

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

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOTERAPIA**

Influência da estimulação elétrica de alta voltagem e do ácido lipóico na  
recuperação morfológica e funcional do nervo isquiático de ratos após  
autoenxerto de nervo

Elvyna Melo Rêgo

2012

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO  
ELVYNA MELO RÊGO

INFLUÊNCIA DA ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA  
DE ALTA VOLTAGEM E DO ÁCIDO LIPÓICO  
NA RECUPERAÇÃO MORFOLÓGICA E  
FUNCIONAL DO NERVO ISQUIÁTICO DE  
RATOS APÓS AUTOENXERTO DE NERVO

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

Orientadora: Profª Drª Rosana Macher Teodori

PIRACICABA  
2012

Rêgo, Elvyna Melo.

Influência da estimulação elétrica de alta voltagem e do ácido lipóico na recuperação morfológica e funcional do nervo isquiático de ratos após autoenxerto de nervo / Elvyna Melo Rêgo – Piracicaba, 2012.

71 f.

Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências da Saúde – Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia / Universidade Metodista de Piracicaba.

Orientador(a): Profa. Dra. Rosana Macher Teodori.

1. Plasticidade neuronal. 2. Estimulação elétrica. 3. Ácido lipóico.  
4. Regeneração nervosa. 4. Fisioterapia. I. Teodori, Rosana Macher.  
II. Título.

CDU: 615.8

Dedico este trabalho a Deus. Esse Deus que tem me dedicado um amor incondicional sendo perfeito em todos os momentos.

## AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por todas as maravilhas que fez e faz em minha vida, por saber que tens estado ao meu lado, me encorajando em todos os momentos e fazendo com que os meus sonhos se tornem realidade, sem dúvidas és meu BEM e AMOR MAIOR.

Aos meus amados pais, **Valdir e Eva**, por sempre estarem presentes em minha vida, me incentivando e dando oportunidade para que todas as minhas conquistas pudessem acontecer, não medindo esforços para isso.

À minha querida e amada irmã **Evelyne**, por estar sempre ao meu lado no dia-a-dia, me dando a oportunidade de falar das coisas simples da vida.

À minha orientadora **Rosana Macher Teodori**, que esteve presente todo tempo nesse projeto, transmitindo seus conhecimentos e fazendo o possível para que esse trabalho se tornasse concreto. Obrigada por tudo, Rosana.

À minha querida Vó **Hilda** e tias **Valdice e Vanda**, pelo carinho dedicado nesses anos, se fazendo presentes todos os momentos. Amo vocês.

Aos meus queridos amigos...

**Lara Arrais, Almir Dibai, Ana Cláudia, Tatiane Arouca, Tereza Carmelita, Fabiana Sobral, Aline Macedo, Michele Ouro, Cesar Denari**, sem dúvidas vocês foram muito importantes para que os meus dias em Piracicaba, longe da família, se tornassem melhor e mais fáceis. Cada um de uma forma especial: as conversas, as risadas, as noites comendo pizza no Lisboa, assistindo filme, almoços e almoços incontáveis. Enfim, foi uma FAMÍLIA da qual terei muita alegria em lembrar sempre.

Aos meus amigos maceioenses, **Liana Machado, Diogo Tenório, Vanessa Karine, Gabriela Moreira e Mariana Moreira**, por mesmo longe se fazerem tão presentes a ponto da distância não aparecer. São quase 20 anos de amizade e podemos dizer que somos irmãos. Amo muito vocês.

À **Lyvia Brandão**, minha amiga-irmã e companheira de faculdade, foram muitas emoções inesquecíveis vividas e compartilhadas todos esses anos até os dias de hoje. Amo muito você.

Às minhas queridas amigas **Maria Inês e Auxiliadora Senne**, por não medirem esforços para que eu não me sentisse sozinha em nenhum momento em São Paulo-Piracicaba. Abriram as portas da sua casa e sempre me acolheram com muito carinho. Vocês foram demais.

A todos os professores do PPG – Fisioterapia, especialmente...

Aos professores **Carlos Silva, Maria Luiza Polacow, Delaine Bigaton, Adriana Pertille e Maria Imaculada**, por toda contribuição dada à dissertação e nesses dois anos de mestrado. Sem dúvida vocês contribuíram bastante para minha formação como mestre.

Ao Professor **Thiago Russo**, por todas as considerações feitas durante a qualificação, aperfeiçoando a construção da dissertação.

E por fim, agradeço a todos os **primos, tios e amigos** que nesses três anos de estada São Paulo/Piracicaba me visitaram, diminuindo a saudade e distância Maceió/São Paulo.

“Porque o SENHOR dá a sabedoria; da sua boca é que vem o conhecimento e o entendimento”.

(Provérbios 2:6)

## RESUMO

O objetivo deste estudo foi investigar os efeitos da Estimulação Elétrica de Alta Voltagem (EEAV) e do Ácido  $\alpha$ -Lipóico (LA), bem como da associação de ambos, sobre as características morfométricas e funcionais do nervo isquiático de ratos após autoenxerto de nervo. Trinta ratos Wistar ( $198 \pm 12$  g), foram divididos em 6 grupos, (n=5), Controle normal (CON), Controle Ácido Lipóico (AL), Lesão + Autoenxerto de Nervo (E), Lesão + Autoenxerto de Nervo + Estimulação Elétrica de Alta Voltagem (E+AV), Lesão + Autoenxerto de Nervo + Ácido Lipóico (E+AL) e Lesão + Autoenxerto de Nervo + EEAV + Ácido Lipóico (E+AV+AL). Após anestesia (cloridrato de ketamina – 1,16 g/10mL e cloridrato de xilazina – 2 g/100 mL, proporção 3:2, dose = 0,09 mL/100g peso e 0,06 mL/100g peso, respectivamente), o isquiático esquerdo dos animais dos grupos E, E+AV, E+AL e E+AV+AL foi seccionado, sendo retirado um segmento de 8 mm, que foi invertido e reconectado por 2 pontos de sutura epineural em cada extremidade. Após 24 horas da lesão os animais dos grupos, E+AV e E+AV+AL receberam EEAV por estimulação catódica até o limiar motor durante 30 min (Frequência de 100 Hz; Voltagem de 100 V, sendo a duração de pulso e intervalo interpulso predeterminados pelo equipamento), 5 vezes por semana, durante 8 semanas. Aos animais dos grupos, AL, E+AL e E+AV+AL, foi administrada uma solução de ácido  $\alpha$ -lipóico, por via intraperitoneal, numa concentração de 40mg/kg, após 24 horas da lesão, 5 vezes por semana durante 8 semanas. Realizou-se o registro da marcha (pré-operatório, 7º, 28º, 35º, 42º, 49º, 56º, 63º dias de pós-operatório (PO)). O nervo isquiático de todos os animais foi processado para microscopia de luz para análise morfométrica e quantitativa. Os dados morfométricos e funcionais foram processados (STATISTICA, version 10). Para análise de número de axônio e diâmetro do axônio foi realizado análise de variância de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn. Para as variáveis diâmetro da fibra, razão G, espessura da bainha e IFC utilizou-se o teste (F) seguido de Tukey HSD. Considerou-se  $p < 0,05$ . O número mediano de axônios no grupo E+AV não diferiu daquele do grupo E ( $p > 0,05$ ), tendo sido maior em relação a todos os outros grupos ( $p < 0,05$ ). No grupo E+AV+AL o número de axônios foi menor que em todos os demais grupos ( $p < 0,05$ ), não tendo diferido do grupo CON ( $p > 0,05$ ). Os demais grupos não diferiram entre si ( $p > 0,05$ ). O diâmetro dos axônios, diâmetro das fibras nervosas e a espessura das bainhas de mielina não atingiram os valores controle em todos os grupos lesionados, não havendo diferença entre os grupos ( $p > 0,05$ ). A razão G foi semelhante em todos os grupos ( $p = 0,2045$ ). Após 8 semanas de intervenção, nenhum grupo desnervado recuperou a funcionalidade. Conclui-se que a EEAV e o ácido lipóico, não influenciaram a maturação das fibras nervosas regeneradas após neurotmesa, bem como a recuperação funcional.

**Palavras-chave:** Plasticidade neuronal, estimulação elétrica, ácido lipóico, regeneração nervosa, fisioterapia.



## ABSTRACT

The purpose of this study was to investigate the effects of High Voltage Electrical Stimulation (EEAV) and  $\alpha$ -lipoic acid (LA), as well as the association of both, on morphometric and functional characteristics of the sciatic nerve of rats after nerve autograft. Thirty Wistar rats ( $198 \pm 12$  g), were divided into 6 groups, (n=5), normal control (CON), thioctic Acid Control (AL), Injury + Nerve Autografts (E), Injury + Nerve Autografts + High Voltage Electrical Stimulation (E+AV), Injury + Nerve Autografts + thioctic acid (E+AL) and injury + Nerve Autografts + HVES + thioctic acid (E+AV+AL). After anesthesia (ketamine hydrochloride - 1.16 g/10mL and xylazine 2 g/100 mL, ratio 3:2, dose = 0.09 mL/100g weight and 0.06 mL/100g weight, respectively), the left sciatic nerve from animals of groups E, E+AV, E+AL and E+AV+AL was sectioned, and removed a segment of 8 mm, which was inverted and reattached by two epineural stitches at each end. After 24 hours of the lesion, the groups of animals E+AV and E+AV+AL received HVES cathodic stimulation up to the motor threshold for 30 min (Frequency 100 Hz, 100 V voltage, and the pulse duration and interpulse interval predetermined by the equipment), 5 times a week, for 8 weeks. In the animals of groups, AL, E+AL and E+AV+AL, were administered a solution of thioctic acid intraperitoneally at a concentration of 40mg/kg, 24 hours after injury, five times a week for 8 weeks. Held the record of movement (preoperative, 7°, 28°, 35°, 42°, 49°, 56°, 63° days postoperatively (PO). The sciatic nerve of all animals were processed for light microscopy and quantitative morphometric analysis. Morphometric and functional data were processed (STATISTICA, version 10). For analysis of axon number and axon diameter was performed analysis of variance Kruskal-Wallis test followed by Dunn. For the diameter of the fiber, G ratio, thickness of the sheath and SFI, we used the test (F) followed by Tukey HSD. We considered  $p < 0.05$ . The median number of axons in the E+AV group did not differ from that of group E ( $p > 0.05$ ) and were higher than in all other groups ( $p < 0.05$ ). In group E+AV+AL the number of axons was lower than in all other groups ( $p < 0.05$ ), having not differed from the CON group ( $p > 0.05$ ). The other groups did not differ ( $p > 0.05$ ). The diameter of axons, nerve fiber diameter and thickness of myelin sheaths did not reach the control values in all groups injured and no difference between groups was found ( $p > 0.05$ ). The G ratio was similar in all groups ( $p = 0.2045$ ). After 8 weeks of intervention, no group denervated regained functionality. In conclusion, the HVES and thioctic acid, did not affect the maturation of nerve fibers regenerated after neurotmesis, as well as functional recovery.

**Keywords:** Neuronal Plasticity, Electric Stimulation, Thioctic Acid, Nerve Regeneration, Physical Therapy.

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 OBJETIVO	19
3 MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1 Grupos Experimentais	20
3.2 Análise Funcional da Marcha	21
3.3 Procedimento Cirúrgico	24
3.4 Estimulação Elétrica de Alta Voltagem (EEAV)	26
3.5 Administração do ácido alfa-lipóico	29
3.6 Perda Amostral	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 Estatística	33
4 RESULTADOS	34
4.1 Índice Funcional do Ciático (IFC)	34
4.1.1 Análise intergrupos	34
4.1.2 Análise intragrupos	36
4.2 Análise Histológica	38
4.3 Análise Quantitativa	40
4.3.1 Número de Axônios	40
4.4 Análise Morfométrica	41
4.4.1 Diâmetro do Axônio	41
4.4.2 Diâmetro da Fibra Nervosa	42
4.4.3 Espessura da Bainha de Mielina	43
4.4.4 Razão G	44
5 DISCUSSÃO	45
CONCLUSÃO	62
REFERÊNCIAS	63
ANEXO	71

## 1 INTRODUÇÃO

A lesão nervosa periférica é um evento clínico comum que está geralmente relacionada a uma incapacidade (Gigo-Benato, Geuna, e Rochkind, 2005; Gigo-Benato et al., 2010), como perda ou diminuição da sensibilidade e da motricidade no território inervado (Machado, 2000). Tais lesões são comuns na clínica de fisioterapia, sendo mais frequentemente decorrentes de acidentes automobilísticos e no esporte, seguidos de traumas penetrantes e lesões ao nascimento por tração nervosa excessiva (Ijkema-Paassen et al., 2004).

A recuperação funcional após lesão nervosa periférica é um desafio para a reabilitação, especialmente nos casos em que o nervo é seccionado, havendo perda de continuidade do tecido. A regeneração nervosa é possível, mas ocorre lentamente (Burnett e Zager, 2004), permanecendo a perda funcional por vários meses (Oliveira et al., 2008), limitando as atividades de vida diária e laborais, além de exigir afastamento do trabalho por tempo prolongado (Lopes, 2000), causar aumento de encargos ao empregador (Burt, 2005), necessidade de mudança de função e, às vezes, aposentadoria precoce (McAllister et al., 1996).

Seddon (1943), citado por Burnett e Zager (2004), estabeleceu uma classificação para as lesões nervosas periféricas, utilizando como critério o grau de comprometimento estrutural e o prognóstico de recuperação, qual seja: Neuropraxia (tipo I) caracterizada por um bloqueio localizado da condução nervosa, com leve comprometimento da bainha de mielina e preservação da continuidade axonal, sendo reversível em aproximadamente 30 dias, de forma espontânea; Axoniotmese (tipo II), considerada uma lesão grave 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 processual; Neurotmeze (tipo III), considerada mais grave, caracterizada pela ruptura completa do nervo, com consequente descontinuidade entre o sistema nervoso central e a periferia, que exige reconstrução cirúrgica. Para Burnett e Zager (2004) e Omura et al. (2005) a neurotmeze apresenta prognóstico de recuperação desfavorável devido a diversos fatores que limitam a recuperação funcional.

Um estudo realizado nos EUA mostrou que 50.000 pessoas sofrem lesões traumáticas de nervos a cada ano (Millesi, 2000; Evans, 2001; Gigo-Benato et al., 2010), o que representa um importante problema de saúde pública. No Brasil, um estudo recente classificou 456 casos de lesão nervosa e mostrou que a neurotmeze estava presente em 41% da amostra (kouyoudjian et al., 2006).

O sucesso do reparo da lesão nervosa periférica depende da extensão e do tipo da lesão (Burnett e Zager, 2004), sendo que, quanto mais grave é a lesão maior o tempo de recuperação e maior número de fatores limitantes está presente. Em humanos, a característica mais evidente da desnervação é a atrofia muscular, marcada pela redução da quantidade de miofilamentos de actina e miosina, e resulta em diminuição de diâmetro das fibras e perda de força muscular (Sheffler e Chae, 2007).

Uma vez instalada a atrofia muscular, mesmo que ocorra a regeneração axonal, a recuperação da função ainda continua comprometida,

pois a regeneração axonal não é sinônimo de recuperação da função (Burnett e Zager, 2004).

Os mecanismos que envolvem a regeneração do nervo são bem descritos. Quando a continuidade das fibras nervosas é interrompida, o coto nervoso distal sofre degeneração Walleriana (Lundborg, 2005). Como consequência dessa degeneração, os músculos sofrem uma diminuição de volume já na primeira semana após a lesão, levando à atrofia progressiva das fibras, aumento do tecido adiposo (Kern et al., 2002) e, posteriormente, substituição por tecido conjuntivo, com consequente perda da elasticidade do músculo (Lee e Wolfe, 2000). O coto do axônio proximal pode, então, regenerar ao longo do trajeto do nervo distal e alcançar seu alvo periférico, as fibras musculares e os receptores sensoriais (Lundborg, 2005).

No caso de neurotmeze, a reconstrução cirúrgica dos cotos nervosos é imprescindível para a recuperação, sendo que, em alguns casos, se faz necessário um enxerto de nervo para assegurar a continuidade entre as porções proximal e distal (Wolford, 2003).

Mesmo com os avanços da microcirurgia para tratamento das lesões nervosas periféricas evidentes nos últimos 25 anos, até o momento, nenhuma técnica assegura a recuperação total e normalização da função do nervo após reparo e, em geral, os resultados clínicos permaneceram limitados (Al Majed et al., 2000; Gigo-Benato, Geuna e Rochkind, 2005), o que justifica a importância de estudos voltados à investigação de recursos que favoreçam e acelerem a recuperação funcional.

Nesse sentido, a associação de diferentes técnicas cirúrgicas a recursos que favorecem a recuperação da função perdida vem ganhando

destaque. Na Fisioterapia, a investigação do efeito de recursos terapêuticos, como o ultrassom (Monte-Raso et al., 2006), o laser de baixa potência (Reis et al., 2009) e a estimulação elétrica (Mendonça et al., 2003; Oliveira et al., 2008), tem sido priorizada com o objetivo de obter um retorno mais precoce da funcionalidade, minimizando a atrofia muscular, formação de neuromas, alterações no mapa cortical, entre outros (Al Majed et al., 2000).

A estimulação elétrica é um recurso que vem sendo amplamente utilizado na clínica. À estimulação elétrica de alta voltagem (EEAV) vem sendo atribuídas propriedades de reparo tecidual, por modular o processo inflamatório e estimular a regeneração. Contudo, seus efeitos ainda estão sendo investigados nos diferentes tecidos.

A EEAV tem uma duração de pulso muito curta, causando poucas mudanças no pH e temperatura dos tecidos, sendo uma corrente que oferece menor risco de dano tecidual e, portanto, considerada segura para utilização clínica (Lampe, 1998).

Estudos clínicos tem mostrado que a EEAV favorece o reparo tecidual em pés diabéticos (Peters et al., 2001), em úlceras cutâneas crônicas isquêmicas (Goldman et al., 2004), como também a redução da dor na disfunção temporomandibular (Almeida, Berni e Rodrigues-Bigaton, 2009).

Experimentalmente, benefícios da EEAV tem sido identificados na redução de edema após traumas mecânicos em sapos (Bettany, Fish e Mendel, 1990), bem como na potencialização da maturação das fibras nervosas e aceleração da recuperação funcional no nervo isquiático de ratos após axoniotmese (Teodori et al. 2011). Arrais (2011) também demonstrou o efeito da EEAV na regeneração tecidual após lesão aguda de pele em ratos.

Im, Lee e Hoopes (1990) destacam, ainda, que a EEAV amplia o fluxo sanguíneo a enxertos, aspecto de grande relevância para o presente estudo.

A EEAV é descrita qualitativamente como uma corrente de alta voltagem, pulsada monofásica de pico duplo (Robinson e Snyder-Mackler, 1995). Os equipamentos de EEAV permitem a seleção da polaridade e a variação nas taxas de pulso (Gentzkow, 1993), apresentando uma duração de pulso que pode variar de 5 a 100  $\mu$ s, uma amplitude de pico elevada, alta voltagem (acima de 100 V), permitindo alcançar as faixas de recrutamento de fibras nervosas sensoriais, motoras e também aquelas responsáveis pela condução de impulsos nociceptivos, sendo geralmente bem tolerada pelo paciente, pois atua de forma seletiva sobre as fibras nervosas (Kantor, Alon e Ho, 1994; Nelson, Hayes e Currier, 1999; Davini et al., 2005) devido à pequena largura de pulso e pelo fato de demorar a atingir o limiar doloroso.

No que se refere à polaridade, pode ser utilizada a estimulação catódica (negativa) ou anódica (positiva), sendo que a catódica está relacionada à estimulação do tecido de granulação (Nelson, Hayes e Currier, 1999), redução de edema (Griffin et al., 1990), proliferação de fibroblastos e aumento do fluxo sanguíneo (Nelson, Hayes e Currier, 1999; Daeschlein et al., 2007), migração de leucócitos e células epidérmicas (Gentzkow, 1993); enquanto a anódica está relacionada à desnaturação de proteínas, redução de mastócitos em feridas cutâneas e estimulação de capilarização (Nelson, Hayes e Currier, 1999; Daeschlein et al., 2007).

No que se refere à redução de edema, tem sido atribuído à EEAV o papel de repelir proteínas plasmáticas negativamente carregadas, presentes no interstício do tecido traumatizado (Alon et al., 1992), além de favorecer o

movimento da albumina devido ao estímulo à abertura do lúmen linfático e à contração do músculo liso dos vasos (Cook et al., 1994), a EEAV catódica ainda atua reduzindo o diâmetro das arteríolas, diminuindo o fluxo sanguíneo, de modo que a EEAV catódica poderia influenciar a liberação de histamina aos seus receptores nas vênulas pós-capilares nas células endoteliais (Taylor et al., 1997).

A estimulação elétrica usada para reparo tecidual se baseia no fato de que este recurso pode incrementar a perfusão microvascular, o fluxo sanguíneo regional, além de controlar o edema, interferindo no tempo de cicatrização (Snyder-Mackler, 2001; Byl, 2003). Quanto aos nervos, sabe-se que são nutridos por artérias que entram no tronco nervoso procedentes de vasos sanguíneos vizinhos. A rede arterial é rica em vasos colaterais, tanto em torno como no interior dos próprios nervos e, havendo uma lesão nervosa, esse sistema fica comprometido (Lundborg, 1987; Fisher, 2003). Desta forma, a EEAV promove aumento do fluxo sanguíneo, além de controlar edemas, o que poderia favorecer a regeneração nervosa e recuperação funcional.

Estudos recentes tem apontado a eficácia da EEAV na aceleração da maturação das fibras nervosas regeneradas após axoniotmese em ratos, bem como na recuperação funcional (Fontes, 2009; Teodori et al., 2011). Os autores atribuem esse efeito à possível melhora do fluxo sanguíneo, à redução de edema e à aceleração no reparo tecidual. Entretanto, não foram encontrados estudos que investiguem o efeito da EEAV em lesões do tipo neurotmese, o que motivou a realização deste estudo.

Na clínica médica, o ácido Alfa-lipóico (LA), um micronutriente com propriedades antioxidantes, vem sendo utilizado no tratamento de várias



doenças que acometem o sistema nervoso, incluindo os distúrbios de dor, mal de Alzheimer, doença de Parkinson, polineuropatia diabética e neuropatias (Wang et al., 2011). Estudos comprovam que o LA melhora o fluxo sanguíneo neural e a condução do impulso nervoso (Coppey, 2001), além de atuar como neuroprotetor nas lesões nervosas periféricas (Welin et al., 2008).

O ácido alfa-lipóico atua na melhora da condução sensitiva distal em nervos submetidos à isquemia seguida de reperfusão (Mitsui et al. 1999), é considerado um potente antioxidante biológico (Packer, Witt e Tritschler, 1995), protegendo as células da ação dos radicais livres (Jacob et al., 1996).

De acordo com Ziegler (2004), o ácido alfa-lipóico atua por mecanismos diversos, que variam de uma atividade potente de limpeza a um suporte metabólico das células nervosas, bem como na modulação da liberação de citocinas neurotróficas. Esses mecanismos reduzem a inflamação, melhorando o funcionamento das fibras nervosas e promovendo neuroproteção e neurorregeneração.

Considerando que a regeneração nervosa após axoniotmese ocorre espontaneamente, o que não é verdadeiro no caso de neurotmese, onde há necessidade de intervenção cirúrgica (Burnett e Zager, 2004); que o método mais efetivo de reparo nervoso após neurotmese é o autoenxerto de nervo (Wolford, 2003); que a EEAV acelera a maturação de fibras nervosas regeneradas e a recuperação funcional após axoniotmese em ratos (Teodori et al., 2011); que o LA é um neuroprotetor e favorece o fluxo sanguíneo neural e a condução do impulso nervoso (Coppey, 2001), além de favorecer a neurorregeneração (Ziegler, 2004); a hipótese deste estudo é que a EEAV e o LA, assim como a associação de ambos, poderia favorecer a regeneração

nervosa e recuperação funcional também em lesão do tipo neurotmese em ratos.

## **2 OBJETIVO**

Investigar os efeitos da Estimulação Elétrica de Alta Voltagem e do Ácido  $\alpha$ -Lipóico, bem como da associação de ambos, sobre as características morfométricas e funcionais do nervo isquiático de ratos após autoenxerto de nervo.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Grupos experimentais

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de São Carlos – UFSCAR – Protocolo nº 080/2010 (anexo 1).

Trinta ratos *Wistar*, com idade entre 6 e 7 semanas, pesando  $198 \pm 12$  g foram selecionados para o estudo e mantidos no Biotério da Faculdade de Ciências da Saúde – Universidade Metodista de Piracicaba (FACIS-UNIMEP) em gaiolas individuais de polietileno, com ventilação adequada, ciclo automático de iluminação claro/escuro de 12 horas e livre acesso à água e ração peletizada.

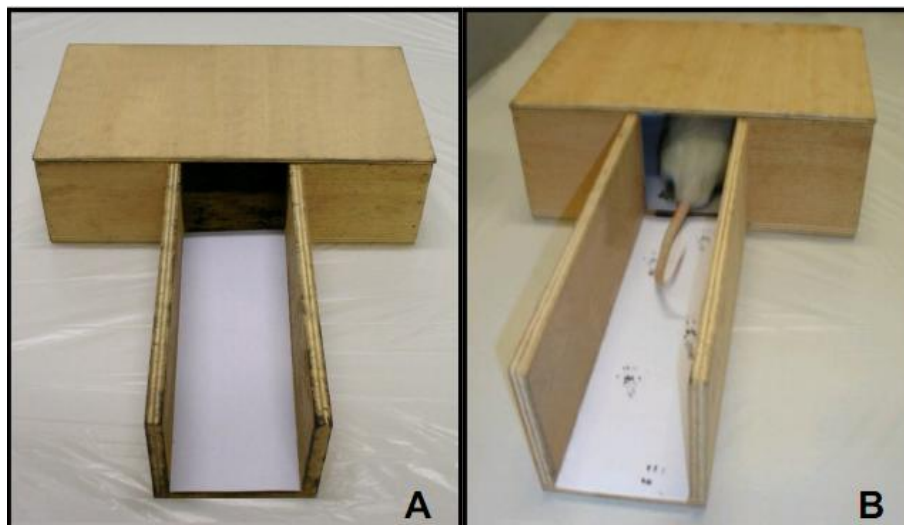
Os animais foram aleatoriamente divididos em 6 grupos ( $n = 5$ ):

- **Controle (CON):** os animais foram mantidos em suas gaiolas sem nenhuma intervenção, sob as mesmas condições dos demais grupos;
- **Controle Ácido Lipóico (AL):** os animais foram mantidos em suas gaiolas sem nenhuma intervenção cirúrgica, porém, recebendo uma dose diária de ácido lipóico.
- **Lesão + Autoenxerto de Nervo (E):** os animais tiveram o nervo isquiático esquerdo seccionado, seguido de autoenxerto de nervo.
- **Lesão + Autoenxerto de Nervo + Estimulação Elétrica de Alta Voltagem (E+AV):** os animais tiveram o nervo isquiático esquerdo seccionado, seguido de autoenxerto de nervo e foram submetidos à EEAV.

- **Lesão + Autoenxerto de Nervo + Ácido Lipóico (E+AL):** os animais tiveram o nervo isquiático esquerdo seccionado, seguido de autoenxerto de nervo e foram tratados diariamente com ácido lipóico.
- **Lesão + Autoenxerto de Nervo + EEA V + Ácido Lipóico (E+AV+AL):** os animais tiveram o nervo isquiático esquerdo seccionado, seguido de autoenxerto de nervo e foram submetidos à EEA V e tratados com ácido lipóico.

### **3.2 Análise Funcional da Marcha**

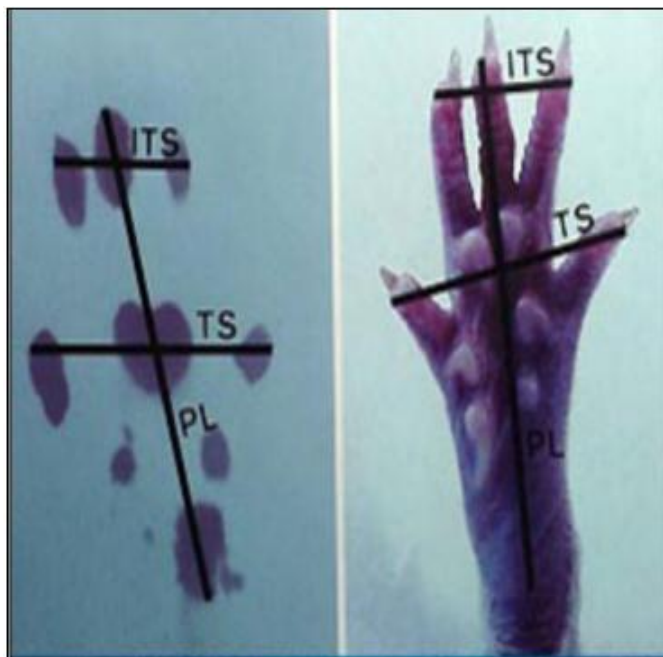
Inicialmente os animais foram treinados a caminhar no dispositivo utilizado para análise funcional da marcha (De Medinacelli, Freed e Wyatt, 1982). Para o registro das pegadas, o animal foi colocado em um corredor com dimensões 42 x 8,2 cm com acesso a uma caixa escura, onde foi colocada uma tira de papel sulfite A4 branco para registro das pegadas (figura 1A). Para isso, as patas pélvicas dos animais foram marcadas com tinta de impressão digital e o animal foi posicionado no início do corredor, por onde caminhava em direção ao ambiente escuro, deixando impressas as faces plantares das patas normal e experimental (De Medinacelli, Freed e Wyatt, 1982; Varejão *et al.*, 2004), conforme mostra a figura 1B.



**Figura 1.** Aparato de análise da marcha (A); Registro das impressões plantares das patas normal e experimental do rato (B).

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>, 28<sup>o</sup>, 35<sup>o</sup>, 42<sup>o</sup>, 49<sup>o</sup>, 56<sup>o</sup>, 63<sup>o</sup> dias PO, de acordo com o grupo experimental.

Para o cálculo do Índice Funcional do Ciático (IFC) utilizou-se um paquímetro digital (MITUTOYO<sup>®</sup>), 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 pode ser visualizado na figura 2.



**Figura 2.** Parâmetros para mensuração das pegadas. PL: (print length); ITS: intermediate toes spread; TS: toe spread. **Fonte:** Varejão et al. (2004).

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

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

Os dados obtidos expressaram 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 e Hunter; 1989).

### 3.3 Procedimento cirúrgico

Para 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 peso corporal, respectivamente.

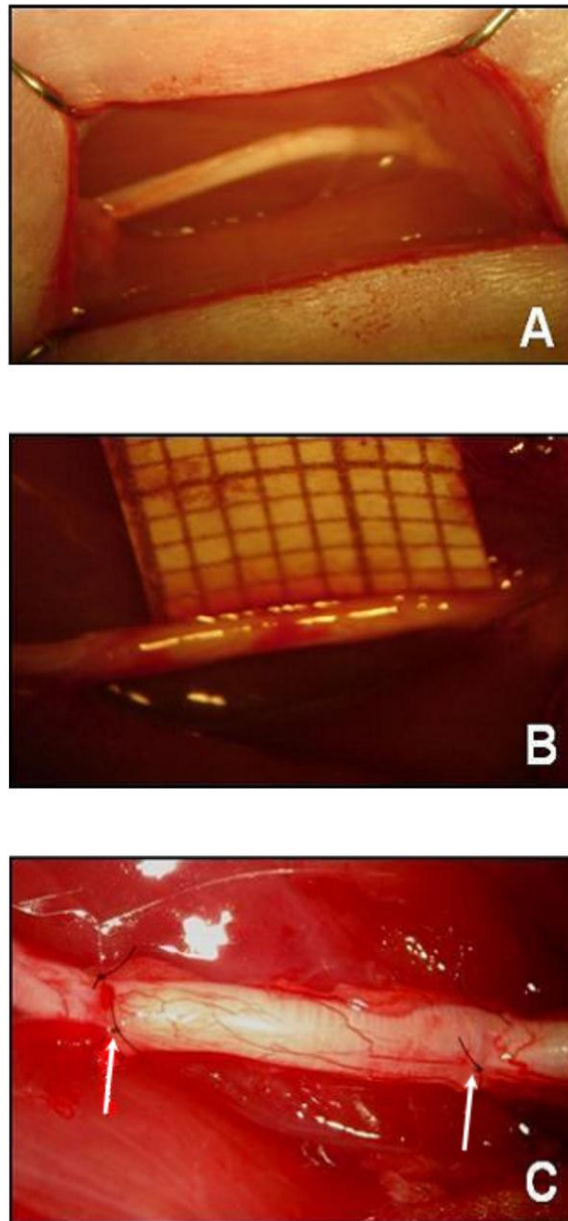
Após anestesia, os animais foram posicionados em decúbito ventral e submetidos à tricotomia e assepsia da região glútea esquerda. A seguir, uma incisão cirúrgica de aproximadamente 2 cm foi realizada sobre a pele acompanhando-se o trajeto de projeção do nervo isquiático. Os planos cutâneo e muscular foram afastados, permitindo a exposição e o acesso ao nervo (figura 3A).

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 folha de papel milimetrado (figura 3B) foi posicionada paralelamente ao nervo para mensurar e padronizar o comprimento do fragmento nervoso (8 mm). Em seguida, o nervo isquiático foi seccionado com tesoura microcirúrgica.

Nos grupos E, E+AV, E+AL e E+AV+AL o fragmento seccionado sofreu uma inversão de 180° e foi imediatamente fixado aos cotos nervosos proximal e distal por dois pontos de sutura epineural em cada extremidade, com fio monofilamento nylon 10-0 DERMALON<sup>®</sup>. Foram mantidos 180 ° de distância entre cada ponto de sutura, para garantir o adequado acoplamento entre os cotos e o enxerto (figura 3C). A manipulação dos segmentos nervosos e do fragmento do enxerto foi delicada para evitar tensão ao nervo.





**Figura 3.** Procedimento para lesão do nervo isquiático: Afastamento dos planos cutâneo e muscular com exposição do nervo isquiático (A); Folha de papel milimetrado delimitando o local da secção (B); Nervo suturado, com destaque para os pontos de sutura nas setas (C).

Após este procedimento os planos muscular e cutâneo foram suturados com fio de algodão 6-0 ETHICON®.

Foi administrado 4  $\mu$ L 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.

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

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

Utilizou-se o equipamento Neurodyn High Volt – ANVISA 10360310008 - IBRAMED<sup>®</sup> (figura 4), o qual foi aferido por meio de um Osciloscópio Tektronix TDS 210<sup>®</sup>, de forma que todos os parâmetros físicos da corrente estivessem de acordo com o especificado no equipamento. O *timer* do equipamento também foi aferido a partir de três cronômetros da marca Technos<sup>®</sup>. Essa variável estava de acordo com o especificado no equipamento.



**Figura 4.** Equipamento utilizado para intervenção - Neurodyn High Volt – IBRAMED<sup>®</sup>(\*\*); Gel para acoplamento dos eletrodos (\*).

A aplicação da EEAV nos grupos E+AV e E+AV+AL foi realizada sob anestesia: Cloridrato de Ketamina (1,16 g/10 mL) e Cloridrato de Xilazina (2 g/100 mL) na dose de 0,15 mL/100g de massa corporal, iniciando 24 horas após a lesão nervosa, sempre no período vespertino, com estimulação catódica (negativo) até o limiar motor, promovendo efeito de bombeamento devido à contração/relaxamento muscular rítmico que favorecem a circulação local e redução do edema (Nelson, Hayes e Currier, 1999), durante 30 minutos (Frequência de 100 Hz; Voltagem de 100 V, por se tratar de alta voltagem, sendo pulsos gêmeos 20 $\mu$ s e intervalo interpulso 100 $\mu$ s), 5 vezes por semana,

durante 8 semanas. Um eletrodo ativo de silicone-carbono, medindo 2,0 x 2,0 cm, foi posicionado sobre a cicatriz cirúrgica e outro, dispersivo, medindo 4,0 x 4,0 cm, foi posicionado paralelamente ao ativo, preservando-se uma distância de 1 cm entre eles (figura 5). Todos os eletrodos eram novos (sem uso). Utilizou-se gel como meio de acoplamento, em quantidade suficiente para não ocorrer extravasamento.



**Figura 5.** Procedimento de Eletroestimulação: Posicionamento dos eletrodos ativo (\*) e dispersivo (\*\*).

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

Foi administrada uma solução de ácido  $\alpha$ -lipóico, por via intraperitoneal, numa concentração de 40 mg/kg nos grupos AL, E+AL e E+AV+AL. A aplicação teve início 24 horas após a lesão nervosa, 5 vezes por semana, durante 8 semanas.

### 3.6 Perda Amostral

Nos grupos E+AV e E+AV+AL houve perda de 2 animais durante o período de 8 semanas de intervenção. Considerando que o “n” para cada grupo foi de 5 animais, outros 2 animais foram submetidos aos mesmos procedimentos, em cada grupo.

### 3.7 Coleta do Material

Transcorrido o tempo previsto para o experimento, 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 (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  $\mu$ m com navalha de vidro, em

ultramicrotomo 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 do material, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical.

### **3.8 ANÁLISE DOS DADOS**

Para análise dos dados morfométricos e funcionais, a pesquisadora foi cegada.

#### **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 E, E+AV, E+AL e E+AV+AL, bem como do segmento correspondente nos animais dos grupos CON e AL, em microscópio de luz Olympus<sup>®</sup> - BX 41-BF, acoplado a uma câmera de vídeo Infinity Lite<sup>®</sup>.

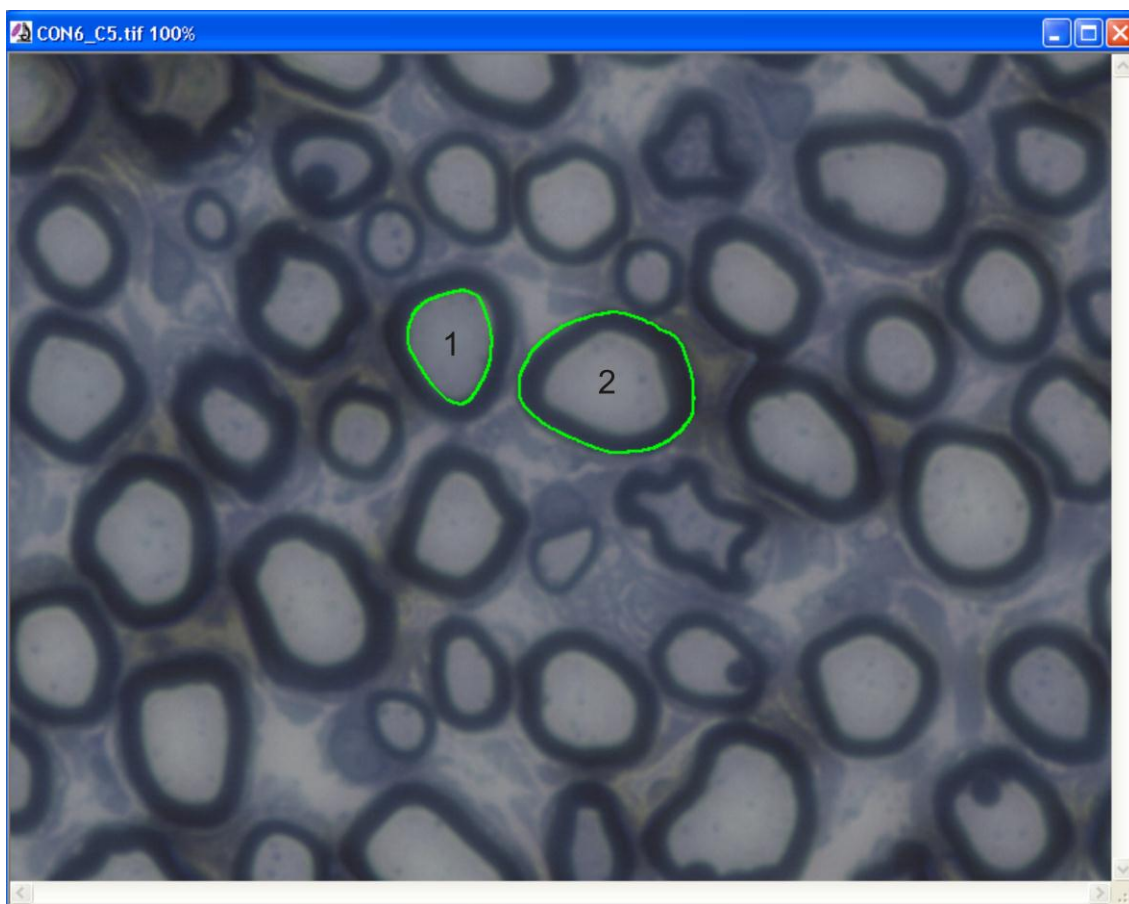
As imagens foram transferidas para um computador Pentium IV, que conta com o *software* Image-Pro Plus 6.2 – Media Cybernetics<sup>®</sup>, para se obter o número de axônios, a espessura das bainhas de mielina, o diâmetro das fibras nervosas e dos axônios e a razão G.

O sistema foi calibrado para obtenção de medidas na unidade de micrômetros ( $\mu\text{m}$ ), com o auxílio de uma lâmina de calibração micrometrada ZEISS 5<sub>+100/100</sub> 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 (Figura 6). Esses valores foram transferidos para o *Excel*, constituindo uma lista de dados.



**Figura 6.** Interface do *software* Image Pro-Plus 6.2 – Media Cybernetics®, mostrando o procedimento utilizado para mensuração do diâmetro dos axônios (1) e das fibras nervosas (2). Aumento = 1000x.

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 Estatística

A análise estatística foi realizada através do STATISTICA – Data Analysis Software System – Version 10 (2011) StatSoft, Inc – 2300 East 14th St. Tulsa, OK 74104, USA.

Adotou-se o nível de significância  $\alpha = 0,05$ . 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.

Para as variáveis diâmetro da fibra, razão G, espessura da bainha de mielina e IFC, que atenderam as pressuposições de normalidade e homogeneidade de variâncias, foram adotados métodos da estatística paramétrica: análise de variância (teste F) e posterior comparação múltipla de médias de grupos por meio do teste de Tukey HSD. Para as variáveis diâmetro do axônio e número de axônios, que não atenderam as pressuposições, foram adotados métodos da estatística não paramétrica: análise de variância não paramétrica de Kruskal-Wallis, com posterior realização do teste de Dunn para comparação dos grupos dois a dois.

## **4 RESULTADOS**

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

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

#### **4.1.1 Análise Intergrupos**

No período pré-operatório todos os grupos apresentaram valores entre 0 e -20, indicando função normal. Nos demais períodos, os valores permaneceram entre -62 e -95, demonstrando perda da função em todos os grupos. Comportamento diferente deste foi observado no grupo AL, no qual os valores permaneceram dentro da normalidade em todos os períodos de análise (Tabela 1).

**Tabela 1** – Valores do IFC nos grupos AL, E, E+AV, E+AL e E+AV+AL nos diferentes tempos de análise.

Tempo (dias)	Grupos					ANOVA p Valor
	AL	E	E+AV	E+AL	E+AV+AL	
0	-16.18 <sup>a</sup>	-12.60 <sup>a</sup>	-12.62 <sup>a</sup>	-13.74 <sup>a</sup>	-11.99 <sup>a</sup>	0,8415
7	-11.07 <sup>a</sup>	-69.77 <sup>b</sup>	-65.06 <sup>b</sup>	-62.06 <sup>b</sup>	-74.10 <sup>b</sup>	< 0,0001
28	-10.95 <sup>a</sup>	-92.10 <sup>b</sup>	-80.74 <sup>b</sup>	-87.92 <sup>b</sup>	-79.57 <sup>b</sup>	< 0,0001
35	-11.53 <sup>a</sup>	-87.52 <sup>b</sup>	-90.89 <sup>b</sup>	-82.06 <sup>b</sup>	-87.62 <sup>b</sup>	< 0,0001
42	-11.32 <sup>a</sup>	-86.66 <sup>b</sup>	-95.42 <sup>b</sup>	-94.35 <sup>b</sup>	-90.50 <sup>b</sup>	< 0,0001
48	-10.97 <sup>a</sup>	-69.72 <sup>b</sup>	-77.70 <sup>bc</sup>	-95.27 <sup>c</sup>	-87.08 <sup>bc</sup>	< 0,0001
56	-11.87 <sup>a</sup>	-85.48 <sup>b</sup>	-80.41 <sup>b</sup>	-85.48 <sup>b</sup>	-76.90 <sup>b</sup>	< 0,0001
63	-5.32 <sup>a</sup>	-77.83 <sup>b</sup>	-82.98 <sup>b</sup>	-84.99 <sup>b</sup>	-88.73 <sup>b</sup>	< 0,0001

Letras diferentes indicam diferença significativa. Teste: Tukey HSD.

AL difere dos demais grupos em todos os períodos de análise; E+AL difere de E no 48º dia.

Na avaliação pré-tratamento (tempo 0) todos os grupos apresentaram IFC médio semelhante, não diferindo entre si ( $p=0,8415$ ). A partir do sétimo dia PO todos os grupos apresentaram significativa redução da função quando comparados ao grupo AL ( $p<0,05$ ). Tal comportamento se manteve até o final das avaliações.

Os grupos E+AV+AL, E, E+AV e E+AL apenas diferiram entre si após 48 dias da lesão, quando o grupo E apresentou valores de IFC mais positivos que o grupo E+AL ( $p<0,0001$ ).

#### 4.1.2 Análise Intragrupos

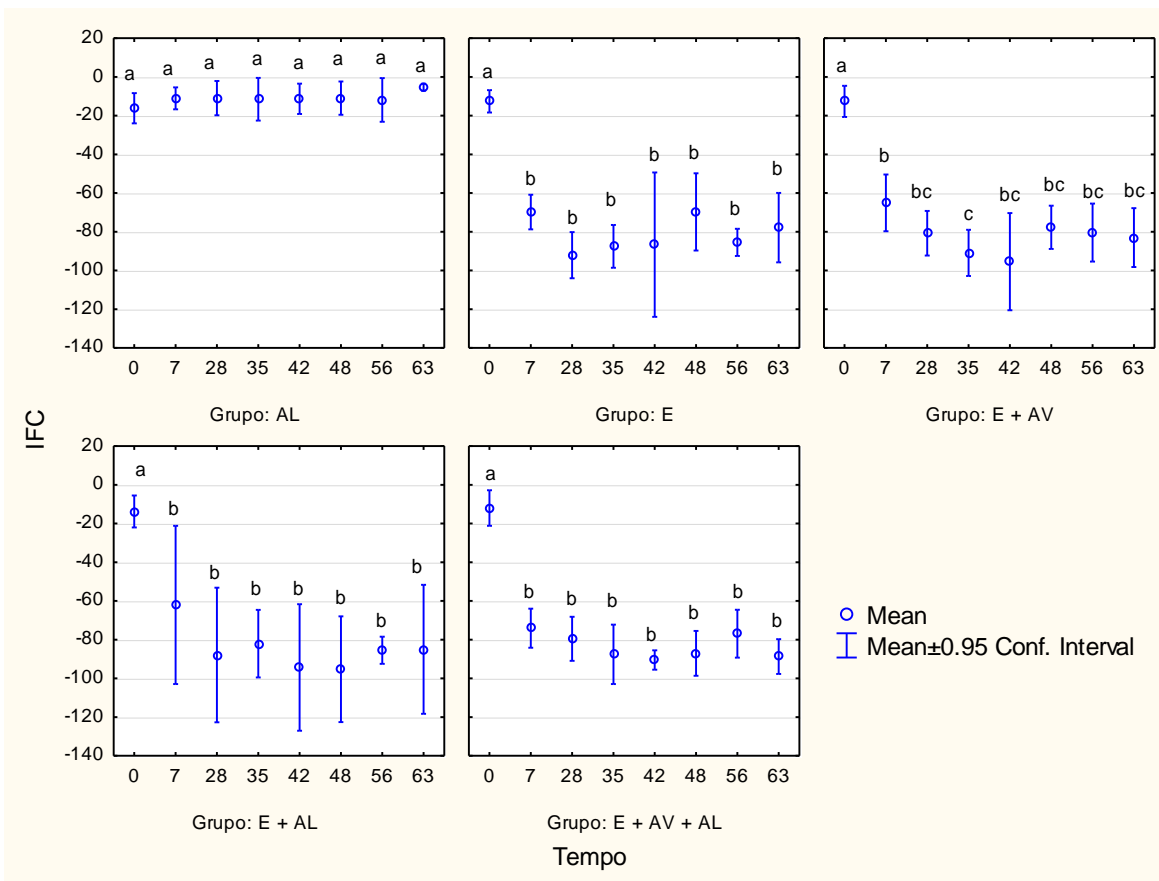
A figura 13 aponta os resultados da análise intragrupos.

Para o grupo E+AV+AL o maior valor médio do IFC foi observado no período pré-operatório diferindo do valor observado nas avaliações posteriores ( $p < 0,05$ ). Os valores observados a partir do sétimo dia não diferiram entre si ( $p > 0,05$ ), apontando que não houve influência da associação entre estimulação elétrica de alta voltagem e ácido lipóico sobre a recuperação funcional ao longo do tempo.

Nos grupos E e E+AL, também se observou diferença apenas entre o período pré-operatório e os demais tempos de análise ( $p > 0,05$ ), sugerindo que a administração de ácido lipóico após autoenxerto de nervo não favoreceu a recuperação funcional após 8 semanas de tratamento.

Os valores de IFC no grupo AL não diferiram no decorrer das avaliações ( $p > 0,05$ ).

No grupo E+AV, além da diferença observada entre o período pré-operatório e os demais períodos de análise ( $p < 0,05$ ), notou-se perda funcional mais expressiva após 35 e 42 dias da lesão ( $p < 0,05$ ), entretanto, a recuperação após esses períodos não refletiu recuperação funcional.



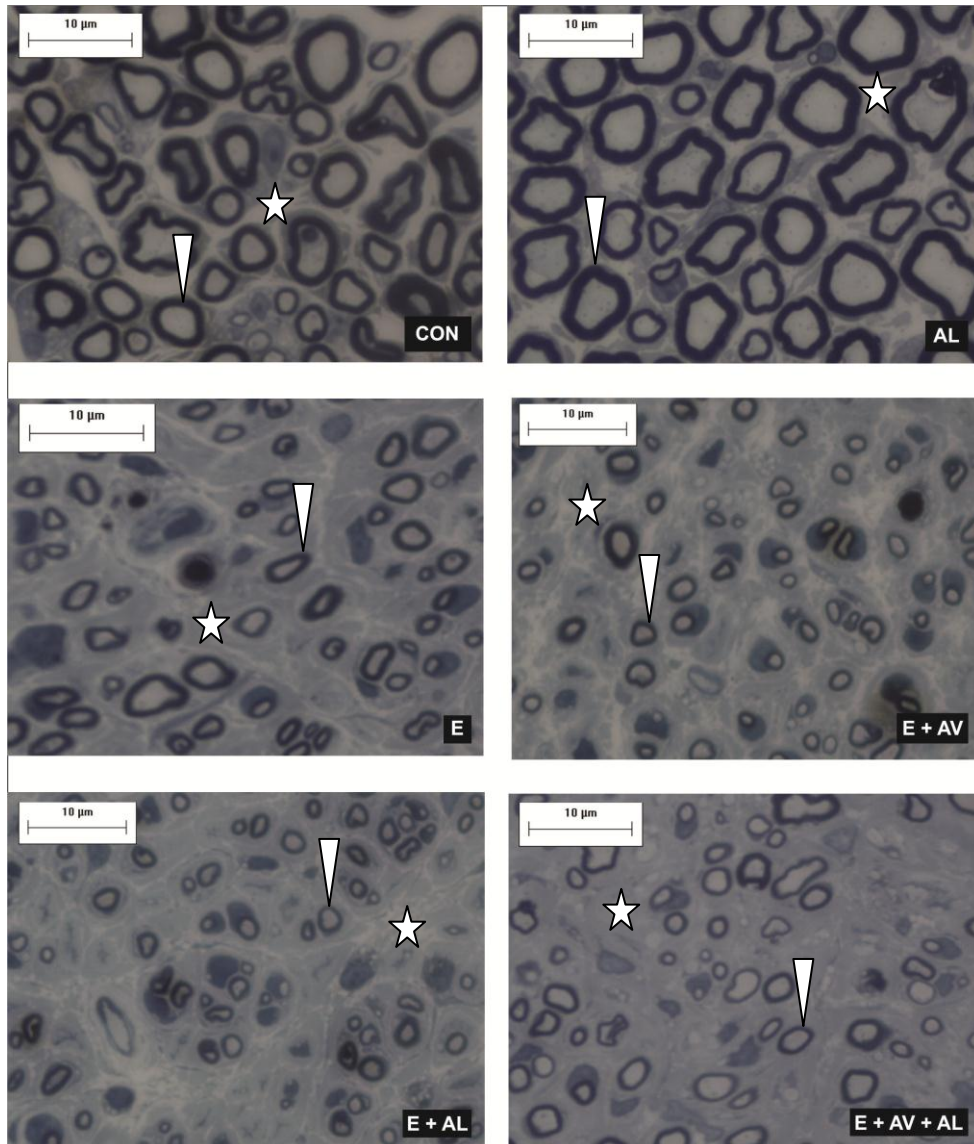
**Figura 13** – Médias e Intervalos de confiança (95%) para o Índice Funcional do Ciático (IFC), segundo o grupo, nos diferentes tempos de análise. Nos grupos E, E+AV, E+AL e E+AV+AL o tempo 0 difere dos demais tempos; No grupo E+AV o tempo 35 difere do tempo 7.

## 4.2 Análise Histológica

Na figura 7 observam-se as características histológicas do nervo isquiático nos grupos CON, AL, E, E+AV, E+AL, E+AV+AL.

O grupo CON, apresentou características histológicas compatíveis com as de um nervo normal, incluindo o diâmetro dos axônios, o diâmetro das fibras nervosas e a espessura das bainhas de mielina. Nos grupos E+AV+AL, E, E+AL e E+AV observou-se maior proporção de tecido conjuntivo entre as fibras nervosas e axônios com calibre reduzido em relação ao grupo CON.

No grupo AL, o diâmetro dos axônios, diâmetro das fibras nervosas e espessura das bainhas de mielina se mostraram semelhantes ao grupo CON, uma vez que os animais deste grupo não sofreram lesão nervosa, tendo sido submetidos apenas ao tratamento com ácido lipóico.

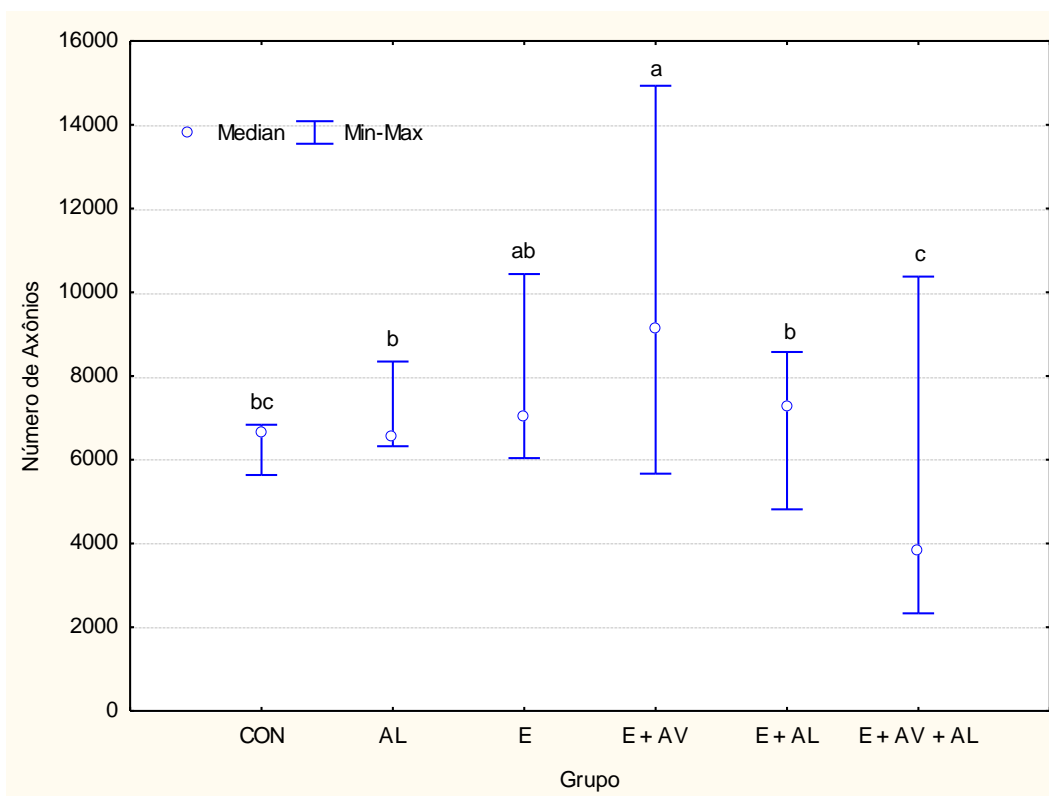


**Figura 7:** Micrografia em corte transversal do nervo isquiático dos animais dos grupos: Controle Normal (CON); Controle Ácido Lipóico (AL); Enxerto (E); Enxerto + Alta Voltagem (E+AV); Enxerto + Ácido Lipóico (E+AL); Enxerto + Alta Voltagem + Ácido Lipóico (E+AV+AL). Observar diferenças de calibres dos axônios (cabeça de seta), espessura da bainha de mielina e no tecido conjuntivo (estrela).

### 4.3 Análise Quantitativa

#### 4.3.1 Número de Axônios

Observa-se que o número mediano de axônios no grupo E+AV não diferiu daquele do grupo E ( $p>0,05$ ), tendo sido maior em relação a todos os outros grupos ( $p<0,05$ ). No grupo E+AV+AL o número de axônios foi menor que em todos os demais grupos ( $p<0,05$ ), não tendo diferido do grupo CON ( $p>0,05$ ). Os demais grupos não diferiram entre si ( $p>0,05$ ).



**Figura 8** – Valores medianos, mínimo e máximo para a variável número de axônios, segundo o grupo.

Letras diferentes indicam diferença significativa. Teste: Dunn.

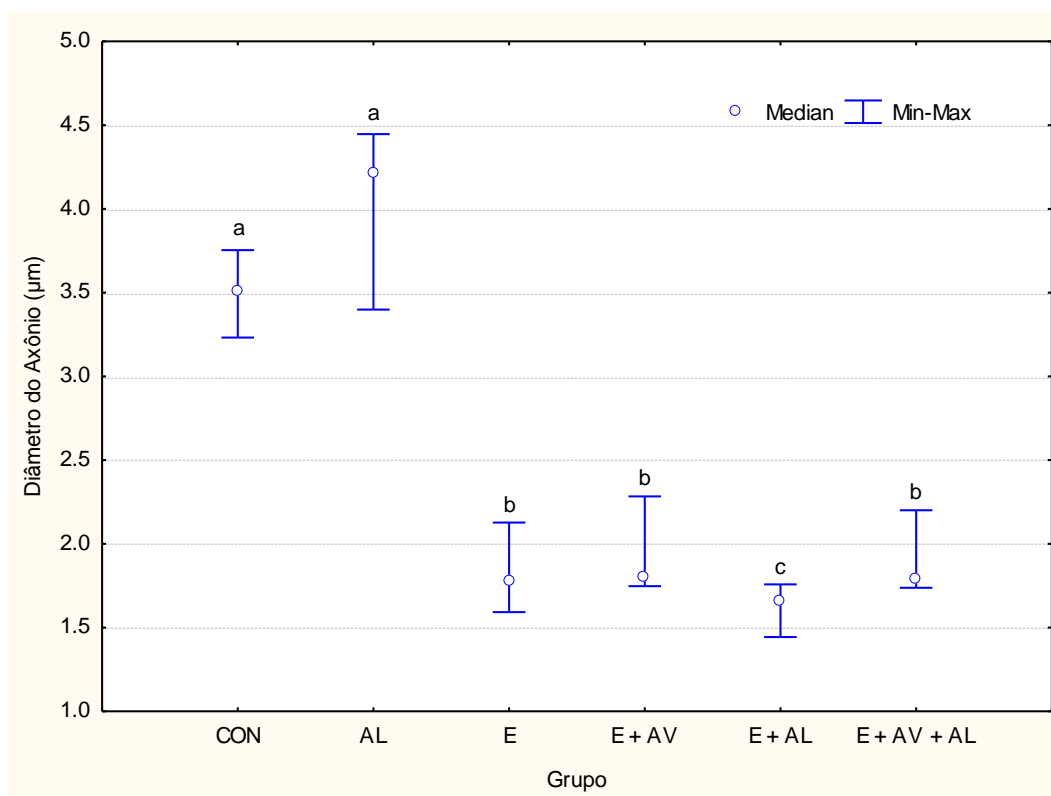
AL difere de E+AV, E+AV+AL; E difere de E+AV+AL; E+AL difere de E+AV e E+AV+AL; E+AV difere do CON.



## 4.4 Análise Morfométrica

### 4.4.1 Diâmetro do Axônio

O diâmetro dos axônios foi maior nos grupos CON e AL em relação a todos os demais grupos ( $p < 0,05$ ). No grupo E+AL o diâmetro dos axônios foi menor que nos demais grupos ( $p < 0,05$ ). Não foram constatadas diferenças significativas entre os grupos E+AV, E e E+AV+AL ( $p \geq 0,05$ ).



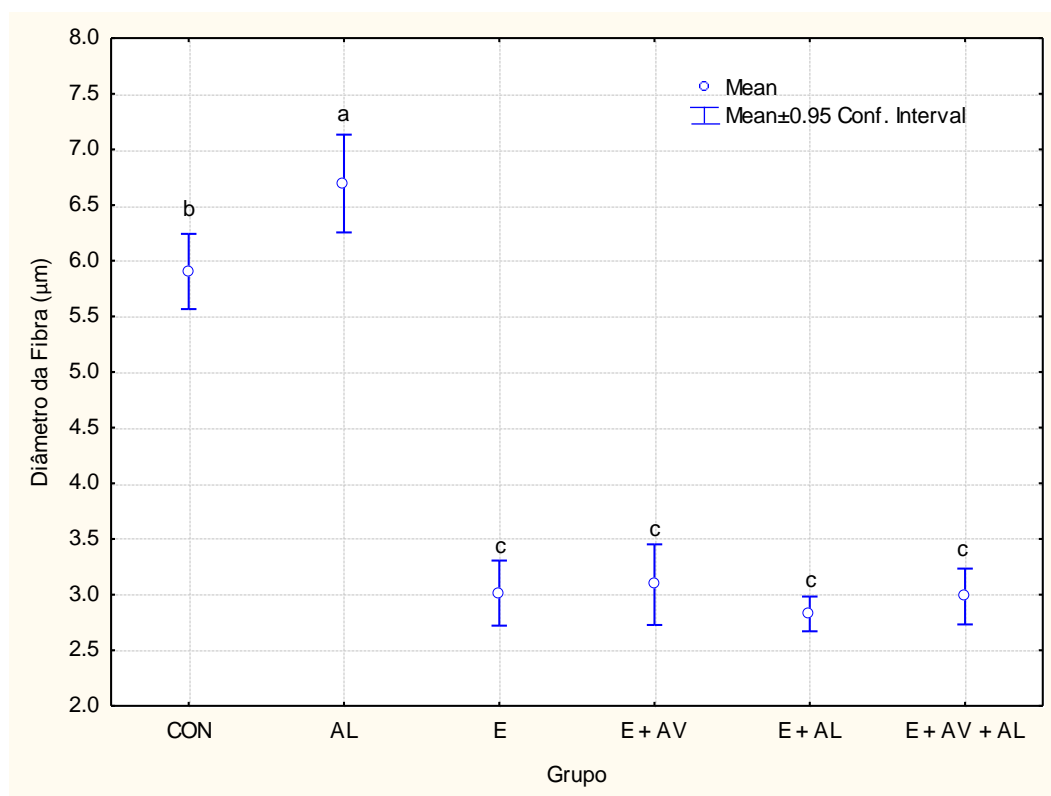
**Figura 9** – Valor mediano, máximo e mínimo para diâmetro do axônio, segundo o grupo.

Letras diferentes indicam diferença significativa. Teste: Dunn.

E, E+AV, E+AL, E+AV+AL diferem dos grupos CON e AL; E+AL difere dos demais grupos.

#### 4.4.2 Diâmetro da Fibra Nervosa

Observou-se, por meio da análise de variância, diferença significativa entre os grupos ( $p < 0,0001$ ). Através do teste de comparações múltiplas de Tukey observou-se, novamente, que o diâmetro da fibra nervosa nos grupos CON e AL foi maior que nos grupos E, E+AL, E+AV e E+AV+AL ( $p < 0,0009$ ). O grupo AL apresentou o maior valor médio para o diâmetro da fibra, diferindo de todos os demais grupos ( $p < 0,009$ ). O grupo CON foi superior aos grupos E, E+AL, E+AV e E+AV+AL ( $p < 0,0001$ ). Os grupos E+AL, E+AV, E e E+AV+AL não diferiram entre si ( $p > 0,05$ ), conforme mostra a figura 10.



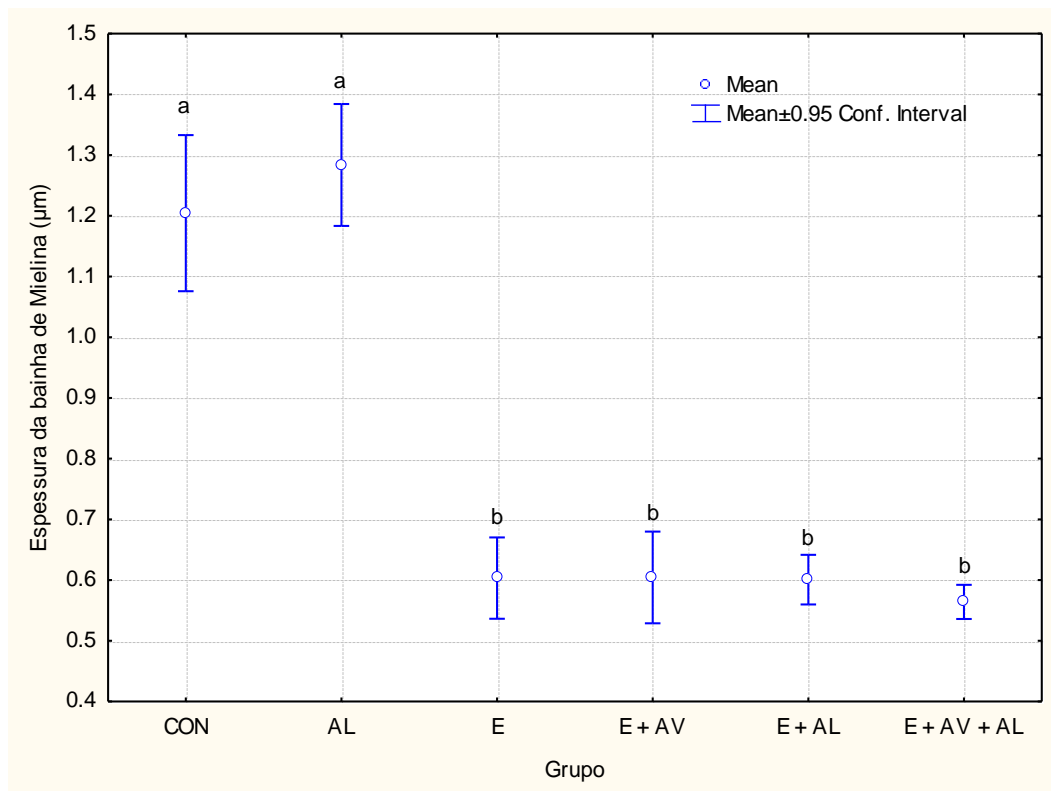
**Figura 10** – Médias e Intervalos de confiança (95%) para a variável diâmetro da fibra, segundo o grupo.

Letras diferentes indicam diferença significativa. Teste: Tukey HSD.

Todos os grupos diferem do CON; AL difere dos demais grupos.

#### 4.4.3 Espessura da bainha de Mielina

Na figura 11, observa-se que os grupos CON e AL apresentaram os maiores valores médios para a espessura da bainha de mielina, diferindo de todos os demais grupos ( $p < 0,0001$ ).



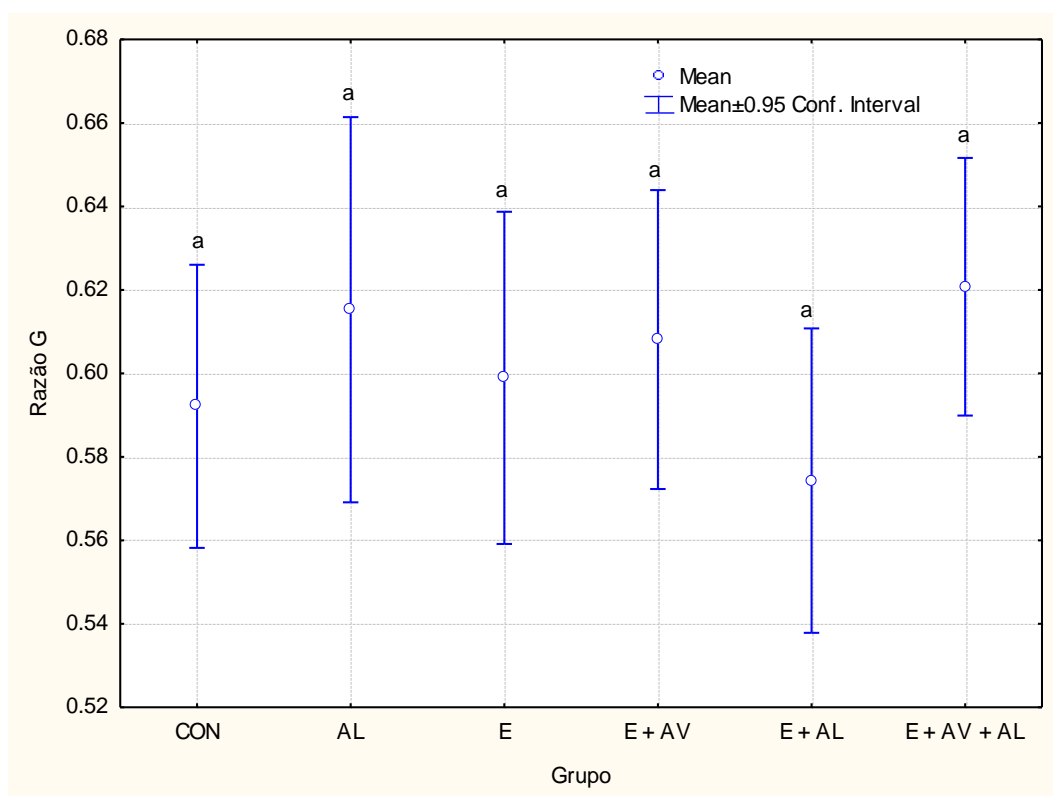
**Figura 11** – Médias e Intervalos de confiança (95%) para a variável espessura da bainha de mielina, segundo o grupo.

Letras diferentes indicam diferença significativa. Teste: Tukey HSD.

CON e AL diferem dos demais grupos.

#### 4.4.4 Razão G

A figura 12 apresenta os valores de Razão G, segundo o grupo. A análise de variância não detectou efeito de grupo ( $p=0,2045$ ), indicando que os grupos não diferiram entre si.



**Figura 12** – Médias e Intervalos de confiança (95%) para a variável Razão G, segundo o grupo. Teste: Tukey HSD.

## 5 DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo mostram que o tratamento com EEAV e com ácido alfa-lipóico, assim como a associação entre os dois recursos, não foi efetivo para estimular a regeneração nervosa e a recuperação funcional após neurotmeese em ratos.

O número de axônios nos grupos não submetidos à lesão nervosa (CON e AL) estava dentro dos parâmetros de normalidade, enquanto no grupo E+AV foi maior que nos demais grupos, não diferindo do grupo E. O diâmetro dos axônios, diâmetro das fibras nervosas e espessura das bainhas de mielina acompanharam o padrão de normalidade nos grupos CON e AL, estando reduzidos em todos os grupos lesados. A razão G se manteve normal em todos os grupos e a funcionalidade para a marcha não foi recuperada em nenhum dos grupos lesados após 8 semanas.

Considerando os resultados relatados em estudo prévio que aplicou EEAV sobre o nervo lesado em ratos (Teodori et al., 2011) no qual a EEAV acelerou a recuperação morfológica e funcional após a axoniotmeese, acredita-se que o principal motivo para o resultado insatisfatório do tratamento com EEAV no presente estudo seja o tipo de lesão à qual foram submetidos os animais nos dois diferentes estudos.

Segundo Park et al. (2011), um dos principais fatores que comprometem a recuperação em lesões do tipo neurotmeese é a formação de tecido cicatricial. Ngeow et al. (2011) reforçam que a variabilidade da recuperação depende de fatores como a natureza e severidade da lesão, o grau de morte neuronal após a lesão, a quantidade de tecido cicatricial e a presença de neuroma no local da lesão.

Na neurotmeze, os tubos endoneurais e os fascículos nervosos são rompidos, o epineuro é danificado, havendo proliferação de fibroblastos endoneurais e perineurais. O nervo terminal se transforma numa massa dilatada contendo células de Schwann, capilares, fibroblastos, macrófagos e fibras colágenas desorganizados e os axônios em regeneração encontram uma forte barreira para o crescimento. Como consequência disso, muitos brotos axonais, na tentativa de crescimento contra essa barreira, se espiralam em meio ao tecido cicatricial ou tomam uma rota alternativa, porém sem alcançar o órgão alvo (Burnett e Zager, 2004). Nessas condições, é imprescindível a reconexão dos cotos nervosos e, quando um segmento nervoso é perdido, um enxerto deve interpor as extremidades lesadas do nervo, garantindo uma ponte de ligação entre elas para o direcionamento mais adequado dos brotos axonais em crescimento.

Na axoniotmeze e na neurotmeze a presença de cicatrização intraneural é comum, sendo mais evidente e extensa na neurotmeze, pois pode ser devida à lesão neural intraoperatória, hemorragia no campo cirúrgico, ou mesmo à simples manipulação do nervo (Park et al., 2011). A cicatrização intraneural atua como barreira mecânica ao crescimento axonal e compromete a condução nervosa (Koopmans et al., 2009; Park et al., 2011). Na neurotmeze, que exige reconstrução cirúrgica, soma-se a presença de cicatrização extraneural, que pode causar compressão ou restrição do nervo pelo tecido conjuntivo adjacente, o que pode levar à tração do nervo e constrição dos vasos intraneurais, com consequente isquemia (Park et al., 2011). Atkins et al. (2006) apontam que a extensão da regeneração nervosa através do local de reparo é inversamente proporcional à extensão de tecido cicatricial presente.

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 o efeito da EEAV, impossibilitando a observação de resultados semelhantes àqueles obtidos por Teodori et al. (2011) em ratos submetidos à axoniotmese, mesmo que parâmetros de eletroestimulação idênticos tenham sido utilizados.

Considerando que na axoniotmese o efeito da EEAV está relacionado, entre outros fatores, à melhora do fluxo sanguíneo neural (Teodori et al., 2011), o que favorece a regeneração e recuperação funcional, a presença de cicatriz extraneural poderia explicar a limitação do efeito deste recurso em animais submetidos à neurotmese.

Outro aspecto a ser considerado é que, no caso de neurotmese acompanhada de autoenxerto de nervo, como ocorreu neste estudo, a manipulação cirúrgica do nervo e o número de suturas epineurais é maior que na neurotmese seguida de sutura direta dos cotos, sem interposição de enxerto, o que se constitui num fator adicional que limita o efeito da EEAV e a recuperação morfológica e funcional do nervo.

### **Análise Quantitativa**

O número de axônios observado distalmente à lesão após axoniotmese ou neurotmese seguida de reconexão, tende a ser maior que aquele presente no nervo normal, pois, segundo Lundborg (2000), durante a regeneração nervosa periférica, cada axônio da porção proximal à lesão origina vários brotos que atravessam a área da lesão e crescem no interior de tubos de

células de Schwann no enxerto e nervo distal. Assim, é comum observar número de axônios maior nos grupos lesados que naqueles sem lesão.

Neste estudo, os grupos E+AV e E seguiram esse comportamento. Entretanto, os valores medianos não chegaram a duplicar, sugerindo uma restrição ao crescimento dos brotos axonais pelo aumento do tecido conjuntivo intra e extraneural, conforme Koopmans et al. (2009) e Park et al. (2011) apontam ocorrer em lesões por secção do nervo.

Quando o ácido lipóico foi administrado para animais desnervados (E+AL), o número de axônios não diferiu dos grupos CON e AL. Porém, quando a EEAV foi associada à administração de ácido alfa-lipóico, esse número foi menor que em todos os demais grupos desnervados.

Em estudo que utilizou os mesmos parâmetros de EEAV no nervo isquiático de ratos após axoniotmese, o número de axônios no grupo tratado também não diferiu do controle após 21 dias da lesão e a maturação das fibras regeneradas e recuperação funcional foram favorecidas pela aplicação da EEAV (Teodori et al., 2011), mas em função da recuperação morfológica e funcional observada, os autores sugerem que a EEAV tenha acelerado a maturação dos axônios regenerados e a eliminação sináptica.

A estimulação no limiar motor teve por objetivo a promoção de contrações musculares rítmicas que, segundo Weisemann-Penkner et al. (2001) e Nelson, Hayes e Currier (1999), aumentam o fluxo sanguíneo arterial para a área estimulada, favorecendo o processo de regeneração.

Por se tratar de estimulação sobre o trajeto nervoso e não sobre o músculo desnervado, o risco de provocar estresse muscular estaria reduzido,



além do que a contração observada durante a estimulação não era intensa, apenas permitindo visualizar a presença de contração.

Com relação à voltagem, considera-se alta voltagem quando se utiliza tensão acima de 100 V (Davini et al., 2005). As referências disponíveis na literatura consideram este conceito para utilização da EEAV. Szuminsky et al. (1994) utilizaram uma voltagem de 500 V para investigar a ação bactericida *in vitro* da EEAV em diferentes espécies de bactérias. Houghton et al. (2003) aplicaram 150 V para tratamento de úlceras cutâneas crônicas em humanos. Garcia (2004) utilizou voltagem acima de 100 V com objetivo de redução de linfedema pós-mastectomia. Teodori et al. (2011), utilizaram uma voltagem de 100 V para investigar o efeito regenerativo da EEAV no nervo isquiático de ratos após esmagamento. Arrais (2011) utilizou 100 V com objetivo de cicatrização de úlceras em ratos. Por este motivo, optou-se por utilizar o limiar motor e voltagem de 100 V, que variou de 100 a 120 V neste estudo.

Quanto à polaridade, a estimulação catódica, utilizada neste estudo, estimula o tecido de granulação (Nelson, Hayes e Currier, 1999), reduz edema (Griffin et al., 1990, Karnes et al., 1995), promove proliferação de fibroblastos e aumento do fluxo sanguíneo (Nelson, Hayes e Currier, 1999; Daeschlein et al., 2007), migração de leucócitos e células epidérmicas (Gentzkow, 1993), entretanto, no tecido nervoso periférico submetido a autoenxerto de nervo, os efeitos da EEAV parecem não ter sido suficientemente efetivos para contrapor as barreiras impostas pela cicatrização intra e extraneural durante o processo de regeneração nervosa.

A frequência utilizada no presente estudo foi de 100Hz, com a finalidade de reparo tecidual. Tal frequência tem sido utilizada em diferentes estudos

com o mesmo objetivo (Teodori et al., 2011; Arrais, 2011). Mehmandoust et al. (2007) utilizaram uma frequência de 80 Hz com o objetivo de cicatrização de feridas em cobaias.

O ácido alfa-lipóico, por sua vez, fornece suporte metabólico às células nervosas, modula a liberação de citocinas neurotróficas, reduz a inflamação e melhora o funcionamento das fibras nervosas, promovendo neuroproteção e neuroregeneração (Ziegler, 2004). Seu efeito tem sido comprovado nas neuropatias compressivas e neuropatia diabética, nas quais se observa acúmulo de radicais livres e conseqüente desencadeamento de processo inflamatório (Di Geronimo et al., 2009).

Antioxidantes tem papel importante na prevenção e tratamento do dano oxidativo e de lesão por radicais livres (Freisleben, 2000; Sherki, Melamed e Offen, 2001). O ácido alfa-lipóico é um potente antioxidante biológico (Biewenga, Haenen e Bast, 1997; Low, Nickander e Tritschler, 1997) capaz de eliminar radicais hidroxila e de oxigênio, sendo considerado um potente antioxidante lipofílico *in vitro* e *in vivo* (Packer, Witt e Tritschler, 1995).

Os efeitos neuroprotetor e antioxidante do ácido alfa-lipóico se confirmam em estudos mais recentes, como o de Zaitone, Abo-Elmatty e Shaalan (2012), que utilizaram dose de 50mg/kg de ácido alfa-lipóico em ratos Parkinsonianos, observando melhora no desempenho motor e redução do nível de peróxidos lipídicos no cérebro, quando comparado com a administração de acetil-l-carnitina e rotenona.

Sobre o efeito neuroprotetor do ácido alfa-lipóico nas lesões nervosas periféricas, é importante considerar que, após a lesão pode ocorrer uma degeneração retrógrada das células do gânglio da raiz dorsal, afetando

predominantemente as fibras aferentes cutâneas de pequeno diâmetro (Welin et al., 2008). O ácido alfa-lipóico atuaria inibindo a degeneração retrógrada após lesão nervosa periférica, além de favorecer a neuroregeneração, conforme citado por (Ziegler, 2004). Entretanto, isso não se confirmou neste estudo, o que pode sugerir a necessidade de investigação de outras variáveis, como por exemplo, a administração prévia à lesão, a variação da dose a ser utilizada, entre outras. Para fins de tratamento da lesão nervosa periférica, por se tratar de lesão traumática, que ocorre de forma abrupta e inesperada, a administração prévia de ácido alfa-lipóico não teria justificativa clínica, porém, uma alimentação contendo tal substância poderia tornar os indivíduos mais propensos a uma recuperação melhor sucedida no caso de uma lesão. Segundo Ghibu et al. (2009), as fontes mais abundantes ácido alfa-lipóico, detectado na forma de lipolisina, são: espinafre, brócolis, tomate, além do rim, coração e fígado de animais.

Mitsui et al. (1999) utilizaram uma dose de 100 mg/Kg em ratos submetidos à isquemia do nervo isquiático durante 3 e 5 horas, seguida de reperfusão e observaram o efeito neuroprotetor do ácido alfa-lipóico em nervos submetidos a 3 horas de isquemia, mas não naqueles cujo aporte sanguíneo foi interrompido por 5 horas. Os autores argumentam que, como a reperfusão resulta no aumento repentino de radicais livres durante a reoxigenação do tecido isquemiado, o máximo dano tecidual é observado durante a reperfusão, o qual é primariamente atribuído à lesão oxidativa consequente à produção de radicais livres de oxigênio. Portanto, a dose por eles utilizada foi efetiva para promover neuroproteção apenas em situação de isquemia moderada.

Neste estudo, a dose utilizada foi de 40 mg/Kg, com base no trabalho de Osfor et al. (2010), que investigaram os efeitos de alguns nutrientes em nutrição e saúde em ratos com intoxicação por cobre e chumbo. A opção por esta dose se justifica pelo fato de que, segundo Cremer et al. (2006), o ácido alfa-lipóico, aplicado nas doses 31,6 até 61,9 mg/Kg/dia durante 4 semanas não mostrou toxicidade e nem efeito adverso, porém em altas doses (121 mg/Kg/dia) altera o metabolismo e a função das enzimas hepáticas, promovendo elevação na atividade da enzima ALT e da glutamato desidrogenase, o que caracteriza lesão hepática.

Sendo assim, mesmo sabendo que doses mais elevadas exercem efeito neuroprotetor, como mostra o estudo de Mitsui et al. (1999), o fato do presente estudo ter uma duração de 8 semanas poderia trazer efeitos adversos aos animais, como a toxicidade devido ao tempo e a quantidade da dose.

Quanto ao momento de administração do ácido alfa-lipóico, Senoglu et al. (2009) aplicaram 100 mg/Kg do ácido por via intraperitoneal em ratos, 24 horas e, novamente, 1 hora antes da lesão por esmagamento do nervo isquiático, observando que houve efeito antioxidante sobre o nervo lesado. O número de axônios e as características morfométricas do nervo não foram avaliados nesse estudo, o que impossibilita uma análise comparativa com o presente estudo. Entretanto, considerando-se que a lesão traumática é imprevisível, um tratamento prévio teria pouco sentido nesse caso. Por outro lado, o estudo de diferentes dosagens poderia contribuir para a indicação mais adequada nos casos de lesão traumática de nervos.

Sobre o método de reparo utilizado, o autoenxerto de nervo é considerado “padrão ouro” na clínica (Lundborg, 2000). Quanto ao tempo de

sobrevida dos animais deste estudo, considerando que após neurotme em ratos o crescimento axonal ocorre numa velocidade média de 2 a 3 mm por dia (Fawcett e Keynes, 1990; Navarro, Vivo e Valero-Cabre, 2007) e que a sobrevida dos animais por períodos mais longos poderia ser prejudicada pela administração diária de anestésico para realização do procedimento de estimulação elétrica, optou-se por um período de sobrevida de 8 semanas, pois, segundo Le Beau, Elisman e Powell (1988) e Fields e Ellisman (1996), axônios mielínicos estariam presentes no nervo distal a partir da 5ª ou 6ª semana após do procedimento cirúrgico.

Além disso, em estudo realizado por Betini (2010), após 8 semanas de uma lesão por secção do nervo isquiático de ratos, seguida de autoenxerto de nervo, o número de axônios no enxerto e nervo distal era maior que aquele observado no nervo normal, apontando que esse tempo de sobrevida seria suficiente para permitir a identificação dos efeitos dos métodos de intervenção utilizados neste estudo.

### **Análise Morfométrica**

A maturação das fibras nervosas regeneradas inclui mudanças que culminam com a restauração das dimensões do nervo e de suas propriedades para condução do impulso nervoso, ocorrendo um aumento do calibre dos axônios e da espessura das bainhas de mielina. Esses eventos dependem do aumento da síntese de proteínas e lipídios que constituem a mielina e de proteínas do citoesqueleto nas células de Schwann e axônios (Sunderland, 1990).

Quando se analisa a recuperação espontânea das características morfológicas do nervo após autoenxerto de nervo sem considerar a forma de intervenção aplicada (grupo E), nota-se que o diâmetro dos axônios recuperou em 51,86% e o das fibras nervosas em 51,01%. Valores semelhantes foram encontrados por Betini (2010), que avaliou os resultados de autoenxerto de nervo e observou uma recuperação de 51,72% no diâmetro dos axônios e de 61,24% no diâmetro das fibras nervosas após 8 semanas da cirurgia. Ao analisar os mesmos parâmetros após 30 dias da axoniotmese, Oliveira (2008) identificou 54,65% de recuperação no diâmetro dos axônios e 68,7% no diâmetro das fibras nervosas.

A recuperação mais expressiva após axoniotmese, mesmo após 4 semanas da lesão, pode ser consequência da presença de menores restrições ao brotamento e crescimento axonal nesse tipo de lesão, onde não há interrupção do epineuro e, por isso, não há necessidade de sutura para reconexão dos cotos nervosos, como ocorre na neurotmese, o que leva à cicatrização e formação de barreira mecânica ao crescimento axonal (Lunn, Brown e Perry, 1990; Pachione et al., 2006), além do que as alterações musculares, como a atrofia e proliferação conjuntiva persistem por tempo mais curto na axoniotmese, uma vez que a recuperação funcional é mais rápida.

Quando se compara os grupos submetido à EEAV (E+AV) e tratado com ácido alfa-lipóico (AL), nota-se que o diâmetro dos axônios diferiu entre os grupos, apresentando valores mais elevados no grupo E+AV, mas não o diâmetro das fibras ou a espessura das bainhas de mielina.

Lu et al. (2008) avaliaram o efeito da estimulação elétrica sobre a remielinização de axônios regenerados após secção do nervo isquiático de

ratos, comparando diferentes frequências (1 Hz, 2 Hz, 20 Hz e 200 Hz) com intensidade de 1mA, durante 6 semanas, iniciando uma semana após a lesão, em dias alternados, 15 minutos/dia. Utilizaram um eletrodo de agulha de aço inoxidável (cátodo) na região lateral do joelho e um ânodo posicionado em torno da articulação do quadril. O grupo tratado com 200 Hz apresentou densidade média de axônios mielinizados significativamente maior que o grupo que não recebeu a eletroestimulação. Estes resultados reforçam a influência de frequências mais altas (acima de 100 Hz) para o reparo tecidual. Entretanto, os autores não explicitaram quais os parâmetros da corrente utilizada.

Contrariando esses resultados, o estudo de Baptista et al. (2008), que utilizaram a Estimulação Elétrica Neuromuscular Transcutânea (TENS) após esmagamento de nervo em ratos, mostrou que a baixa frequência foi mais efetiva para a regeneração nervosa que frequência mais alta. Um grupo de animais recebeu eletroestimulação com frequência de 100 Hz, enquanto outro recebeu eletroestimulação com frequência de 4Hz e um terceiro grupo não foi tratado com eletroestimulação após esmagamento do nervo isquiático (controle). A eletroestimulação teve duração de 30 min por dia, 5 dias por semana, durante 5 semanas. Todos os grupos alcançaram recuperação funcional após 5 semanas. O diâmetro dos axônios e das fibras nervosas no grupo controle e naquele tratado com alta frequência (100 Hz) não atingiram valores de normalidade, o que ocorreu no grupo tratado com baixa frequência (4 Hz).

Resultados divergentes podem ser explicados por: diferentes tipos de lesão, sendo que a recuperação após esmagamento é mais rápida e com melhor prognóstico que após secção do nervo; diferentes formas de

eletroestimulação; diferentes parâmetros utilizados; entre outros, o que impossibilita uma comparação fidedigna entre os estudos citados e o presente estudo.

Neste estudo, nenhuma das variáveis morfométricas diferiu entre os grupos E+AV e E+AV+AL, sugerindo que o ácido alfa-lipóico não apresentou qualquer influência no processo de regeneração e maturação das fibras nervosas regeneradas.

No grupo E+AV+AL o número de axônios foi menor que em todos os demais grupos desnervados, sendo este valor bem inferior aos valores controle, apesar de não ter havido diferença estatística em relação ao grupo CON. Por outro lado, quando se avalia as características morfométricas desses axônios regenerados, nota-se que sua maturação foi semelhante aos demais grupos desnervados. Este fator poderia ser positivo se a recuperação funcional para a marcha tivesse sido significativa, o que não foi verdadeiro, sugerindo que a associação entre E+AV e administração de ácido alfa-lipóico foi prejudicial à regeneração nervosa. Para compreender as possíveis causas deste resultado, outros estudos devem explorar, especialmente, a dose, via de administração, entre outros fatores, levando-se em consideração o risco de toxicidade e efeitos adversos, conforme apontado por Cremer et al. (2006).

Reis et al. (2009), após neurotmesa e anastomose epineural no nervo isquiático de ratos, aplicaram irradiação a laser (Arseneto de Gálio) durante 20 dias, com comprimento de onda de 600 nm, potência de 26,3 mW, área de raio de  $0,63 \text{ cm}^2$ , no modo contínuo. A análise histomorfométrica mostrou aumento significativo da espessura da bainha de mielina em relação ao grupo controle (lesão apenas), porém não houve melhora funcional, sendo este um aspecto de



grande importância para se considerar diferentes formas de intervenção na clínica.

No estudo de Teodori et al. (2011), com ratos submetidos a esmagamento do nervo isquiático e aplicação de EEAV que seguiu os mesmos parâmetros utilizados neste estudo, a análise morfométrica realizada 21 dias após a lesão mostrou semelhança no número de axônios entre o grupo controle e o tratado com EEAV. Entretanto, o diâmetro dos axônios, apesar de maior que no grupo não tratado, não alcançou os valores controle, mas o diâmetro das fibras nervosas e a espessura das bainhas de mielina foram semelhantes ao controle, apontando o papel da EEAV em acelerar a maturação das fibras regeneradas.

Isso poderia ser explicado pelo fato de a EEAV atuar na melhora do fluxo sanguíneo, auxiliando na redução de edema e redução de tecido necrosado (Gentzkow, 1993), ter efeito bactericida (Kincaid e Lavoie, 1989), promover vasodilatação arteriolar e neovascularização (Goldman et al., 2004), podendo favorecer a regeneração.

Considerando os parâmetros morfométricos utilizados neste estudo, uma observação interessante é que a utilização da EEAV não influenciou a maturação das fibras nervosas regeneradas após autoenxerto de nervo, como ocorreu no estudo de Teodori et al. (2010), que avaliaram o efeito deste recurso na axoniotmese. Acredita-se que isso esteja relacionado ao tipo de lesão (neurotmese), onde inúmeras intercorrências podem estar presentes, como a presença de cicatriz no local da sutura, a possibilidade de crescimento axonal no interior de tubos endoneurais funcionalmente inapropriados (Burnett e Zager, 2004), entre outras, bem como ao tempo de duração do tratamento (8

semanas), sendo recomendável uma análise com períodos maiores de sobrevida.

A razão G é um parâmetro que corresponde à velocidade de condução do impulso nervoso através do nervo. Quando este valor está entre 0,5 e 0,7 a velocidade de condução nervosa é considerada normal (Ansellin, Fink e Davey, 1997). Neste estudo, os valores de razão G estavam dentro da normalidade, mostrando uma proporcionalidade entre diâmetro do axônio e diâmetro da fibra nervosa, sugerindo que, em todos os grupos, a velocidade de condução nervosa teria sido recuperada.

A avaliação funcional da regeneração nervosa periférica em animais é um fator experimental desafiador. Embora os nervos sejam capazes de regenerar espontaneamente, sem qualquer tratamento, a completa recuperação da função quase nunca ocorre após reparo microcirúrgico do nervo (Sunderland, 1985; Battiston et al., 2009) e os resultados clínicos são ainda insatisfatórios (Battiston et al., 2009).

Burnett e Zager (2004) citam que o retorno da função não requer uma recuperação absolutamente completa da arquitetura do nervo, entretanto, acredita-se que o sucesso da recuperação morfológica do nervo está relacionado à recuperação de sua função. Por este motivo, neste estudo, realizou-se uma análise que levou em consideração esta relação.

Neste estudo, ao final de 8 semanas, nenhum grupo desnervado alcançou recuperação funcional, pois os valores de IFC variaram entre - 77 e - 88, quando o valor de normalidade definido por De Medinaceli, Freed e Wyatt (1982) é considerado entre 0 e -20. Isso indica que a recuperação morfológica do nervo ainda estaria em franco processo de desenvolvimento.

Huang et al. (2009), após transecção do nervo femoral de ratos, aplicaram estimulação elétrica uma única vez (pulsos quadrados de 0.1ms e 20Hz de frequência, por 1 hora). Dois fios de cobre foram inseridos no coto proximal da lesão e outro eletrodo (anódica) foi fixado em um músculo próximo à lesão. Após 12 semanas, observaram que o grupo eletroestimulado apresentou função melhor na 4ª a 8ª semana pós operatória em relação ao grupo Sham (sofreu a lesão, porém os eletrodos foram mantidos desligados), sendo que a partir da 10ª semana, os grupos apresentaram melhora funcional semelhante.

Nesse estudo de Huang et al. (2009), mesmo se tratando de neurotinese, a melhora funcional inicia mais precocemente em função de a lesão ter sido mais distal (nervo femoral) em relação a este estudo (nervo isquiático), o que possibilita evidenciar resultados funcionais mais precocemente, ou seja, já a partir da 4ª semana após a lesão.

No presente estudo apenas o grupo AL, o qual não foi desnervado, continuou apresentando função normal entre o 7º e o 63º dia de avaliação, marcando valores que variaram de -5 a -16.

Em estudo realizado por Di Geronimo et al. (2009) envolvendo 112 indivíduos com síndrome do túnel do carpo, tratados com doses do ácido alfa-lipóico (56 indivíduos) e com uma preparação de multivitamínico B (56 indivíduos), observou-se que o grupo tratado com ácido alfa-lipóico apresentou melhora significativa, tanto nos sintomas como nas deficiências funcionais dos nervos danificados, comparado ao grupo tratado com o multivitamínico.

A recuperação funcional depende da recuperação morfológica do nervo, porém, o órgão alvo também tem papel importante. Por ser lento o processo de

regeneração nervosa após neurotome, a inatividade do músculo associada à desnervação leva à instalação da atrofia muscular (Robinson, 2000). As alterações morfológicas incluem diminuição da massa muscular e da área de secção transversa das fibras (Decherchi et al., 2003), aumento do tecido conjuntivo ao redor das fibras musculares (Purslow, 2002), entre outros. Carter et al. (1998) citam que o acúmulo de tecido conjuntivo intersticial dificulta a troca de substâncias entre o leito vascular e as fibras musculares, atua como barreira mecânica ao crescimento axonal e à difusão de fatores de crescimento nervoso durante a reinervação muscular. Uma análise morfológica dos músculos desnervados não foi realizada neste estudo, entretanto, conforme citado na literatura, é possível que as alterações musculares comuns após desnervação também tenham contribuído para a falha da recuperação funcional neste estudo.

Como limitações do estudo consideram-se: a impossibilidade de avaliar por período maior que 8 semanas devido à necessidade de sedação diária dos animais para eletroestimulação, o que limitou a observação das características morfológicas e funcionais em períodos mais longos de sobrevivência; a perda de animais decorrente de anestesia diária; a ausência de um grupo SHAM; a impossibilidade de administração de diferentes doses de ácido alfa-lipóico, pois ampliaria excessivamente o número de animais do estudo.

Como implicações clínicas consideram-se a importância de estudos com animais para a identificação dos efeitos e adequação dos protocolos de intervenção com vistas à futura utilização para o tratamento das lesões nervosas periféricas em humanos; o fato de que a EEAV é um recurso acessível e de custo relativamente baixo, já utilizado na clínica, porém com

objetivos distintos daqueles relacionados à regeneração nervosa periférica; a importância da associação entre recursos físicos e medicamentosos para acelerar a recuperação de lesões; a necessidade de proposição de novos parâmetros, como a utilização de diferentes frequências ou estimular em limiar submotor, a associação de dois recursos fisioterapêuticos como a EEAV e o Laser, entre outros, o que poderia possibilitar um resultado clínico mais eficiente e rápido.

Em futuros estudos, o grupo de pesquisa pretende associar as alterações morfológicas e funcionais do nervo às características morfológicas do músculo, realizando intervenção simultânea no nervo e no músculo para investigar a influência do segundo no sucesso da recuperação da lesão. Além disso, uma investigação da dose e formas de administração do ácido alfa-lipóico deverá ser desenvolvida.

## **CONCLUSÃO**

O protocolo de eletroestimulação aplicado, assim como o tratamento com ácido alfa-lipóico e a associação de ambos não favoreceram o brotamento e maturação das fibras nervosas após autoenxerto de nervo, bem como a recuperação funcional em ratos submetidos a autoenxerto de nervo após 8 semanas de tratamento.

## REFERÊNCIAS\*

Ansselin AD, Fink T, Davey DF. Peripheral nerve regeneration through nerveguides seeded with schwann cells. *Neurophatol Applied Neurobiol.* 1997; 23(5): 387-398.

Al-Majed AA, Neuman CM, Brushart TM, Gordon T. Brief electrical stimulation promotes the speed and accuracy of motor axonal regeneration. *J Neurosci.* 2000; 20(7): 2602-8.

Almeida AFN, Berni KCS, Rodrigues-Bigaton D. Effect of Treatment with HVES on pain and electromyography activity in patients with TMD. *Electromyogr Clin Neurophysiol.* 2009; 49(5): 245-254.

Arrais LDF. Efeitos da estimulação elétrica de alta voltagem com alternância de polaridade na lesão tegumentar: análise histopatológica em ratos [Dissertação] 50p Piracicaba: UNIMEP, 2011.

Atkins S, Smith KG, Loescher AR, Boissonade FM, Ferguson MW, Robinson PP. The effect of antibodies to TGF-beta1 and TGF-beta 2 at a site of sciatic nerve repair. *J Peripher Nerv Syst.* 2006; 11(4): 286–293.

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

Baptista AF, Gomes JR, Oliveira JT, Santos SM, Vannier-Santos MA, Martinez AM. High- and low-frequency transcutaneous electrical nerve stimulation delay sciatic nerve regeneration after crush lesion in the mouse. *J Peripher Nerv Syst.* 2008; 13(1): 71-80.

Battiston B, Raimondo S, Tos P, Gaidano V, Audisio C, Scevola A, et al. Tissue engineering of peripheral nerves. *Int Rev Neurobiol.* 2009; 87: 227-249.

Betini J. Influência do exercício de natação no processo de regeneração nervosa, reinervação muscular e recuperação funcional em ratos após neurotmesa. [Dissertação] 119p Piracicaba: UNIMEP, 2010.

Bettany JA, Fish DR, Mendel FC. Influence of high voltage pulsed direct current on edema formation following impact injury. *Phys Ther.* 1990; 70(4): 219-224.

Biewenga GP, Haenen GR, Bast A. The pharmacology of the antioxidant lipoic acid. *Gen Pharmacol.* 1997; 29(3): 315–31.

---

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

Burnett MG, Zager EL. Pathophysiology of peripheral nerve injury: a brief review. *Neurosurg Focus*. 2004; 16(5): 1-7.

Burt CM. Avaliação do trabalho e preparação para o retorno ao trabalho. In: Pedretti LW, Early MB. *Terapia ocupacional: capacidades práticas para disfunções físicas*. 2005. p. 241-254.

Byl NN. Estimulação elétrica para a reparação tecidual: informações básicas. In: Nelson RM, Hayes KW, Currier DP. *Eletroterapia clínica*. São Paulo: Manole; 2003. p. 183-44.

Carter AJ, Kristmundsdottir F, Gilmour J, Glasby MA. Changes in muscle cytoarchitecture after peripheral nerve injury and repair. *J Hand Surg*. 1998; 23(3): 265-269.

Cook HA, Morales M, La Rosa EM, Dean J, Donnelly MK, Mchugh P. Effects of electrical stimulation on lymphatic flow and limb volume in the rat. *Phys Ther*. 1994; 74(11): 1040-1046.

Coppey LJ, Gellett JS, Davidson EP, Dunlap JA, Lund DD, Yorek MA. Effect of antioxidant treatment of streptozotocin-induced diabetic rats on endoneurial blood flow, motor nerve conduction velocity, and vascular reactivity of epineurial arterioles of the sciatic nerve. *Diabetes*. 2001; 50(8): 1927-1937.

Cremer DR, Rabeler R, Roberts A, Lynch B. Safety evaluation of alpha-lipoic acid (ALA). *Regul Toxicol Pharmacol*. 2006; 46(1): 29-41.

Daeschlein G, Assadian O, Kloth LC, Meinl C, Ney F, Kramer A. Antibacterial activity of positive and negative polarity low-voltage pulsed current (LVPC) on six typical Gram-positive and Gram-negative bacterial pathogens of chronic wounds. *Wound Repair Regen*. 2007; 15(3): 399-403.

Davini R, Nunes CV, Guirro ECO e Guirro RRJ. Estimulação elétrica de alta voltagem: uma opção de tratamento. *Rev Bras de fisioter*. 2005; 9(3): 249-256.

Decherchi P, Dousset E, Marqueste T, Berthelin F. Électromyostimulation et recuperation fonctionnelle d'un muscle dénervé. *Sci Sports*. 2003; 18(5): 253-263.

De Medinacelli L, Freed WJ, Wyatt RJ. An index of the functional condition of rat sciatic nerve based on measurements made from walking tracks. *Exp Neurol*. 1982; 77(3): 634-643.

Di Geronimo G, Caccese AF, Caruso L, Soldati A, Passaretti U. Treatment of carpal tunnel syndrome with alpha-lipoic acid. 2009; 13: 133-139.

Evans GR. Peripheral nerve injury: a review and approach to tissue engineered constructs. *Anat Rec*. 2001; 263(4): 396-404.



Fawcett JW, Keynes RJ. Muscle basal lamina: a new graft material for peripheral nerve repair. *J Neurosurg*. Springfield. 1986; 65(3): 354-363.

Fields RD, Ellisman MH. Axons regenerated through silicone tube splices. II. Functional morphology. *Exp Neurol*. New York. 1996; 92(1): 61-74.

Fontes VO. Estimulação elétrica de alta voltagem como alternativa para o tratamento da lesão nervosa periférica [dissertação de mestrado] 00p. Piracicaba: UNIMEP, 2009.

Freisleben HJ: Lipoic acid reduces ischemia-reperfusion injury in animal models. *Toxicology*. 2000; 148(2-3): 159-71.

Garcia LB. Estudo comparativo dos efeitos da estimulação elétrica de alta voltagem e da massagem de drenagem linfática no linfedema pós-mastectomia [dissertação]. Piracicaba, SP: Universidade Metodista de Piracicaba; 2004.

Gentzkow GD Electrical stimulation to heal dermal wounds. *J Dermatol Surg Oncol*. 1993; 19(8): 753-8.

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. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2009; 54(5): 391-8.

Gigo-Benato D, Geuna S, Rochkind S. Phototherapy for enhancing peripheral nerve repair: A review of the literatura. *Muscle Nerve*. 2005; 31(6): 694-701.

Gigo-Benato D, Russo T, Tanaka E, Assis L, Salvini T, Parizzoto N. Effects of 660 and 780 nm low-level laser therapy on neuromuscular recovery after crush injury in rat sciatic nerve. *Lasers Surg Med*. 2010; 42(9): 673-682.

Goldman R, Rosen M, Brewley B, Golden M. Electrotherapy promotes healing and microcirculation of infrapopliteal ischemic wounds: a prospective pilot study. *Adv skin wound care*. 2004; 17(6): 284-94.

Griffin JW, Newsome LS, Stralka SW, Wright PE. Reduction of chronic posttraumatic hand edema: a comparison of high voltage pulsed current, intermittent pneumatic compression, and placebo treatments. *Phys Ther*. 1990; 70(5): 279-286.

Houghton PE, Kincaid CB, Lovell M, Campbell KE, Keast DH, Gail-Woodbury M, et al. Effect of electrical stimulation on chronic leg ulcer size and appearance. *Phys Ther*. 2003; 83: 17- 28.

Huang J, Hu X, Lu L, Ye Z, Wang Y, Luo Z. Electrical stimulation accelerates motor functional recovery in autograft-repaired 10 mm femoral nerve gap in rats. *J Neurotrauma*. 2009; 26(10): 1805-13.

Ijkema-Paassen J, Jansen K, Gramsbergen A, Meek MF. Transection of peripheral nerves, bridging strategies and effect evaluation. *Biomaterials*. 2004; 25(9): 1583-1592.

Im MJ, Lee WPA, Hoopes JE. Effect of electrical stimulation on survival of skin flaps in pigs. *Phys Ther*. 1990; 70(1): 37-40.

Jacob S, Henriksen EJ, Tritschler HJ, Augustin HJ, Dietze GJ. Improvement of insulin-stimulated glucose disposal in type 2 diabetes after repeated parenteral administration of thioctic acid. *Exp Clin Endocrinol Diabete* 104: 284–288, 1996.

Kantor G, Alon G, Ho HS. The effects of selected stimulus waveform on pulse and phase characteristics at sensory and motor thresholds. *Phys Ther* 1994; 74(10): 951-62.

Karnes JL, Mendel FC, Fish DR, Burton HW. High-voltage pulsed current: its influences on diameters of histamine-dilated arterioles in hamster cheek pouches. *Arch Phys Med Rehabil*. 1995; 76(4): 381-386.

Kern H, Hofer C, Modlin M, Forstner C, Raschka-Hogler D, Mayr W, et al. Denervated muscles in humans: limitations and problems of currently used functional electrical stimulation training protocols. *Artif Organs*. 2002; 26(3): 216-218.

Kincaid CB, Lavoie KH. Inhibition of bacterial growth in vitro following stimulation with high voltage, monophasic, pulsed current. *Phys Ther*. 1989; 69 (8): 651-5.

Koopmans G, Hasse B, Sinis N. The role of collagen in peripheral nerve repair. *Int Rev Neurobiol*. 2009; 87: 363–379.

Kouyoumdjian AJ. Peripheral nerve injuries: a retrospective survey of 456 cases. *Muscle Nerve*. 2006; 34(6): 785-788.

Lampe KE. Electrotherapy in tissue repair. *J Hand Ther*. 1998; 11(2): 131-138.

Le Beau JM, Elisman MH, Powell HC. Ultrastructural and morphometric analysis of long-term peripheral nerve regeneration through silicon tubes. *J Neurocytol*. 1988; 17(2): 161-172.

Lee SK, Wolfe SW. Peripheral nerve injury and repair. *Am Acad Ortho Surg* 2000; 8(4): 243-52.

Lopes EI. Aspectos sociais e econômicos dos traumatismos da Mão In: Pardini AG. *Traumatismos da mão*. 3ª ed. São Paulo: Medsi, 2000.

Low PA, Nickander KK, Tritschler HJ. The roles of oxidative stress and antioxidant treatment in experimental diabetic neuropathy. *Diabetes*. 1997; 46(2): 38-42.

Lu MC, Ho CY, Hsu SF, Lee HC, Lin JH, Yao CH, Chen YS. Effects of Electrical Stimulation at Different Frequencies on Regeneration of Transected Peripheral Nerve. *Neurorehabil Neural Repair*. 2008; 22(4): 367-73.

Lundborg G. Nerve regeneration and repair. *Acta Orthop Scand*. 1987; 58: 145-69.

Lundborg G. A 25-year perspective of peripheral nerve surgery: Envolving neuroscientific concepts and clinical significance. *J Hand Surg*. 2000; 25(3): 391-414.

Lundborg G. *Nerve injury and repair*, 2nd edition. Edinburg: churchill Livingstone; 2005.

Lunn ER, Brown MC, Perry VH. The pattern of axonal degeneration in the peripheral nervous system varies with different types of lesion. *Neurosci*. 1990; 35(1): 157-65.

Machado ABM. *Neuroanatomia funcional*. 2ª ed. SãoPaulo: Atheneu, 2000, 363p.

Mehmandoust FG, Torkaman G, Firoozabadi M, Talebi G. Anodal and cathodal pulsed electrical stimulation on skin wound healing in guinea pigs. *J Rehabil Res Dev*. 2007; 44 (4): 616-8.

McAllister RM, Gilbert SE, Calder JS, Smith PJ. The epidemiology and management of upper limb peripheral nerve injuries in modern practice. *J Hand Surg Br*. 1996; 21(1): 4-13.

Mendonça AC, Barbieri CH, Mazzer N. Directly applied low intensity direct electric current enhances peripheral nerve regeneration in rats. *J Neurosci Meth*. 2003; 129(2): 183-190.

Millesi H. Techniques for nerve grafting. *Hand clin*. 2000; 16(1): 73-91.

Mitsui Y, Schmelzer JD, Zollman PJ, Mitsui M, Tritschler HJ, Low PA, et al. Alpha-lipoic acid provides neuroprotection from ischemia-reperfusion injury of peripheral nerve. *J Neurol Sci*. 1999; 163(1): 11-16.

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

Navarro X, Vivo M, Valero-Cabre A. Neural plasticity after peripheral nerve injury and regeneration. *Prog Neurobiol*. 2007; 82(4): 163-201.

Nelson RM, Hayes KW, Currier DP. *Clinical Electrotherapy*. Prentice Hall, 1999.

Ngeow WC, Atkins S, Morgan CR, Metcalfe AD, Boissonade FM, Loescher AR, Robinson PP. The effect of Mannose-6-Phosphate on recovery after sciatic nerve repair. 2011; 1394: 40-48.

Oliveira LS. Regeneração nervosa e recuperação funcional após eletroestimulação muscular e exercício de natação na fase aguda da axniotmese [Dissertação] 128p Piracicaba: UNIMEP, 2008.

Oliveira LS, Sobral LL, Takeda SYM, Betini J, Guirro RRJ, Somazz MC, et al. Estimulación eléctrica y natación en la fase aguda de la axonotmisis: influencia sobre la regeneración nerviosa y la recuperación funcional. Rev Neurol. 2008; 47(1): 11-5.

Omura T, Sano M, Omura K, Hasawa T, Doi M, Sawada T, et al. Different expressions of BDNF, NT3, and NT4 in muscle and nerve after various types of peripheral nerve injuries. J Peripher Nerv Syst. 2005; 10(3): 293-300.

Osfor MMH, Ibrahim HS, Mohamed YA, El Azeem SMAAS, Hegazy AM. Effect of Alpha Lipoic Acid and Vitamin E on Heavy Metals Intoxication in Male Albino Rats. Journal American Science. 2010; 6(8): 56-63.

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

Park JS, Lee HJ, Han CS, Chung DW, Kim GY. Effect of Hyaluronic Acid-Carboxymethylcellulose Solution on Perineural Scar Formation after Sciatic Nerve Repair in Rats. Clin Orthop Surg. 2011; 3(4): 315-324.

Packer L, Witt EH, Tritschler HJ. Alpha-lipoic acid as a biological antioxidant. [Review]. Free Rad Biol Med. 1995; 19(2): 227-50.

Peters EJ, Lavery LA, David GA, Fleischli JG. Electric Stimulation as an Adjunct to Heal Diabetic Foot Ulcers: A Randomized Clinical Trial. Arch Phys Med Rehabil. 2001; 82(6): 721-5.

Purslow PP. The structural and functional significance of variations in the connective tissue within muscle. Comp Biochem Physiol. 2002; 133(4): 947-966.

Reis FA, Belchior ACG, Carvalho PTC, Silva BAK, Pereira DM, Silva IS, et al. Effect of laser therapy (660 nm) on recovery of the sciatic nerve in rats after injury through neurotmesis followed by epineural anastomosis. Lasers Med Sci. 2009; 24(5): 741-747.

Robinson AJ, Snyder-Mackler L. Clinical electrophysiology: electrotherapy and electrophysiology testing. Ed. Williams & Wilkins, 1995.

Robinson LR. Traumatic injury to peripheral nerves. *Muscle Nerve*. 2000; 23(6): 863-73.

Santo Neto H, Pertille A, Teodori RM, Somazz MC, Marques MJ. Primary nerve repair by muscle autografts prepared with local anesthetic. *Microsurgery*. 2004; 24(3): 188-93.

Seddon HJ. Three types of nerve injury. *Brain*. 1943; 66:237-88. In: Burnett MG, Zager EL. Pathophysiology of peripheral nerve injury: a brief review. *Neurosurg Focus*. 2004; 16(5): E1.

Senoglu M, Nacitarhan V, Kurutas EB, Senoglu N, Altun I, Yalcin Atli Y, et al. Intraperitoneal Alpha-Lipoic Acid to prevent neural damage after crush injury to the rat sciatic nerve. *J Brachial Plex Peripher Nerve Inj*. 2009; 25: 4(22): 1-6.

Sheffler LR, Chae J. Neuromuscular electrical stimulation in neurorehabilitation. *Muscle Nerve*. 2007; 35(5): 562-90.

Sherki G, Melamed Y, Offen ED. Oxidative stress induced-neurodegenerative diseases: the need for antioxidants that penetrate the blood brain barrier. *Neuropharmacology* 2001, 40(8): 959-75.

Sunderland S. *Nerve and Nerve Injure*. 2<sup>a</sup> ed. London: Churchill Livingstone; 1985.

Sunderland S. The anatomy and physiology of nerve injury. *Muscle Nerve*. 1990; 13(9): 771-784.

Sunderland S. Nerve and nerve injuries. 2nd ed. London: Churehill Livingston; 1978. In: Burnett MG, Zager EL. Pathophysiology of peripheral nerve injury: a brief review. *Neurosurg Focus*. 2004; 16(5): E1.

Snyder-Mackler L. Estimulação elétrica para reparo do tecido. In: Robinson AJ, Snyder-Mackler L. *Eletrofisiologia Clínica: eletroterapia e teste eletrofisiológico*. Porto Alegre: Artmed; 2001. p. 279- 17.

Szuminsky NJ, Albers AC, Unger P, John GE. Effect of narrow, pulsed high voltages on bacterial viability. *Phys Ther*. 1994; 74(7): 660-67.

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

Teodori RM, Silva AM, Silva MT, Oliveira LS, Polacow MLO, Guirro EC. High-voltage electrical stimulation improves nerve regeneration after sciatic crush injury. *Rev Bras Fisioter*. 2011; 15(4): 325-31.

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

Wang X, Wang Z, Yao Y, Li J, Zhang X, Li C, et al. Essential role of ERK activation in neurite outgrowth induced by  $\alpha$ -lipoic acid. *Biochim Biophys Acta.* 2011; 1813(5): 827-838.

Weiselmann-Penkner K, Janda M, Lorenzoni M, Polansky R. A comparison of the muscular relaxation effects of TENS and EMG-biofeedback in patients with bruxism. *J Oral Rehabil.* 2001; 28(9): 849-853.

Welin D, Novikova LN, Wiberg M, Kellerth JO, Novikov LN. Survival and regeneration of cutaneous and muscular afferent neurons after peripheral nerve injury in adult rats. *Exp Brain Res.* 2008; 186(9): 315-323.

Wolford LM, Stevao ELL. Considerations in nerve repair. *Proc Bayl Univ Med Cent.* 2003; 16(2): 152-156.

Zaitone SA, Abo-Elmatty DM, Shaalan AA. Acetyl-L-carnitine and  $\alpha$ -lipoic acid affect rotenone-induced damage in nigral dopaminergic neurons of rat brain, implication for Parkinson's disease therapy. *Pharmacol Biochem Behav.* 2012; 100(3): 347-60.

Ziegler D. Thioctic acid for patients with symptomatic diabetic polyneuropathy: a critical review. *Treat Endocrinol.* 2004; 3(3): 173- 189.

## ANEXO



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA  
Comissão de Ética no Uso de Animais  
Via Washington Luis, km. 235 - Caixa Postal 676  
Fones: (016) 3351.8025 / 3351.9679  
Fax: (016) 3351.8025  
CEP 13560-970 - São Carlos - SP - Brasil  
[ceua@ufscar.br](mailto:ceua@ufscar.br) - [www.proppg.ufscar.br](http://www.proppg.ufscar.br)

**Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais**  
**nº 080/2010**

Protocolo nº. 052/2010

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Carlos - CEUA/UFSCar **APROVOU** o projeto "*Influência da estimulação elétrica de alta voltagem e do ácido lipóico na recuperação morfológica e funcional do nervo isquiático de ratos após autoenxerto de nervo*" apresentado pela pesquisadora Rosana Macher Teodori.

São Carlos, 15 de dezembro de 2010.

  
Prof. Dra. Luciana Thie Seki Dias

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais