Journal**, v. 8, p. 199-203, 2014.

GRINSELL, D.; KEATING, C. P. Peripheral nerve reconstruction after injury: a review of clinical and experimental therapies. **BioMed Research International**, v. 2014, n. 698256, p.1-13, 2014.

GU, X.; DING, F.; YANG, Y.; LIU, J. Construction of tissue engineered nerve grafts and their application in peripheral nerve regeneration. **Progress in Neurobiology**, v. 93, n. 2, p. 204-230, 2011.

\* Baseadas na norma NBR 6023, de 2002, da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT).

HARDIE, D. G.; SAKAMOTO, K. AMPK: a key sensor of fuel and energy status in skeletal muscle. **Physiology**, v. 21, n. 1, p. 48-60, 2006.

HIRO, D.; ITO, A.; MATSUDA, K.; MORI, Y. Hyaluronic acid is an endogenous inducer of interleukin-1 production by human monocytes and rabbit macrophages. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 140, n. 2, p. 715-722, 1986.

IJKEMA-PAASSEN, J.; MEEK, M. F.; GRAMSBERGEN, A. Reinnervation of muscles after transection of the sciatic nerve in adult rats. **Muscle & Nerve**, v. 25, n. 6, p. 891-897, 2002.

IJKEMA-PAASSEN, J.; JANSEN, K.; GRAMSBERGEN, A.; MEEK, M. F. Transection of peripheral nerves, bridging strategies and effect evaluation. **Biomaterials**, v. 25, n. 9, p. 1583-1592, 2004.

IKEDA, K.; YAMAUCHI, D.; OSAMURA, N.; HAGIWARA, N.; TOMITA, K. Hyaluronic acid prevents peripheral nerve adhesion. **British Journal of Plastic Surgery**, v. 56, n. 4, p. 342-347, 2003.

ISIK, S.; OZTURK, S.; GURSES, S.; YETMEZ, M.; GULER, M. M.; SELMANPAKOGLU; GUNHAM, O. Prevention of restrictive adhesions in primary tendon repair by HA-membrane: experimental research in chickens. **British Journal of Plastic Surgery**, v. 52, n. 5, p. 373-379, 1999.

JACOB, S.; RUUS, P.; HERMANN, R.; TRITSCHLER, H. J.; MAERKER, E.; RENN, W.; AUGUSTIN, H. J.; DIETZE, G. J.; RETT, K. Oral administration of RAC- $\alpha$ -lipoic acid modulates insulin sensitivity in patients with type-2 diabetes mellitus: a placebo-controlled pilot trial. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 27, n. 3, p. 309-314, 1999.

\* Baseadas na norma NBR 6023, de 2002, da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT).

JESSEN, N.; POLD, R.; BUHL, E. S.; JENSEN, L. S.; SCHMITZ, O.; LUND, S. Effects of AICAR and exercise on insulin-stimulated glucose uptake, signaling, and GLUT-4 content in rat muscles. **Journal of Applied Physiology**, v. 94, n. 4, p. 1373-1379, 2003.

KALBERMATTEN, D. F.; PHIL, M.; PETTERSSON, J.; KINGHAM, P. J.; PIERER, G.; WIBERG, M.; TERENCEHI, G. New fibrin conduit for peripheral nerve repair. **Journal of Reconstructive Microsurgery**, v. 25, n. 1, p. 27-33, 2009.

KARNOVSKY, M. J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy, **journal of Cell Biology**, v. 27, n. 2, p. 1A-149A, 1965.

KIM, J. H.; LEE, J.; YOON, J.; CHANG, J. H.; BAE, J. H.; KIM, K. Antiadhesive effect of the mixed solution of sodium hyaluronate and sodium carboxymethylcellulose after endoscopic sinus surgery. **American Journal of Rhinology**, v. 21, n. 1, p. 95-99, 2007.

KONRAD, T.; VICINI, P.; KUSTERER, K.; HOFLICH, A.; ASSADKHANI, A. alpha-Lipoic acid treatment decreases serum lactate and pyruvate concentrations and improves glucose effectiveness in lean and obese patients with type 2 diabetes. **Diabetes Care**, v. 22, n. 2, p. 280-287, 1999.

KOOPMANS, G.; HASSE, B.; SINIS, N. The role of collagen in peripheral nerve repair. **International Review of Neurobiology**, v. 87, p. 363-379, 2009.

KOUYOUMDJIAN, J. A. Peripheral nerve injuries: a retrospective survey of 456 cases. **Muscle & Nerve**, v. 34, n. 6, p. 785-788, 2006.

\* Baseadas na norma NBR 6023, de 2002, da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT).

LE BEAU, J. M.; ELLISMAN, M. H.; POWELL, H. C. Ultrastructural and morphometric analysis of long-term peripheral nerve regeneration through silicone tubes. **Journal of Neurocytology**, v. 17, n. 2, p. 161-172, 1988.

LEE, S. K.; WOLFE, S. W. Peripheral nerve injury and repair. **Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons**, v. 8, n. 4, p. 243-252, 2000.

LEE, W. J.; SONG, K.; KOH, E. H.; WON, J. C.; KIM, H. S.; PARK, H.; KIM, M.; KIM, S.; LEE, K.; PARK, J.  $\alpha$ -Lipoic acid increases insulin sensitivity by activating AMPK in skeletal muscle. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 332, n. 3, p. 885-891, 2005.

LEW, D. H.; YOON, J. H.; HONG, J. W.; TARK, K. C.; Efficacy of antiadhesion barrier solution on periimplant capsule formation in a white rat model. **Annals of Plastic Surgery**, v. 65, n. 2, p. 254-258, 2010.

LI, X.; WANG, W.; WEI, G.; WANG, G.; ZHANG, W.; MA, X. Immunophilin FK506 loaded in chitosan guide promotes peripheral nerve regeneration. **Biotechnology Letters**, v. 32, n. 9, p. 1333-1337, 2010.

LIPSKY, P. E.; THOMPSON, P. A.; ROSENWASSER, L. J.; DINARELLO, C. A. The role of interleukin 1 in human B cell activation: inhibition of B cell proliferation and the generation of immunoglobulin-secreting cells by an antibody against human leukocytic pyrogen. **The Journal of Immunology**, v. 130, n. 6, p. 2708-2714, 1983.

LUNDBORG, G. Nerve regeneration and repair: A review. **Acta Orthopaedica Scandinavica**, v. 58, n. 2, p. 145-169, 1987.

LUNDBORG, G. A 25-year perspective of peripheral nerve surgery: evolving neuroscientific concepts and clinical significance. **The Journal of Hand Surgery**, v. 25, n. 3, p. 391-414, 2000.

\* Baseadas na norma NBR 6023, de 2002, da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT).

MACHADO, A. B. M. **Neuroanatomia Funcional**, 2 ed. São Paulo: Atheneu, p. 363, 2000.

MADISON, R. D.; ARCHIBALD, S. J.; LACIN, R.; KRARUP, C. Factors contributing to preferential motor reinnervation in the primate peripheral nervous system. **Journal of Neuroscience**, v. 19, n. 24, p. 11007-11016, 1999.

MAGGI, S. P.; LOWE, J. B.; MACKINNON, S. E. Pathophysiology of nerve injury. **Clinics in Plastic Surgery**, v. 30, n. 2, p. 109-126, 2003

MAGILL, C. K.; TUFFAHA, S. H.; YEE, A.; LUCIANO, J. P.; HUNTER, D. A.; MACKINNON, S. E.; BORSCHHEL, G. H. The short-and long-term effects of Seprafilm® on peripheral nerves: a histological and functional study. **Journal of Reconstructive Microsurgery**, v. 25, n. 6, p. 345-354, 2009.

MAURÍCIO, A. C.; GARTNER, A.; ARMANDA-DA-SILVA, P.; AMADO, S.; PEREIRA, T.; VELOSO, A. P.; VAREJÃO, A.; LUÍS, A. L.; GEUNA, S. Cellular systems and biomaterials for nerve regeneration in neurotmesis injuries. In: PIGNATELLO, R. (Ed.). **Biomaterials Applications for Nanomedicine**, Rijeka: InTech, 2011, p. 415-440.

McDONALD, D.; CHENG, C.; CHEN, Y.; ZOCHODNE, D. Early events of peripheral nerve regeneration. **Neuron Glia Biology**, v. 2, n. 2, p. 139-147, 2006.

MENDONÇA, A. C.; BARBIERI, C. H.; MAZZER, N. Directly applied low intensity direct electric current enhances peripheral nerve regeneration in rats. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 129, n. 2, p. 183-190, 2003.

MILLES, H. Techniques for nerve grafting. **Hand Clinics**, v. 16, n. 1, p. 73-91, 2000.

\* Baseadas na norma NBR 6023, de 2002, da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT).

MINOKOSHI, Y.; KIM, Y.; PERONI, O. D.; FRYER, L. G. D.; MULLER, C.; CARLING, D.; KAHN, B. B. Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. **Nature**, v. 415, n. 6869, p. 339, 2002.

MITSUI, Y.; SCHMELZER, J. D.; ZOLLMAN, P. J.; MITSUI, M.; TRITSCHLER, H. J.; LOW, P. A. Alpha-lipoic acid provides neuroprotection from ischemia-reperfusion injury of peripheral nerve. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 163, n. 1, p. 11-16, 1999.

MOHAMMED, I. F. R.; AL-MUSTAWFI, N.; KAKA, L. N. Promotion of regenerative processes in injured peripheral nerve induced by low-level laser therapy. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 25, n. 2, p. 107-111, 2007.

MONTE-RASO, V. V.; BARBIERI, C. H.; MAZZER, N.; FAZAN, V. P. S. Os efeitos do ultra-som terapêutico nas lesões por esmagamento do nervo ciático de ratos: análise funcional da marcha. **Rev. Bras. Fisioter.**, v. 10, n. 1, p. 113-119, 2006.

NAVARRO, X.; VERDÚ, E.; BUTÍ, M. Comparison of regenerative and reinnervating capabilities of different functional types of nerve fibers. **Experimental Neurology**, v. 129, n. 2, p. 217-224, 1994.

NAVARRO, X.; VIVÓ, M.; VALERO-CABRÉ, A. Neural plasticity after peripheral nerve injury and regeneration. **Progress in Neurobiology**, v. 82, n. 4, p. 163-201, 2007.

NGEOW, W. C.; ATKINS, S.; MORGAN, C. R.; METCALFE, A. D.; BOISSONADE, F. M.; LOESCHER, A. R.; ROBINSON, P. P. The effect of Mannose-6-Phosphate on recovery after sciatic nerve repair. **Brain Research**, v. 1394, p. 40-48, 2011.

\* Baseadas na norma NBR 6023, de 2002, da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT).

OLIVEIRA, L. S.; SOBRAL, L. L.; TAKEDA, S. Y. M.; BETINI, J.; GUIRRO, R. R. J.; SOMAZZ, M. C.; TEODORI, R. M. Estimulación eléctrica y natación en la fase aguda de la axonotmesis: influencia sobre la regeneración nerviosa y la recuperación funcional. **Rev. Neurol.**, v. 47, n. 1, p. 11-15, 2008.

OZGENEL, G. Y. Effects of hyaluronic acid on peripheral nerve scarring and regeneration in rats. **Microsurgery**, v. 23, n. 6, p. 575-581, 2003.

PACKER, L.; TRITSCHLER, H. J.; WESSEL, K. Neuroprotection by the metabolic antioxidant  $\alpha$ -lipoic acid. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 22, n. 1, p. 359-378, 1997.

PALISPIS, W. A.; GUPTA, R. Surgical repair in humans after traumatic nerve injury provides limited functional neural regeneration in adults. **Experimental Neurology**, v. 290, p. 106-114, 2017.

PARK, J. S.; CHA, S. J.; KIM, B. G.; CHOI, Y. S.; KWON, G. Y.; KANG, H.; AN, S. S. An assessment of the effects of a hyaluronan-based solution on reduction of postsurgical adhesion formation in rats: a comparative study of hyaluronan-based solution and two film barriers. **Journal of Surgical Research**, v. 168, n. 1, p. 49-55, 2011a.

PARK, J. S.; LEE, J. H.; HAN, C. S.; CHUNG, D. W.; KIM, G. Y. Y. Effect of hyaluronic acid-carboxymethylcellulose solution on perineural scar formation after sciatic nerve repair in rats. **Clinics in Orthopedic Surgery**, v. 3, n. 4, p. 315-324, 2011b.

PFISTER, B. J.; GORDON, T.; LOVERDE, J. R.; KOCHAR, A. S.; MACKINNON, S. E.; CULLEN, D. K. Biomedical engineering strategies for peripheral nerve repair: surgical applications, state of the art, and future

\* Baseadas na norma NBR 6023, de 2002, da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT).

challenges. **Critical Reviews™ in Biomedical Engineering**, v. 39, n. 2, p. 81-124, 2011.

PRUZNAK, A. M.; KAZI, A. A.; FROST, R. A.; VARY, T. C.; LANG, C. H. Activation of AMP-activated protein kinase by 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-β-D-ribose prevents leucine-stimulated protein synthesis in rat skeletal muscle. **The Journal of Nutrition**, v. 138, n. 10, p. 1887-1894, 2008.

PUJOL, J. P.; BRISSET, M.; JOURDAN, C.; BOCQUET, J.; JOUIS, V.; BELIARD, R.; LOYAU, G. Effect of a monocyte cell factor (MCF) on collagen production in cultured articular chondrocytes: role of prostaglandin E2. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 119, n. 2, p. 499-508, 1984.

REIS, F. A.; BELCHIOR, A. C. G.; NICOLAU, R. A.; FONSECA, T. S.; CARVALHO, P. T. C. Efeito da terapia com laser de arsenieto de gálio e alumínio (660Nm) sobre a recuperação do nervo ciático de ratos após lesão por neurotmeze seguida de anastomose epineural: análise funcional. **Rev. Bras. Fisioter.**, v. 12, n. 3, p. 215-221, 2008.

RIBEIRO, S. P.; VILLAR, J.; DOWNEY, G. P.; EDELSON, J. D.; SLUTSKY, A. S. Effects of the stress response in septic rats and LPS-stimulated alveolar macrophages: evidence for TNF-alpha posttranslational regulation. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 154, n. 6, p. 1843-1850, 1996.

RODGERS, K. E.; ROBERTSON, J. T.; ESPINOZA, T.; OPPELT, W.; CORTESE, S.; DIZEREGA, G. S.; BERG, R. A. Reduction of epidural fibrosis in

\* Baseadas na norma NBR 6023, de 2002, da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT).

lumbar surgery with Oxiplex adhesion barriers of carboxymethylcellulose and polyethylene oxide. **The Spine Journal**, v. 3, n. 4, p. 277-283, 2003.

ROSA JUNIOR, G. M.; MAGALHÃES, R. M. G.; ROSA, V. C.; BUENO, C. R. S.; SIMIONATO, L. H.; BORTOLUCI, C. H. F. Efeito da associação da laser terapia com a natação no reparo morfológico do nervo isquiático e na recuperação funcional de ratos submetidos à axoniotmese. **Fisioterapia e Pesquisa**, v. 23, n. 1, p. 12-20, 2016.

SACERDOTE, P.; FRANCHI, S.; MORETTI, S.; CASTELLI, M.; PROCACCI, P.; MAGNAGHI, V.; PANERAI, A. E. Cytokine modulation is necessary for efficacious treatment of experimental neuropathic pain. **Journal of Neuroimmune Pharmacology**, v. 8, n. 1, p. 202-211, 2013.

SAKLATVALA, J.; SARFIELD, S. J.; PILSWORTH, L. M. C. Characterization of proteins from human synovium and mononuclear leucocytes that induce resorption of cartilage proteoglycan in vitro. **Biochemical Journal**, v. 209, n. 2, p. 337-344, 1983.

SANTO NETO, H.; TEODORI, R. M.; SOMAZZ, M. C.; MARQUES, M. J. Axonal regeneration through muscle autografts submitted to local anaesthetic pretreatment. **British Journal of Plastic Surgery**, v. 51, n. 7, p. 555-560, 1998.

SANTO NETO, H.; PERTILLE, A.; TEODORI, R. M.; SOMAZZ, M. C.; MARQUES, M. J. Primary nerve repair by muscle autografts prepared with local anesthetic. **Microsurgery**, v. 24, n. 3, p. 188-193, 2004.

SCHIMIZZI, A. L.; MASSIE, J. B.; MURPHY, M.; PERRY, A.; KIM, C. W.; GARFIN, S. R.; AKESON, W. H. High-molecular-weight hyaluronan inhibits macrophage proliferation and cytokine release in the early wound of a

\* Baseadas na norma NBR 6023, de 2002, da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT).

preclinical postlaminectomy rat model. **The Spine Journal**, v. 6, n. 5, p. 550-556, 2006.

SCHMIDT, J. A.; MIZEL, S. B.; COHEN, D.; GREEN, I. Interleukin 1, a potential regulator of fibroblast proliferation. **The Journal of Immunology**, v. 128, n. 5, p. 2177-2182, 1982.

SECKEL, B. R.; JONES, D.; HEKIMIAN, K. J.; WANG, K. K.; CHAKALIS, D. P.; COSTAS, P. D. Hyaluronic acid through a new injectable nerve guide delivery system enhances peripheral nerve regeneration in the rat. **Journal of Neuroscience Research**, v. 40, n. 3, p. 318-324, 1995.

SEDDON, H. J. Three types of nerve injury. **Brain**, v. 66, n. 4, p. 237-288, 1943.

SEHGAL, P. B.; WALTHER, Z.; TAMM, I. Rapid enhancement of beta 2-interferon/B-cell differentiation factor BSF-2 gene expression in human fibroblasts by diacylglycerols and the calcium ionophore A23187. **Proceedings of The National Academy of Sciences**, v. 84, n. 11, p. 3663-3667, 1987.

SENOGLU, M.; NACITARHAN, V.; KURUTAS, E. B.; SENOGLU, N.; ALTUN, I.; ATLI, Y.; OZBAG, D. Intraperitoneal Alpha-Lipoic Acid to prevent neural damage after crush injury to the rat sciatic nerve. **Journal of Brachial Plexus and Peripheral Nerve Injury**, v. 4, n. 1, p. 22-28, 2009.

SIEMIONOW, M.; BRZEZICKI, G. Current techniques and concepts in peripheral nerve repair. **International Review of Neurobiology**, v. 87, n. p. 141-172, 2009.

SIKKINK, C. J. J. M.; ZEEBREGTS, C. J.; REIJNEN, M. M. P. J. Hyaluronan-based antiadhesive agents in abdominal surgery: applications, results, and mechanisms of action. **Surg. Technol. Int.**, v. 16, n. 2, p. 19-29, 2007.

\* Baseadas na norma NBR 6023, de 2002, da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT).

SILVA-COUTO, M. A.; GIGO-BENATO, D.; TIM, C. R.; PARIZOTTO, N. A.; SALVINI, T. F.; RUSSO, T. L. Effects of low-level laser therapy after nerve reconstruction in rat denervated soleus muscle adaptation. **Brazilian Journal of Physical Therapy**, v. 16, n. 4, p. 320-327, 2012.

SHALABY, M. R.; WAAGE, A.; AARDEN, L.; ESPEVIK, T. Endotoxin, tumor necrosis factor- $\alpha$  and interleukin 1 induce interleukin 6 production in vivo. **Clinical Immunology and Immunopathology**, v. 53, n. 3, p. 488-498, 1989.

SHEN, Q. W.; ZHU, M. J.; TONG, J.; REN, J.; DU, M. Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase kinase is involved in AMP-activated protein kinase activation by  $\alpha$ -lipoic acid in C2C12 myotubes. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 293, n. 4, p. C1395-C1403, 2007.

SHINOHARA, H.; NAORA, H.; HASHIMOTO, R.; HATTA, T.; TANAKA, O. Development of the innervation pattern in the upper limb of staged human embryos. **Act Anatomica**, v. 138, n. 3, p. 265-269, 1990.

SHORES A. Lesão e reparo do nervo periférico. In: BOJRAB, M. J. (Ed.). **Técnicas Atuais em Cirurgia de Pequenos Animais**, 3 ed., São Paulo: Roca, 1996, p. 49-56.

SHUBAYEV, V. I.; MYERS, R. R. Upregulation and interaction of TNF $\alpha$  and gelatinases A and B in painful peripheral nerve injury. **Brain Research**, v. 855, n. 1, p. 83-89, 2000.

SMIT, X.; VAN NECK, J. W.; AFOKE, A.; HOVIUS, S. E. Reduction of neural adhesions by biodegradable autocrosslinked hyaluronic acid gel after injury of peripheral nerves: an experimental study. **Journal of Neurosurgery**, v. 101, n. 4, p. 648-652, 2004.

\* Baseadas na norma NBR 6023, de 2002, da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT).

SOBRAL, L. L.; OLIVEIRA, L. S.; TAKEDA, S. Y. M.; SOMAZZ, M. C.; MONTEBELO, M. I. L.; TEODORI, R. M. Exercício imediato versus tardio na regeneração do nervo isquiático de ratos após axoniotmese: análise histomorfométrica e funcional. **Revista Brasileira de Fisioterapia**, v. 12, n. 4, p. 311-316, 2008.

SUNDERLAND, S. Individual nerves. In: WALSHE, F. (Ed.). **Nerves and Nerve Injuries**, Edinburgh: Livingstone, 1968, p. 773-1114.

TEODORI, R. M.; SILVA, A. M.; SILVA, M. T.; OLIVEIRA, L. S.; POLACOW, M. L. O.; GUIRRO, E. C. O. High-voltage electrical stimulation improves nerve regeneration after sciatic crush injury. **Brazilian Journal of Physical Therapy**, v. 15, n. 4, p. 325-331, 2011a.

TEODORI, R. M.; BETINI, J.; OLIVEIRA, L. S.; SOBRAL, L. L.; TAKEDA, S. Y. M.; MONTEBELO, M. I. L. Swimming exercise in the acute or late phase after sciatic nerve crush accelerates nerve regeneration. **Neural Plasticity**, v. 2011, n. 783901, p. 1-8, 2011b.

TETZLAFF, W.; ALEXANDER, S. W.; MILLER, F. D.; BISBY, M. A. Response of facial and rubrospinal neurons to axotomy: changes in mRNA expression for cytoskeletal proteins and GAP-43. **Journal of Neuroscience**, v. 11, n. 8, p. 2528-2544, 1991.

TOSATO, G.; JONES, K. D. Interleukin-1 induces interleukin-6 production in peripheral blood monocytes. **Blood**, v. 75, n. 6, p. 1305-1310, 1990.

TURAMANLAR, O.; OZEN, O. A.; SONGUR, A.; YAGMURCA, M.; AKÇER, S.; MOLLAOGLU, H.; AKTAS, C. Protective Effect of Alpha Lipoic Acid on Rat Sciatic Nerve Ischemia Reperfusion Damage. **Balkan Medical Journal**, v. 32, n. 2, p. 196-202, 2015.

\* Baseadas na norma NBR 6023, de 2002, da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT).

UNGER, R. H. Minireview: weapons of lean body mass destruction: the role of ectopic lipids in the metabolic syndrome. **Endocrinology**, v. 144, n. 12, p. 5159-5165, 2003.

VALERO-CABRÉ, A.; NAVARRO, X. H reflex restitution and facilitation after different types of peripheral nerve injury and repair. **Brain Research**, v. 919, n. 2, p. 302-312, 2001.

VAREJÃO, A. S. P.; MELO-PINTO, P.; MEEK, M. F.; FILIPE, V. M.; BULAS-CRUZ, B. Methods for the experimental functional assessment of rat sciatic nerve regeneration. **Neurological Research**, v. 26, n. 2, p. 186-194, 2004.

WANG, X.; WANG, Z.; YAO, Y.; LI, J.; ZHANG, X.; LI, C.; CHENG, Y.; DING, G.; LIU, L.; DING, Z. Essential role of ERK activation in neurite outgrowth induced by  $\alpha$ -lipoic acid. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research**, v. 1813, n. 5, p. 827-838, 2011.

WANG, X.; LEHKY, T. J.; BRELL, J. M.; DORSEY, S. G. Discovering cytokines as targets for chemotherapy-induced painful peripheral neuropathy. **Cytokine**, v. 59, n. 1, p. 3-9, 2012.

WINDER, W. W.; HARDIE, D. G. AMP-activated protein kinase, a metabolic master switch: possible roles in type 2 diabetes. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 277, n. 1, p. E1-E10, 1999.

WONG, A. H.; PIANTA, T. J.; MASTELLA, D. J. Nerve transfers. **Hand Clinics**, v. 28, n. 4, p. 571-577, 2012.

YAMAMOTO, M.; ENDO, N.; ITO, M.; OKUI, N.; KOH, S.; KANEKO, H.; HIRATA, H. Novel Polysaccharide-derived hydrogel prevents perineural adhesions in a rat model of sciatic nerve adhesion. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 28, n. 3, p. 284-288, 2010.

\* Baseadas na norma NBR 6023, de 2002, da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT).

YGGE, J. Neuronal loss in lumbar dorsal root ganglia after proximal compared to distal sciatic nerve resection: a quantitative study in the rat. **Brain Research**, v. 478, n. 1, p. 193-195, 1989.

ZHANG, Y.; LIN, J.; YIP, Y. K.; VILCEK, J. Enhancement of cAMP levels and of protein kinase activity by tumor necrosis factor and interleukin 1 in human fibroblasts: role in the induction of interleukin 6. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 85, n. 18, p. 6802-6805, 1988.

ZIEGLER, D. Thiocctic acid for patients with symptomatic diabetic polyneuropathy. **Treatments in Endocrinology**, v. 3, n. 3, p. 173-189, 2004.

ZONG, H.; REN, J. M.; YOUNG, L. H.; PYPAERT, M.; MU, J.; BIRNBAUM, M. J.; SHULMAN, G. I. AMP kinase is required for mitochondrial biogenesis in skeletal muscle in response to chronic energy deprivation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 25, p. 15983-15987, 2002.