

EFEITOS DE CAMPOS ELETROMAGNÉTICOS NA REGENERAÇÃO NERVOSA PERIFÉRICA

Abrahão Fontes Baptista

**Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências
Morfológicas da Universidade Federal do Rio de Janeiro, visando a
obtenção do título de Doutor em Ciências.**

Rio de Janeiro, dezembro de 2007.

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.



Universidade Federal do Rio de Janeiro
Instituto de Ciências Biomédicas
Departamento de Histologia e Embriologia

Efeitos de Campos Eletromagnéticos na Regeneração Nervosa
Periférica

Abrahão Fontes Baptista

Trabalho realizado no Laboratório de Neurohistologia e Ultraestrutura do Departamento de Histologia e Embriologia da UFRJ, na Unidade de Microscopia Eletrônica do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz / FIOCRUZ e no Laboratório de Pesquisas da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública sob orientação da Prof. Dra. Ana Maria Blanco Martinez e do Prof. Dr. Marcos André Vannier-Santos.

Rio de Janeiro, dezembro de 2007

FICHA CATALOGRÁFICA

Baptista, Abrahão Fontes

Efeitos de Campos Eletromagnéticos na Regeneração Nervosa Periférica.

Rio de Janeiro: UFRJ/ICB, 2007.

pp. 142

Orientadores: Ana Maria Blanco Martinez e Marcos André Vannier-Santos

Tese: Doutorado em ciências morfológicas

1. Regeneração 2. Nervo ciático 3. Testes funcionais 4. Eletroestimulação nervosa transcutânea 5. Campo eletromagnético pulsado de baixa frequência 6. Ultraestrutura

Tese submetida ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfológicas da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Ciências Morfológicas.

Aprovada em ____ de _____ 2007 pela banca examinadora.

Prof. Dra. Ana Maria Blanco Martinez
Depto. de Histologia - ICB - CCS - UFRJ
Orientadora

Prof. Dr. Marcos André Vannier-Santos
Laboratório de Biologia Parasitária / Unidade de Microscopia Eletrônica - CPqGM -
FIOCRUZ/BA
Co-orientador

Prof. Dr. Nivaldo Antônio Parizotto
Departamento de Fisioterapia - UFSCar
Examinador

Prof. Dr. Osvaldo José Moreira do Nascimento
Departamento de Medicina Clínica - UFF
Examinador

Prof. Dr. Roberto Lent
Departamento de Anatomia - ICB - CCS - UFRJ
Examinador

Prof. Dr. Zilton Araújo Andrade
Laboratório de Patologia Experimental - CPqGM - FIOCRUZ/BA
Revisor

Prof. Dr. Paulo de Assis Melo
Departamento de Farmacologia Básica e Experimental - ICB - CCS - UFRJ
Suplente

Prof. Dra. Silvana Allodi
Departamento de Histologia e Embriologia - ICB - CCS - UFRJ
Suplente

INSTITUIÇÕES ENVOLVIDAS

UFRJ - Universidade Federal do Rio de Janeiro

FIOCRUZ - Fundação Oswaldo Cruz

EBMSP - Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública

FONTES DE FINANCIAMENTO

CNPq - Conselho Nacional de Pesquisa

FAPESB - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia

FAPERJ - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro

EBMSP - Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública

AGRADECIMENTOS

Agradecer por uma conquista como esta me parece muito complexo, pois existe muito envolvido neste feito. Por isso gostaria primeiro de agradecer a tudo e todos que conheço e não conheço e que me ajudaram ou permitiram que eu pudesse chegar aqui. Algumas pessoas, entretanto, participaram diretamente desta construção, quer diretamente ou indiretamente:

- Minha esposa Katia, submeteu-se a grandes mudanças e esteve do meu lado com uma presença que me fortalece. A sua revisão do texto final também foi preciosa e essencial. Que eu possa em algum momento pagar a altura pelo seu apoio;

- Tarcísio, Tiago e Isadora são motivações constantes em minha vida. São pessoas muito especiais para mim e suas existências são suficientes para me alimentar;

- Minha família de origem, assim como a família de minha esposa, nos ajudaram com seu carinho, cuidado e desejo de que tudo desse certo, e a eles sou muito grato - Jorge, Dione, Rachel, Ilana, Anna, Pedro, Larissa, Armando, Íris, Maristela, Cláudia, Jacqueline, Igor e Marcela;

- Meus orientadores foram especiais: A Prof. Ana Martinez tem para mim o mais alto valor, devido a seu apoio preciso e encorajador e a confiança que depositou em mim. Ela será sempre um modelo de como ajudar alguém a construir algo. Ao Prof. Marcos André Vannier-Santos devo também a sua confiança, relação amiga e as possibilidades que me ofereceu neste período.

- Meus colegas de laboratório foram essenciais, com sua participação no dia-a-dia e apoio sempre irrestrito. Agradeço especialmente a Fátima Rosalina, que apesar de distante está sempre próxima, Cláudio Pereira Figueira, que me ensinou muito do que sei, Adriana

Rangel, sempre disposta a ajudar e a viabilizar tudo o que se necessita e Diego Menezes, que sempre me mostra o que é um dom.

- Aos professores Humberto de Castro Lima, Maria Luiza Soliane e Roseny Ferreira e ao Professor Celso Figueirôa *in memoriam* por me apoiarem como pesquisador.

- Aos alunos Bruno Góes, João Zugaib, Joyce Rios Gomes, Júlia Teixeira Oliveira e Soraia Garzedim, que estiveram próximos todo o tempo, formando uma convivência motivadora e que sem eles tudo seria praticamente impossível.

- Ao Prof. Maurício Pires, pelas ricas discussões envolvendo temas de física relacionados e aos Profs. Israel Souza, Marcos Aguiar e Maurício Cardeal, pelas discussões sobre estatística.

- A Eridã Almeida, pelo cuidado carinhoso e atento com os nossos animais de laboratório e por sua disponibilidade.

A vida só é real quando “eu sou”.
G.I. Gurdjieff

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AMPC	Adenosina monofosfato cíclico
ATP	Adenosina trifosfato
BB	Bandas de Büngner
BDNF	Brain derived neurotrophic factor
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
CCK	Colecistocinina
CEM	Campo eletromagnético
CEMP	Campo eletromagnético pulsado de baixa frequência
CGRP	<i>Calcitonin gene related peptide</i>
CL	Correntes de lesão
Cox	Prostaglandina sintase
CP	Comprimento da pegada
CS	Células de Schwann
Cx43	Conexina 43
DM	Diabetes Melitus
DP	Distância entre as pegadas
DW	Degeneração Walleriana
ED	Espalhamento dos dedos
EENT	Eletroestimulação nervosa transcutânea
EENT A	EENT acupuntura
EENT C	EENT convencional
EID	Espalhamento intermediário dos dedos
EO	Estresse oxidativo
ERO	Espécies reativas de oxigênio
FGF-2	<i>Fibroblast growth factor 2</i>
GA	Glutaraldeído
GAP-43	<i>Growth associated protein 43</i>
GDNF	<i>Glial derived neurotrophic factor</i>
GFAP	<i>Glial fibrillary acid protein</i>
Hz	Hertz (pulsos por segundo)
IEC	Índice Estático do Ciático
IECc	IEC para camundongos

IFC	Índice de Função do Ciático
IFN γ	Interferon gama
IL	Interleucina
K ₃ [Fe(CN) ₆]	Ferricianeto de potássio
Krox 20	Gene Krox 20
L	Litro
LIF	<i>Leukemia inhibitory factor</i>
L1	Proteína transmembrana L1
M	Molar
mA	Miliampére
MAG	<i>Myelin associated glycoprotein</i>
MBP	<i>Myelin basic protein</i>
mg	Miligrama
mL	Militro
mM	Milimolar
MPM	<i>Periferic myelin protein</i>
mT	Militesla
mV	Milivolt
nA	Nanoampére
N-CAM	<i>Neural cell adhesion molecule</i>
NGF	<i>Nerve growth factor</i>
nm	Nanômetro
NMDA	N-metil-D-aspartato
nNOS	<i>Neuronal nitric oxyde synthase</i>
nT	Nanotesla
O ₂ ⁻	Superóxido aniônico
OsO ₄	Tetróxido de ósmio
P0	Proteína 0
P2	Proteína 2
PA	Paraformaldeído
PAI	<i>Palsnminogen activator inhibitor</i>
PBS	Solução salina tamponada com fosfato de sódio
PLC γ 1	Fosfolipase C gama 1
PGN	Prostaglandina

PMP 22	<i>Peripheral myelin protein 22</i>
RAG	<i>Regeneration associated genes</i>
RMS	<i>Root-mean-square</i>
SFI	<i>Sciatic Function Index</i>
SP	Substância P
SSI _m	<i>Sciatic Static Index for the mouse</i>
SNC	Sistema nervoso central
SNP	Sistema nervoso periférico
S-100	Proteína S-100
T α 1-tubulina	T alfa 1 tubulina
TBA	<i>Tiobarbituric acid</i>
TBARS	<i>Tiobarbituric acid reactive species</i>
TGF-beta	<i>Transforming growth factor beta</i>
TNF α	<i>Tumor necrosis factor alfa</i>
tPA	<i>Plasminogen activator</i>
TPO _i	Tampão fosfato
TrkB	Receptor Tirosina Cinase B
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
V/m	Volts por metro
μ L	microlitro
μ T	microtesla

LISTA DE TABELAS

Tabela	Página
1. Correlação entre as medidas das variáveis das pegadas (ED, EDI, CP) obtidas por foto ou impressão e seus fatores calculados.....	57
2. Reprodutibilidade dos parâmetros das pegadas.....	58
3. Modelo de regressão linear, mostrando o poder de cada fator na fórmula final do IECc.....	59
4. Resultados da análise de regressão linear, mostrando o coeficiente beta (β) de cada fator associados ao erro-padrão, a constante relacionada e o nível de significância das estimativas.....	60
5. Densidade de fibras e núcleos de células de Schwann (CS)(mm ²) - EENT.....	72
6. Diâmetro de fibras - EENT.....	74
7. Diâmetro dos axônios de fibras mielinizadas - EENT.....	75
8. Densidade de fibras e núcleos de células de Schwann (CS) (mm ²) - CEMP.....	85
9. Diâmetro de fibras - CEMP.....	87
10. Diâmetro dos axônios de fibras mielinizadas - CEMP.....	88

LISTA DE FIGURAS

Figuras	Página
1. Após lesões no plexo braquial, os músculos na mão podem ficar desnervados por períodos de 800 dias ou mais, devido às longas distâncias entre o local da lesão e os órgãos-alvo.....	23
2. Representação gráfica de um pulso monofásico e um bifásico.....	28
3. Lei da Indução de Faraday.....	33
4. Possíveis mecanismos de ação dos campos eletromagnéticos em tecidos biológicos.....	36
5. Efeito Hall no transporte de cargas elétricas em condutores metálicos e sistemas biológicos.....	37
6. Aparato para obtenção das pegadas usadas no Índice de Função do Ciático.....	39
7. Aparato para a obtenção do Índice Estático do Ciático.....	40
8. Dispositivo para avaliação da função locomotora.....	46
9. Fotografia mostrando o aspecto plantar de um camundongo.....	47
10. Local da lesão por esmagamento e das amostras dos nervos estudados.....	52
11. Comparação da recuperação determinada pelo Índice de Função do Ciático (IFC) (■) e Índice Estático do Ciático para camundongos (IECc) (▲) no grupo transecção.....	62
12. Comparação da recuperação determinada pelo Índice de Função do Ciático (IFC) (■) e Índice Estático do Ciático para camundongos (IECc) (▲) no grupo que sofreu esmagamento do nervo.....	63
13. Índice Estático do Ciático para o camundongo (EENT).....	66
14. Cortes transversais semi-finos do nervo ciático (EENT).....	68
15. Cortes transversais ultra-finos do nervo ciático (EENT).....	70
16. Coeficiente g estratificado por faixas (EENT).....	77
17. Índice Estático do Ciático para o camundongo (CEMP).....	79
18. Cortes transversais semi-finos do nervo ciático (CEMP).....	81

19. Cortes transversais ultra-finos do nervo ciático (CEMP).....	83
20. Coeficiente g estratificado por faixas (CEMP).....	90
21. Análise da formação de espécies reativas de oxigênio pelo método de TBARS.....	91

SUMÁRIO

Página

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE FIGURAS

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO.....	19
1.1. Lesão e regeneração nervosa periférica.....	19
1.2. Estratégias para otimização da regeneração no sistema nervoso periférico.....	24
1.3. Campos eletromagnéticos, funcionamento biológico e regeneração tecidual.....	25
1.4. Campos eminentemente elétricos e regeneração nervosa periférica...	27
1.4.1. Eletrodos implantados.....	29
1.4.2. Eletroestimulação intra-operatória.....	30
1.4.3. Eletrodos percutâneos.....	30
1.4.4. Eletroestimulação transcutânea.....	31
1.5. Campos eminentemente magnéticos e regeneração nervosa periférica.....	32
1.6. Modelos experimentais de regeneração nervosa periférica.....	37
1.6.1. Análise da função locomotora.....	38
2. JUSTIFICATIVA.....	41
3. OJETIVOS.....	42
3.1. Objetivos gerais.....	42
3.2. Objetivos específicos.....	42
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	43
4.1. Procedimento cirúrgico.....	44

4.2. Adaptação do Índice Estático do Ciático para camundongos.....	45
4.2.1. Testes funcionais.....	45
4.2.2. Análise dos dados.....	48
4.3. Avaliação do efeito de campos eminentemente elétricos ou magnéticos na regeneração do nervo ciático submetido a lesão por esmagamento em camundongos.....	49
4.3.1. Procedimento para estimulação elétrica.....	49
4.3.2. Procedimento para a estimulação com o campo eletromagnético de baixa frequência.....	50
4.3.3. Testes de avaliação da função locomotora.....	50
4.3.4. Processamento para microscopia.....	51
4.3.4.1. Microscopia óptica.....	53
4.3.4.2. Microscopia eletrônica de transmissão.....	53
4.3.5. Análise da formação de espécies reativas de oxigênio.....	54
4.3.6. Análise dos dados.....	55
5. RESULTADOS.....	56
5.1. Adaptação do Índice Estático do Ciático para camundongos.....	56
5.2. Efeitos de campos eletromagnéticos na regeneração do nervo ciático após lesão por esmagamento em camundongos.....	65
5.2.1. Estimulação elétrica nervosa transcutânea.....	65
5.2.1.1. Avaliação funcional.....	65
5.2.1.2. Avaliação morfológica.....	67
5.2.1.3. Histomorfometria.....	71
5.2.2. Campo eletromagnético pulsado de baixa frequência.....	78
5.2.2.1. Avaliação funcional.....	78
5.2.2.2. Avaliação morfológica.....	80
5.2.2.3. Histomorfometria.....	84
6. DISCUSSÃO.....	92
7. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS.....	106
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	107
ANEXO I	
ANEXO II	

RESUMO

Este estudo experimental foi realizado em três fases, com o objetivo de se adaptar um método de avaliação funcional para ser usado após lesões traumáticas do nervo ciático em camundongos e de se determinar a influência de campos eminentemente elétricos ou magnéticos na regeneração nervosa periférica. Na primeira fase foram usados 63 camundongos suíços machos (*Mus musculus*), que foram divididos em três grupos de 21 animais cada. O primeiro grupo foi submetido a uma transecção do nervo ciático direito, o segundo a um esmagamento e o terceiro serviu como controle. Os animais foram avaliados funcionalmente por seis semanas através do Índice de Função do Ciático (IFC) e de fotografias de seus aspectos plantares para obtenção da distância entre o primeiro e quinto dedos, segundo e quarto dedos e da ponta do terceiro dedo até a parte mais posterior da pata em contato com o solo. Ao final do período os dados foram submetidos a uma análise de regressão linear múltipla usando como variável dependente os valores do IFC e como variáveis independentes os valores dos parâmetros adquiridos das fotografias. Com isto se chegou à fórmula do Índice Estático do Ciático para camundongos (IECc), que possui uma alta correlação com o IFC. A seguir, foram usados 49 animais para se avaliar os efeitos de duas modalidades de estimulação eletromagnética sobre a regeneração do nervo ciático de camundongos após lesão por esmagamento. No primeiro experimento 15 animais foram divididos igualmente em três grupos, que foram submetidos a um esmagamento do nervo ciático direito por 30 segundos e após quatro dias receberam eletroestimulação nervosa transcutânea (EENT) de alta (n=5) ou baixa frequência (n=5), ou formaram o grupo controle, mantido nas mesmas condições dos outros, porém sem estimulação. O tratamento foi realizado por 30 minutos, cinco vezes por semana, por cinco semanas e os resultados mostraram que a EENT inibiu a regeneração nervosa, com estes nervos apresentando fibras de grosso calibre menores e menos mielinizadas, porém sem afetar as medidas funcionais. No segundo experimento para se verificar o efeito dos campos eletromagnéticos na regeneração nervosa periférica, 34 animais foram submetidos à mesma lesão por esmagamento do nervo ciático e a metade (n=17) tratada com um campo eletromagnético pulsado (CEMP) de 72 Hz, com amplitude de dois Gauss, por trinta minutos, cinco vezes por semana, durante três semanas. A outra metade dos animais formou o grupo controle (n=17). A avaliação do processo regenerativo revelou uma evolução levemente pior no grupo tratado, caracterizada novamente por uma menor quantidade de fibras grossas, porém de forma similar ao controle, uma diminuição significativa do calibre de axônios das fibras mielinizadas e um aumento significativo do estresse oxidativo.

Palavras-chave: Testes funcionais; Camundongos; Nervo ciático; Índice de Função do Ciático; Índice Estático do Ciático; Eletroestimulação Nervosa Transcutânea; Regeneração; Histologia.

ABSTRACT

This study involves three phases, with the aim to adapt a functional method to be used after traumatic sciatic nerve lesions in mice, and to determine the influence of electric or magnetic fields on peripheral nerve regeneration. In the first step, we used 63 male Swiss mice (*Mus musculus*), divided into three groups of 21 animals each. The first group was submitted to a transection of the right sciatic nerve, the second to a crush injury and the third served as a control. The animals were assessed functionally for six weeks by the Sciatic Function Index and photographs from its plantar aspects to obtain the distance between the first and fifth toes, second and fourth toes and from the tip of the third toe to the most posterior part of the sole in contact with the floor. At the end of the period, data were submitted to a multiple linear regression analysis, using the SFI values as dependent variable and the measured distances as independent variable. This methodology led to the formula of the Static Sciatic Index for the mouse (SSIm), that has high correlation with the SFI. Then, we used 49 animals to assess the effects of two electromagnetic modalities on sciatic nerve regeneration after a crush lesion in mice. On the first experiment 15 animals were divided equally into three groups, that were submitted to a crush lesion of the right sciatic nerve for 30 seconds and, after four days received high (n=5) and low (n=5) frequency transcutaneous electrical nerve stimulation (TENS) or formed a control group, maintained on the same situation of the others but without stimulation. Treatment was carried out for 30 minutes, five days a week, for five weeks and the results showed that TENS inhibited nerve regeneration, expressed by low diameter and less gross myelinated fibers, but with no interference on gait. On the second experiment, to verify the effects of low frequency pulsed electromagnetic fields (PEMF) on peripheral nerve regeneration 34 animals were submitted to the same crush lesion and half of them (n=17) treated with a 72Hz, 2 Gauss field amplitude, for 30 minutes, five days a week, for three weeks. The other half of animals formed the control group (n=17). Assessment of the regenerative process revealed a minor but worst development on the PEMF group, characterized again by less large diameter fibers, similar to controls, a significant decrease of their axon's calibers and an increase on oxidative stress.

Key-words: Functional tests; Mice; Sciatic nerve; Sciatic Function Index; Transcutaneous Electrical Nerve Stimulation; Regeneration; Histology.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Lesão e regeneração nervosa periférica

O sistema nervoso periférico (SNP) pode ser lesado por traumas, distúrbios metabólicos, inflamatórios e muitos outros. Após uma lesão, ocorrem alterações morfológicas e funcionais em resposta à lesão. No processo cicatricial, a região lesada destruída pela agressão será substituída por tecido cicatricial, proveniente da atividade fibroblástica e consistindo eminentemente de tecido conjuntivo, diferente em grande parte do tecido especializado anterior. No processo regenerativo, as células lesadas primariamente pelo fator agressor ou secundariamente pelos distúrbios metabólicos associados, como a hipóxia secundária, serão substituídas por novas células com as mesmas características das anteriores, embora normalmente este mecanismo não seja totalmente efetivo (ROBBINS, 1974; KNIGHT, 2000).

Após uma lesão axonal ocorre extensa degeneração do segmento distal à lesão, conhecida por Degeneração Walleriana (DW). O coto proximal, que continua ligado ao corpo celular, pode se regenerar e crescer em direção ao órgão-alvo. Quando o corpo celular é atingido este processo não consegue acontecer, isto porque nele se encontra o material genético essencial para o funcionamento celular (STOLL e MÜLLER, 1999).

No estágio inicial da DW praticamente não existem alterações no axônio lesado. Nota-se nesta fase um acúmulo de organelas citoplasmáticas na região distal ao local lesionado provavelmente decorrente de alterações no transporte axonal e edema endoneural, em decorrência da quebra da barreira hemato-nervosa. Há desintegração do retículo endoplasmático e dispersão dos ribossomas no núcleo da célula. Este aumenta de volume e

desloca-se para a periferia do corpo celular e o axônio se retrai e diminui de calibre. Neste estágio a condução elétrica está normal e a duração desta fase varia de acordo com o comprimento do coto distal, natureza do nervo e local da lesão.

Em torno de 24 a 48 horas se inicia a desintegração do citoesqueleto e degradação do axoplasma e axolema na região distal ao local da lesão (MALBOUISSON et al., 1985; STOLL et al., 1989). A fragmentação axoplasmática é mediada por aumento nas concentrações intracelulares de cálcio proveniente de depósitos intracelulares ou do espaço extracelular, e conseqüente ativação de proteases como a calpaína (MARTINEZ e RIBEIRO, 1998; COUTO et al., 2004). Este influxo de cálcio para dentro da célula provoca “correntes elétricas de lesão” através do aumento dos potenciais elétricos locais (WATSON, 1998; McCAIG et al., 2002). Existe uma rápida desintegração do axoplasma em pequenas partículas amorfas derivadas da clivagem do citoesqueleto, que ocorre uniformemente ao longo da fibra em degeneração (MALBOUISSON et al., 1985). Neste período, as células de Schwann fragmentam a mielina e fagocitam pequenos restos celulares, se dividem, se alinham e formam as bandas de Büngner (BB). As extremidades distais dos neurônios lesionados se dilatam pelo acúmulo de organelas citoplasmáticas e formam os “cones de crescimento”. A partir desses cones são gerados brotos regenerativos, que crescem em direção ao órgão-alvo, guiados pelas BB.

Entre o segundo e o sétimo dia após a lesão os macrófagos, as células T hematogênicas e residentes locais se infiltram e penetram em toda a região distal ao local da lesão, levando também a uma rápida fagocitose dos fragmentos de mielina. As células de Schwann (CS) diminuem a expressão de proteínas formadoras de mielina (P₀, P₂, MBP, MAG e PMP 22). Ao mesmo tempo, se desdiferenciam, adquirem um fenótipo de pré/não-mielínica, formam as

BB e aumentam a expressão de receptores para o NGF, proteína ácida fibrilar glial (GFAP), fator β de maturação glial, molécula de adesão celular L1, N-CAM, GAP-43, BDNF e seu receptor TrkB. Também expressam fatores de transcrição (Pax3 e C-jun), mas diminuem a regulação do Krox-20. Tais mudanças estão associadas a um aumento orquestrado na expressão de citocinas pró e antiinflamatórias (IL1, IL6, IL10, IL12, IFN γ , TNF α , TGF- β 1, β 2 e LIF) e vão estimular o crescimento do neurito em direção à célula-alvo (STOLL e MULLER, 1999; STOLL et al, 2002). Os fatores TGF- β 1 e β 2 e LIF são sobre-regulados após lesões axonais e estão intimamente ligados ao processo de regeneração no SNP (CHEEMA et al., 1994 a,b; STOLL e MULLER, 1999). O TGF- β 1 associado ao AMPc regula a expressão da proteína GAP-43 (STEWART et al., 1995) que está relacionada com a capacidade da célula lesada em avaliar o ambiente onde ela está se expandindo, amplificando os sinais gerados pelas pistas que orientam o caminho a ser seguido pelo cone de crescimento (FU e GORDON, 1997). A função do TGF- β 1 no processo de regeneração pode ser ambíguo, estando envolvido com a proliferação de CS que não estão em contato com neurônios em cultura (ROGISTER et al., 1993), porém com sua inibição ocorre em situações em que há interação desta célula glial com neurônios (MEWS e MEYER, 1993; STEWART et al., 1995; GUÉNARD et al., 1995 a,b ; EINHEBER et al., 1995; KRIEGLSTEIN et al., 1998) ou outras moléculas como a LIF (MATSUOKA et al., 1997), o GDNF, da mesma super-família do TGF- β (KRIEGLSTEIN et al, 1998; SCHOBER et al., 1999) e do FGF-2 (GAJDUSEK et al., 1993; FRENZ et al., 1994). Desta forma, o TGF- β 1 parece ter uma função específica na fase inicial de uma lesão no SNP, como sinalizador para que as CS passem do estado proliferativo/mielinizante, para o estado não-mielinizante necessário para o início do processo de regeneração.

Durante o processo inflamatório relacionado à DW são formados radicais livres, moléculas quimicamente instáveis e reativas (Del ZOPPO, 1997). O estresse oxidativo (EO) conseqüente ao aumento na produção de espécies reativas de oxigênio ocorre quando há um desequilíbrio entre a produção e capacidade celular de detoxificação destes radicais, contribuindo para a destruição celular local (POP-BUSUI et al., 2006). As espécies reativas de oxigênio (ERO) medeiam as respostas celulares induzidas pelo TGF- β 1 em vários tipos celulares e seu bloqueio inibe a ação desta citocina (LAFON et al., 1996; HONG et al., 1997; KOO et al., 1999; JUNN et al., 2000; CHIU et al., 2001; HERRERA et al., 2001 a,b; JIANG et al., 2003; RHYU et al., 2004). Enquanto a relação TGF- β 1/ERO parece ser essencial na fase proliferativa da lesão nervosa periférica, para que ocorra a fagocitose do tecido destruído no local e distal à lesão e as CS possam passar a um estado não-mielinizante, na fase tardia da inflamação a manutenção dos níveis de estresse oxidativo e atividade do TGF- β 1 poderiam estar associados à uma regeneração deficiente, com insuficiência de fibras mielinizadas e excesso de colágeno (ROGISTER et al., 1993), aumento do influxo de cálcio para o meio intra-celular, ativação de calpaínas e destruição do citoesqueleto.

No sistema nervoso central (SNC), a regeneração axonal está fortemente inibida por fatores produzidos pela mielina ou pelas células gliais, que não permitem que o axônio lesado se estenda por distâncias que poderiam tornar a regeneração funcional (YU e HE, 2006). No sistema nervoso periférico (SNP), entretanto, o quadro é diferente, pois as CS criam um ambiente altamente propício à regeneração do axônio acometido, além de regular todo o processo regenerativo (STOLL e MÜLLER, 1999). Em lesões por esmagamento, não há rompimento da membrana basal destas células, que envolvem toda a fibra desde sua origem até a parte mais distante do seu prolongamento principal. Com isso os brotos regenerativos que se formam após a lesão, encontram um caminho mecânico e demarcado por proteínas de

matriz extracelular para prosseguirem se alongando em direção ao órgão-alvo e assim a regeneração é facilitada. Este movimento axonal pode ser influenciado por pistas quimiotáxicas e elétricas (STOLL e MÜLLER, 1999; SONG et al., 2004), de forma que se estas não forem adequadas ou a distância a ser percorrida pelos brotos axonais for muito grande, a regeneração pode não ser funcional. Isto acontece em lesões muito proximais, perto dos corpos celulares no SNP, como as lesões traumáticas no plexo braquial, lesões de raízes nervosas no forame de conjugação e outras (Figura 1) (GORDON et al., 2003; LUNDBORG, 2004). Também em situações onde o metabolismo ou o fornecimento de nutrientes está acometido, como na Diabete Melito (DM) há a dificuldade de se desenvolver uma regeneração funcional (KENNEDY e ZOCHODNE, 2005). Nestas situações o incentivo à regeneração se torna uma necessidade, para que o organismo acometido volte a desempenhar as funções normais, perdidas após a lesão.

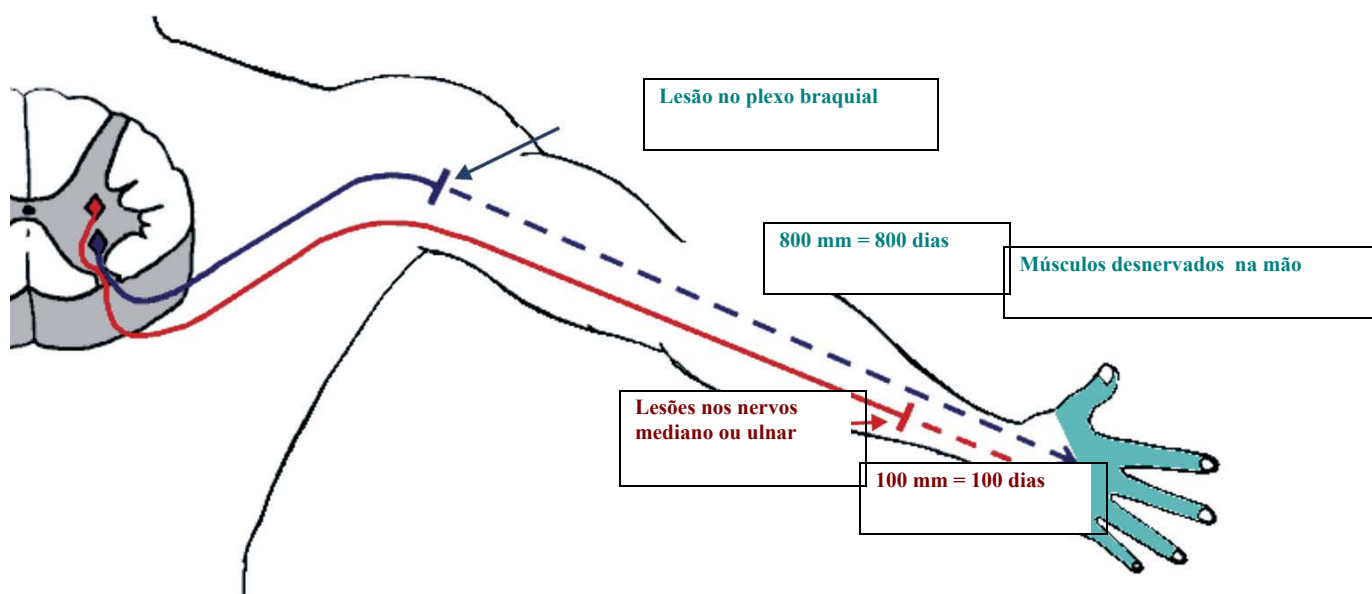


Figura 1. Após lesões no plexo braquial, os músculos na mão podem ficar desnervados por períodos de 800 dias ou mais, devido às longas distâncias entre o local da lesão e os órgãos-alvo. Reproduzido e adaptado a partir de *Experimental Strategies to Promote Functional Recovery after Peripheral Nerve Injuries*, GORDON et al., 2003.

Quando a lesão é por secção do nervo periférico, há a necessidade de reparo cirúrgico para que se restabeleça uma via por onde os brotos axonais possam trafegar até chegar aos seus alvos. Apesar de um reparo cirúrgico poder ser perfeito, encontra-se aí uma maior dificuldade ou até impossibilidade de regeneração, devido à descontinuidade da membrana basal da CS. Isso acontece se houver formação de fibrose no trajeto do nervo, que impedirá a passagem de axônios por este local. Desta forma, a lesão por secção é muito mais grave do que a lesão por esmagamento e se acontecer em pessoas com déficits metabólicos ou afecções que afetem a oferta de um bom ambiente regenerativo, torna-se ainda pior (LUNDBORG, 2004).

Estima-se que lesões obstétricas do plexo braquial aconteçam numa proporção de 1/1.000, em 12% das vezes levando a comprometimentos permanentes (CHAUHAN et al., 2005). As lesões do nervo mediano no túnel do carpo, que caracterizam a Síndrome do Túnel do Carpo, acometem de 90 a 190 / 100.000 pessoas, com maior frequência no sexo feminino (LATINOVIC et al., 2006), levando a perdas variáveis da função da mão e muitas vezes incapacidade. Outras doenças que acometem o SNP são menos comuns, tais como a Metatarsalgia de Morton, as Neuropatias Ulnar e Radial e a Meralgia Parestésica, mas contribuem para o rol de neuropatias que podem envolver tanto lesões axonais quanto do corpo celular do neurônio. Em algumas doenças, que envolvem lesões nervosas periféricas, essas são negligenciadas como no caso das lesões de raízes nervosas provenientes de hérnias de disco ou síndromes facetárias (hipertrofia da faceta articular na vértebra), que têm suas prevalências e incidências normalmente associadas à dor lombar ou cervical, mascarando a epidemiologia exata das lesões nervosas.

1.2. Estratégias para otimização da regeneração no sistema nervoso periférico

Ao ser acometido, o SNP está parcial ou totalmente inibido de desempenhar suas funções. Como ele é um mediador de informações aferentes e eferentes provenientes de estruturas relacionadas à vida somática ou vegetativa, encontram-se nas pessoas ou animais acometidos por lesões no SNP paralisias, perda de força, perda de controle muscular, disautonomia, déficits de sensibilidade (incluindo as sensibilidades gerais e especiais) e dor.

Para incentivar a regeneração no nervo periférico, pode-se recorrer a diversos recursos, com o uso de fatores neurotróficos, células-tronco (TOHILL e TERENGHI, 2004; LOPES et al., 2006), aplicação de ultra-som (CRISCI e FERREIRA, 2002), LASER de baixa intensidade (BAE et al., 2004), exercícios físicos (MOLTENI et al., 2004; SEO et al., 2006) e outros. Dentro deste rol de opções o uso de campos eletromagnéticos constitui uma das possibilidades, que se justifica pelo fato de que após uma lesão tecidual, em um organismo biológico, se formam correntes elétricas endógenas que estão intimamente relacionadas com o processo de recuperação. Estas correntes, conhecidas como correntes de lesão (CL), são formadas através de gradientes elétricos entre a área acometida e as regiões vizinhas e permanecem ativas durante todo o processo regenerativo (LOW e REED, 2001).

1.3. Campos eletromagnéticos, funcionamento biológico e regeneração tecidual

Os organismos biológicos compõem uma grande camada que recobre a superfície do planeta em que vivemos e seu funcionamento normal ou anormal está intimamente relacionado com o funcionamento do planeta e de todo o sistema solar. Cada planeta possui um ambiente

eletromagnético natural e, no caso do Planeta Terra, isto é devido à existência de um núcleo semilíquido ferromagnético, que gera um campo geomagnético estático com fluxo lento, além de dois outros fatores que geram campos eletromagnéticos variáveis, a saber: a atividade elétrica decorrente de tempestades nas zonas equatoriais (África Central e Amazônia) e as tempestades magnéticas solares. Como consequência, estamos expostos e interagindo com um campo geomagnético natural com intensidade média de $50 \mu\text{T}$, que pode variar de localidade no planeta, além de campos eletromagnéticos (CEM) naturais com amplitudes por volta de $0,01\text{V/m}$ e frequência de 8 a 32 Hz, associados a campos magnéticos de um a 10 nT (ADEY, 2004).

Atualmente, outra grande fonte de energia eletromagnética que interage com organismos biológicos provém dos geradores e linhas de transmissão de energia elétrica, aparelhos eletrodomésticos, telefones celulares, antenas de rádio e outros. Todos estes dispositivos artificiais geram CEMs muito maiores do que aqueles provenientes das fontes naturais (ADEY, 2004).

Há de se destacar que a energia elétrica é distinta da magnética, porém as duas são encontradas normalmente juntas na natureza. A energia magnética é proveniente do núcleo ferromagnético do planeta e gera um campo com fluxo direcionado do norte para o sul. A energia elétrica é proveniente da carga de átomos, carregados positiva ou negativamente. Ao ser criado um gradiente de carga entre uma região e outra, pode acontecer um fluxo elétrico, que nos metais se dá basicamente pelo deslocamento de elétrons, enquanto que nos organismos biológicos se postula classicamente que ocorrem pelo deslocamento de íons – correntes iônicas (eg.: bomba de sódio e potássio) (ADEY, 2004; GARCIA, 2006). As correntes iônicas características dos sistemas biológicos são consequência de pequenos

gradientes de concentração de íons, na ordem de um milésimo de Volts (milivolts – mV). Estes gradientes estão presentes em todas as células que compõem estes tecidos e são muito importantes para a manutenção de suas atividades metabólicas. Eles geram pequenos fluxos de corrente, em torno de 1×10^{-9} Ampéres (nanoampéres – nA), que somadas podem chegar à faixa de 1×10^{-6} Ampéres (microampéres - μ A) na membrana celular. Estima-se que em torno de 20% da taxa metabólica de um organismo humano seja gasto para manter o gradiente elétrico existente entre o interior e o exterior da célula, tornando a membrana celular um capacitor, cuja função é acumular e regular a passagem de energia elétrica (CHARMAN, 1998; GARCIA, 2006).

Os campos elétricos estão normalmente interagindo com campos magnéticos e vice-versa. Desta forma, ao se formar um campo elétrico entre duas placas carregadas, se formará um campo magnético em torno desse primeiro. O contrário também acontece e isto é a base da Lei da Indução de Faraday, que será discutida mais adiante. Por isso normalmente são citados os CEMs e não somente o campo elétrico ou magnético isoladamente. Entretanto, algumas vezes um campo é eminentemente elétrico ou magnético, e isto tem especial valor quando se deseja fazer com que um CEM exógeno interaja com um tecido biológico com objetivos diagnósticos ou terapêuticos (HAAR, 1998)

1.4. Campos eminentemente elétricos e regeneração nervosa periférica

A manipulação da regeneração nervosa periférica no sentido de facilitar a reinervação inclui a aplicação de campos elétricos constantes ou com frequências variadas. A efetividade das

condutas que visam aumentar a taxa e a velocidade de regeneração tem sido demonstrada em vários trabalhos, eminentemente com animais de experimentação.

A utilização de correntes elétricas exógenas com fins de estimular o reparo/regeneração decorre do fato de que quando um tecido está lesado ou em processo de reparação, o fluxo de íons nesta região sofre alterações, aumentando a capacitância (capacidade de acúmulo de cargas elétricas) local. O uso de correntes elétricas externas à lesão tem a finalidade de restabelecer o fluxo elétrico normal, aumentar a circulação local, aumentar o metabolismo celular e estimular a produção de fatores tróficos (WATSON, 1998; PANAGOPOULOS et al., 2000; PANAGOPOULOS et al., 2002).

São utilizadas normalmente correntes elétricas monofásicas (pulsadas ou não) ou bifásicas, administradas através de eletrodos implantados no próprio nervo, estimulação intraoperatória ou percutânea, usando agulhas semelhantes às de acupuntura ligadas a um gerador de corrente (Figura 2). As correntes monofásicas possuem a vantagem da unidirecionalidade, que pode gerar efeitos eletroforéticos nas proteínas de membrana e, desta forma, orientar o crescimento do neurito em direção ao cátodo (McCAIG et al., 2002). Entretanto, se forem usadas em altas intensidades ou longos períodos podem causar efeitos lesivos devido à própria eletroforese (LOW e REED, 2001). Apesar das correntes bifásicas não oferecerem o risco dos efeitos decorrentes da eletrólise, elas são menos utilizadas, pois não possuem poder de gerar o direcionamento do neurito para o órgão-alvo.

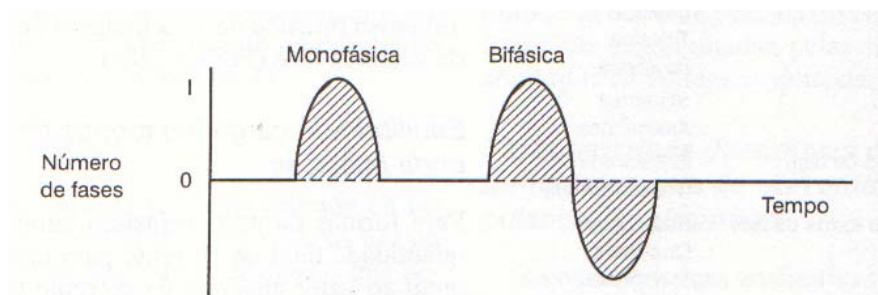


Figura 2. Representação gráfica de um pulso monofásico e um bifásico. Reproduzido a partir de Eletrofisiologia Clínica - Eletroterapia e Teste Eletrofisiológico, Robinson e Snyder-Mackler, 2002.

As formas de aplicação das correntes elétricas com objetivo de estimular a regeneração nervosa incluem diferentes tipos de eletrodos, com algumas formas predominando sobre outras. Em geral, quanto mais perto o eletrodo estiver do nervo, a corrente tende a ser menor em amplitude, pois não há necessidade de vencer a impedância exercida pelos tecidos circundantes do nervo.

1.4.1. Eletrodos implantados

A estimulação com eletrodos implantados e diferentes tipos de correntes elétricas tem sido a forma mais utilizada desde a década de 80 em modelos experimentais usando lesões nos nervos sóleo (NIX e HOPF, 1983) e ciático (BEVERIDGE e POLITIS, 1988; POLITIS et al., 1988; KERNS et al., 1991; POMERANZ e CAMPBELL, 1993; MENDONÇA et al., 2003). Todos esses trabalhos apresentaram resultados positivos, com melhora na função e/ou parâmetros morfológicos.

Somente dois estudos, realizados pelo mesmo grupo, utilizando como modelo a lesão do nervo fibular comum (McGINNIS e MURPHY, 1992) e do ciático (HANSON e McGINNIS, 1994) encontraram resultados negativos, com menor número de fibras em regeneração,

formação de neuromas e taxa mais baixa de mielinização nos grupos estimulados. Entretanto, em seus experimentos um dos eletrodos foi colocado dentro do pequeno tubo de silicone que unia os dois cotos seccionados, levando à interação da corrente elétrica monofásica com o material do tubo, formação de efeitos deletérios pela falta de alternância da corrente e conseqüentemente destruição de parte do tubo, com impedimento físico à passagem dos neuritos.

As correntes elétricas utilizadas em todos estes estudos foram monofásicas e as amplitudes de corrente sempre muito baixas, abaixo do limiar sensitivo (na faixa dos μA), para que não houvesse destruição tecidual. A estimulação era feita geralmente de forma contínua, por períodos de algumas semanas, antes que os animais fossem sacrificados e as análises realizadas.

1.4.2. Eletroestimulação intra-operatória

Nestes modelos, o nervo é estimulado logo após a lesão, por períodos variáveis. Os nervos mais utilizados nos estudos são o ciático (SCOTT, 1991) e o femural (AL-MAJED et al., 2000a,b; BRUSHART et al., 2002; AL-MAJED et al., 2004). Os primeiros estudos utilizaram correntes monofásicas e os mais recentes correntes alternadas com freqüências de pulso de 20 Hz (AL-MAJED et al., 2000a,b; BRUSHART et al., 2002; AL-MAJED et al., 2004). Com esse último modelo, os autores encontraram uma reinervação mais precisa e mais rápida de órgãos-alvo, aumento na expressão do BDNF, TrKB, das proteínas $\text{T}\alpha\text{l}$ -tubulina e GAP-43 e de RAGs, além de redução na expressão de neurofilamentos (fenômeno também associado à regeneração). A eletroestimulação intra-operatória se diferencia das outras, além

da forma de estimulação, pelo tempo breve que é empregado, em torno de duas horas de estimulação após a lesão.

1.4.3. Eletrodos percutâneos

Os eletrodos percutâneos normalmente são agulhas de acupuntura introduzidas na pele e ligadas a um gerador de corrente elétrica. O uso de correntes elétricas através de eletrodos percutâneos tem sido pesquisado em modelos experimentais e talvez sejam, dos métodos estudados até o momento, o mais simples de se aplicar na prática clínica, pois usa agulhas ligadas a estimuladores elétricos. Este tipo de estimulação foi estudado em modelos de lesão do nervo ciático (POMERANZ et al., 1984; McDEVITT et al., 1987 e CHENG et al., 2001; INOUE et al., 2003), com os melhores resultados sendo atingidos quando o cátodo foi colocado distal e o ânodo proximal à lesão. Nestes experimentos foram sempre utilizadas correntes monofásicas, com amplitudes também abaixo do limiar sensitivo, entretanto tendo chegado à intensidade de um miliampère, bem maior do que aquela utilizada nas técnicas com eletrodos implantados.

1.4.4. Eletroestimulação transcutânea

O uso de eletrodos transcutâneos (de superfície) também é uma opção não-invasiva e que pode ser utilizada por um período maior, especialmente quando associados à corrente bifásica. Seu manejo é prático e simples, evitando a solução de continuidade e as reações provocadas por uma cirurgia de implante ou mesmo estimulação percutânea.

Estudos prévios avaliaram a influência da estimulação elétrica nervosa transcutânea (EENT) na regeneração de tecidos como tendões (BURSSENS et al., 2003, 2005), pele (KAADA e EMRU, 1988; KJARTANSSON et al., 1988; KHALIL E MERHI, 2000; LIEBANO et al., 2003) e osso (KAHN, 1982), com resultados variados. Os efeitos da EENT na regeneração do sistema nervoso, entretanto, permanecem desconhecidos. Esta modalidade tem sido associada com efeitos como o aumento no fluxo sanguíneo (de VRIES et al., 2007; SANDBERG et al., 2007) ou aumento na síntese de colágeno (BURSSENS et al., 2005), mas é necessário usar correntes elétricas com amplitudes acima de um miliampère, que podem ser associadas a diminuição nas concentrações de ATP (CHENG et al., 1982) e conseqüentemente inibição na regeneração.

A EENT é usualmente empregada para controlar a dor neuropática (LEEM et al., 1995; HANAI, 2000; NAM et al., 2001; CHEING e LUK, 2005; SOMERS e SOMERS, 1999; SOMERS e CLEMENTE, 2006), que pode ocorrer após lesões no SNP e está ocasionalmente associada à DW (LATINOVIC et al., 2006). Os efeitos analgésicos da EENT estão relacionados à liberação de opióides endógenos (SLUKA e WALSH, 2003) e isto está relacionado a outra controvérsia em relação à sua utilização em situações em que há DW, pois a exposição crônica a opióides normalmente está associada com o desenvolvimento de tolerância farmacológica e inibição de vários estágios da restauração do nervo periférico após lesão (SMITH e HUI, 1973; SINATRA et al., 1979; SINATRA e FORD, 1979; ZENG et al., 2007). Desta forma, torna-se necessário investigar qual é o papel da EENT na regeneração nervosa periférica.

1.5. Campos eminentemente magnéticos e regeneração nervosa periférica

O uso de campos magnéticos para gerar efeitos fisiológicos e terapêuticos em organismos biológicos se baseia principalmente na descoberta de Oersted e na Lei da Indução de Faraday. Em 1820 o dinamarquês Oersted, fazendo experiências com campos elétricos e uma bússola demonstrou que uma corrente elétrica induz a formação de um campo magnético. Logo depois, em 1830, Faraday anunciou que o inverso também poderia acontecer, sendo possível que campos elétricos pudessem ser induzidos em um condutor através de variações de corrente em outro condutor. Este efeito seria mediado pelo campo magnético associado ao campo elétrico (HAAR, 1998; GARCIA, 2006) (Figura 3). Estas descobertas resultaram em implicações para a utilização da energia eletromagnética como recurso terapêutico. As correntes elétricas sofrem maior resistência ao passar pelo estrato córneo da pele e pela membrana celular do que os campos magnéticos. Por isso, ao se usar um campo elétrico administrado de forma transcutânea, existe uma grande possibilidade de boa parte de a energia ser absorvida superficialmente e não atingir o tecido-alvo. Por outro lado, se utilizamos um campo magnético superficialmente, incorremos em algumas vantagens importantes. Primeiro, o uso de campos eminentemente magnéticos dispensa o uso de eletrodos ou meios de contato com o corpo. Segundo, o campo magnético tem um maior poder de penetração através da pele e membrana celular, podendo induzir a formação de um campo elétrico em zonas mais profundas (Lei da Indução de Faraday). Com isso podem-se usar intensidades de energia mais baixas e também oferecer tratamentos mais confortáveis (LIBOFF e JENROW, 2002; ENGSTRÖM, 2004).

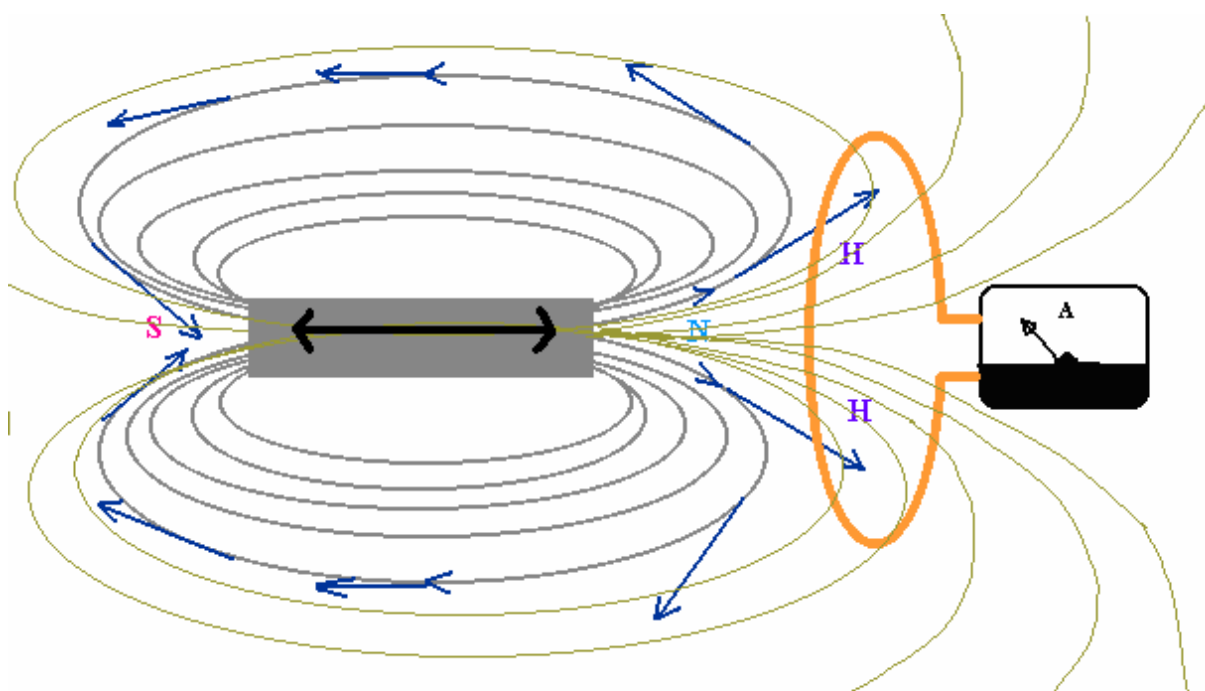


Figure 3. Lei da Indução de Faraday. Um campo magnético proveniente de um magneto permanente (cinza) é direcionado de Norte (N), para Sul (S). Quando interage de forma variável (↔) com um circuito elétrico, é capaz de induzir corrente elétrica (medida em Ampéres – A). Reproduzido de Cuccinota, A. *The Laws of the Physical World*.

Os campos eminentemente magnéticos têm sido usados para promover a regeneração nervosa periférica desde os anos 70. Wilson e Jagadeesh (1976) foram os primeiros a demonstrar que a exposição a campos eletromagnéticos pulsados de baixa frequência (CEMP) podia estimular a regeneração nervosa periférica. Seus efeitos incluem a redução no edema endoneural e de aderências, recuperação mais rápida da função locomotora após lesão nervosa periférica, aumento da vascularização e do ordenamento das fibras de colágeno no lugar da lesão, do diâmetro das fibras e axônios mielinizados, da taxa de regeneração (mm/dia) e melhora da mielinização (RAJI e BOWDEN, 1983; SISKEN et al., 1989; RUSOVAN et al., 1992; KANJE et al., 1993; WALKER et al., 1994; BERVAR et al., 2005).

Entretanto a variedade de parâmetros utilizados tornam os estudos com CEMPs muito diversos e dificultam a comparação dos resultados. Na maioria dos trabalhos, as amplitudes variam de 0,3 a 300 mT, e as frequências de 2 a 1.000 Hz, com as mais comuns na faixa de 2 a 72 Hz (OTTANI et al., 1988; SISKEN et al., 1989; RUSOVAN et al., 1992; KANJE et al., 1993; KIM et al., 2002; BERVAR, 2005). Esta grande variação associada às diferentes formas das bobinas de indução e aos diferentes ambientes em que são realizados os experimentos (diferentes campos geomagnéticos), levam a exposições muito variadas e quase impossíveis de serem conhecidas.

Os mecanismos de ação parecem estar ligados eminentemente à interação dos CEMPs com os íons cálcio na membrana celular, que seriam mobilizados pelo campo magnético e dariam passagem ao cálcio extracelular para o interior da célula, desta forma levando à deflagração de várias cascatas de sinalização intracelular que podem iniciar, acelerar ou inibir os processos biológicos (OSCHMAN, 2004) (Figura 4). Os CEMPs poderiam também agir sobre a permeabilidade da membrana celular através do fenômeno conhecido como Voltagem Hall, que postula a aceleração de elétrons a partir de um campo magnético que passa por um condutor metálico (Figura 5). As únicas diferenças estariam no fato de que nos organismos biológicos o que estaria sendo acelerado seriam os íons e não os elétrons e o condutor seria o canal de membrana. Incentivando a migração iônica através da membrana, ocorreria aumento na atividade metabólica (BALCAVAGE et al., 1996) e conseqüentemente aceleração do processo regenerativo. Entretanto, sabe-se que um grande aumento da concentração deste íon no meio intracelular, pode ter como conseqüência a ativação de calpaínas e conseqüente desintegração do citoesqueleto (SCHLAEPFER, 1971; COUTO et al., 2004), mediada pela formação de espécies reativas de oxigênio (PAQUET-DURAND et al., 2007).

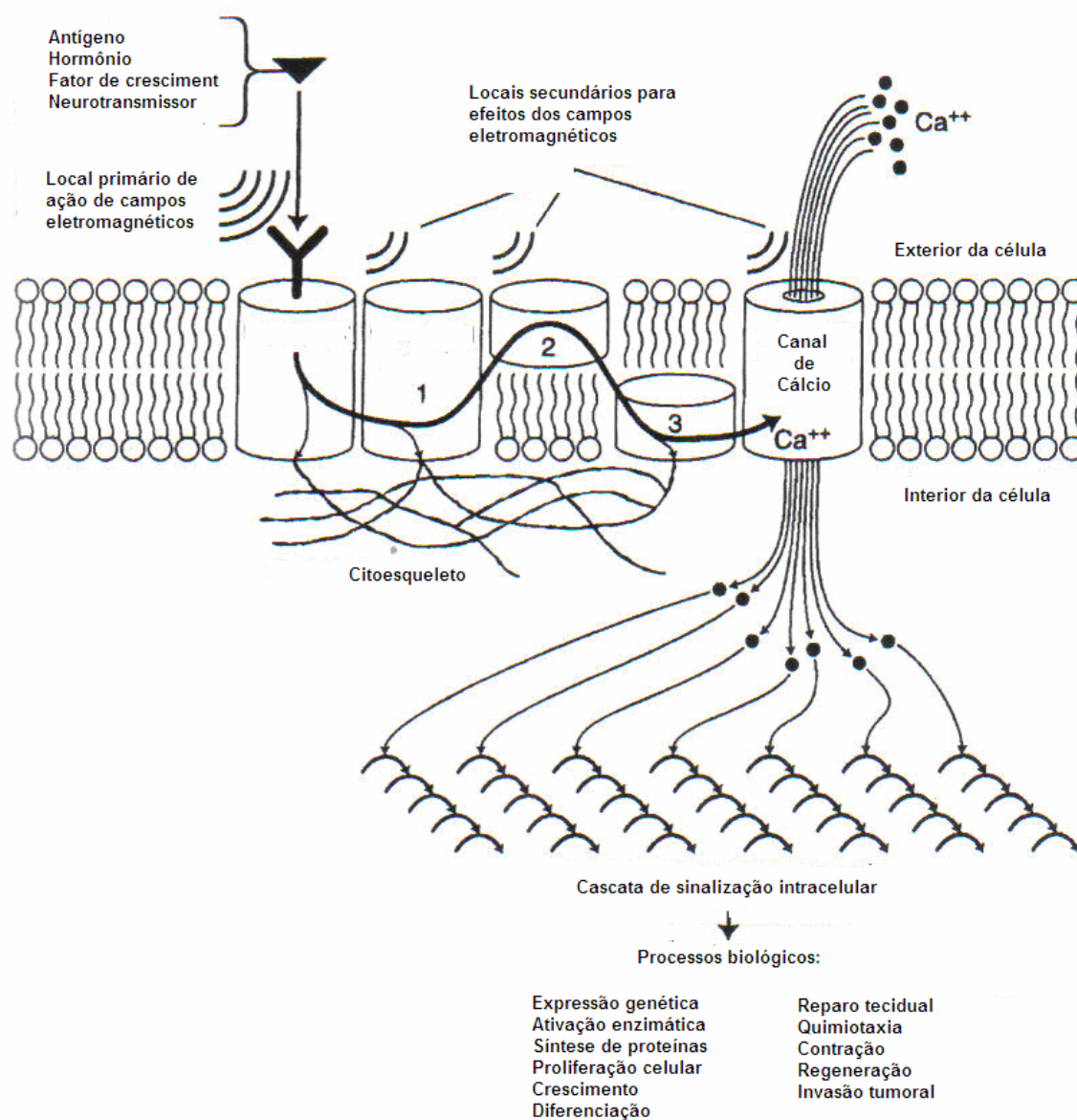


Figura 4. Possíveis mecanismos de ação dos campos eletromagnéticos em tecidos biológicos. Cascata celular e processo de amplificação que fornece a base para os efeitos das terapias com campos eletromagnéticos. Os números 1, 2 e 3 indicam receptores de membrana. Reproduzido e adaptado a partir de *Bioelectromagnetic Medicine*, Rosch e Markov, 2004.

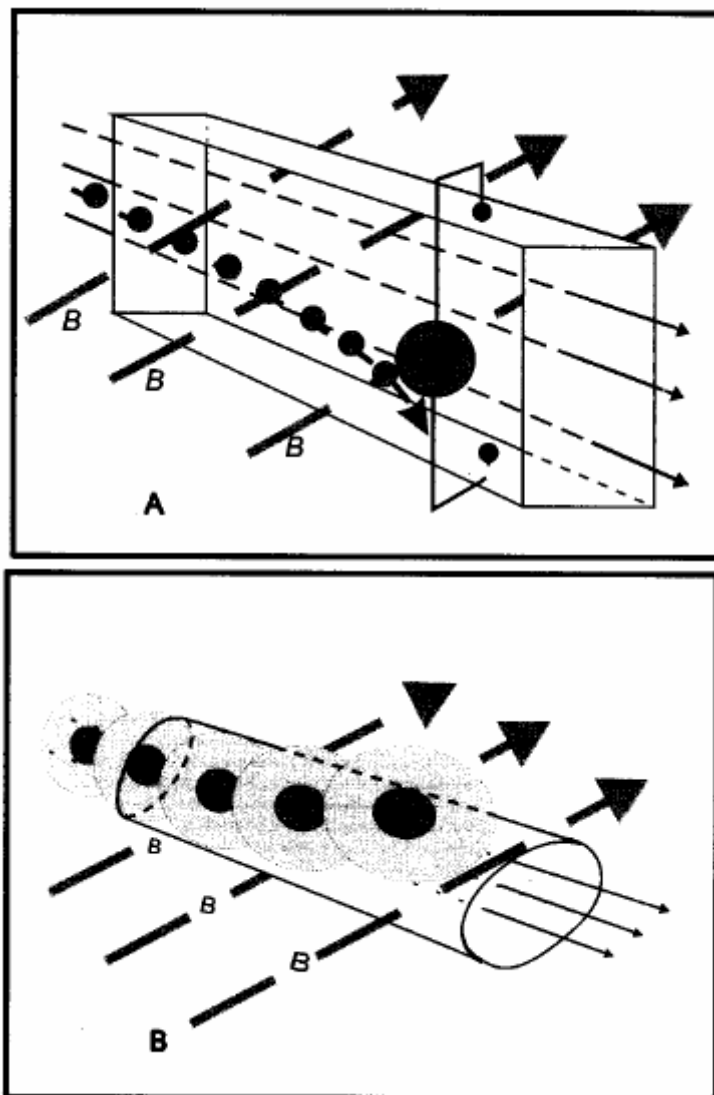


Figura 5. Efeito Hall no transporte de cargas elétricas em condutores metálicos e sistemas biológicos. Um campo magnético B pode fazer fluir elétrons em um condutor metálico (A) ou íons em um canal iônico (B). As correntes induzidas (esferas negras) fluem sempre perpendiculares ao campo gerador. Reproduzido e adaptado a partir de Balcavage et al., *A Mechanism for Action of Extremely Low Frequency Electromagnetic Fields on Biological Systems*, 1996.

1.6. Modelos experimentais de regeneração nervosa periférica

Para se estudar a regeneração nervosa periférica, os modelos mais utilizados na literatura baseiam-se na lesão dos nervos ciático, fibular ou sural. Dentre os três, o ciático é o mais comum devido ao seu calibre e ao fato de possuir fibras sensoriais, motoras somáticas e

viscerais (autonômicas). As lesões normalmente são por esmagamento, transecção e sutura epineural ou transecção e tubulização. Para se avaliar a regeneração, uma multiplicidade de técnicas é usada, envolvendo a análise de parâmetros enquanto o animal está vivo ou após a eutanásia. Os parâmetros *in vivo* mais utilizados são os testes de caminhada ou posicionamento dos dedos, medidas de condução elétrica e testes de sensibilidade, enquanto que após a eutanásia vários aspectos morfológicos, histoquímicos, imuno-histoquímicos e genéticos podem ser analisados. Neste trabalho vamos nos limitar a alguns destes parâmetros.

1.6.1. Análise da função locomotora

A análise da marcha em roedores tem sido avaliada como uma forma de se verificar o grau de regeneração nervosa periférica desde 1982, quando de Medinaceli e colaboradores (1982) propuseram o Índice de Função do Ciático (IFC). Para a obtenção deste índice colocam-se os ratos ou camundongos para andar em um corredor (Figura 6) e obtém-se o registro das patas posteriores dos animais que tiveram lesão unilateral do nervo ciático e avaliam-se alguns parâmetros das pegadas. Originalmente eram levadas em conta as distâncias entre o primeiro e quinto dedos (Espalhamento dos Dedos – ED), entre o segundo e quarto dedos (Espalhamento Intermediário dos Dedos – EID), entre o calcâneo e o terceiro dedo (Comprimento da Pegada – CP) e entre uma pegada e outra (Distância entre as Pegadas – DP). Os valores eram incluídos em uma fórmula cujos resultados poderiam variar de zero a -100, onde zero indica a simetria de função entre as patas e -100 perda total de função de um dos lados. O IFC foi adaptado diversas vezes para se tornar mais preciso ou prático de ser realizado. Para isso foram criadas novas formas de obtenção como impressão das pegadas com tinta nanquim, revelador de raios-X, azul de bromofenol e filmagens. Bain e

colaboradores (1989) adaptaram o IFC retirando a DP e Inserra e colaboradores (1998) fizeram uma nova adaptação da fórmula para camundongos, considerando significativos apenas o ED e CP.

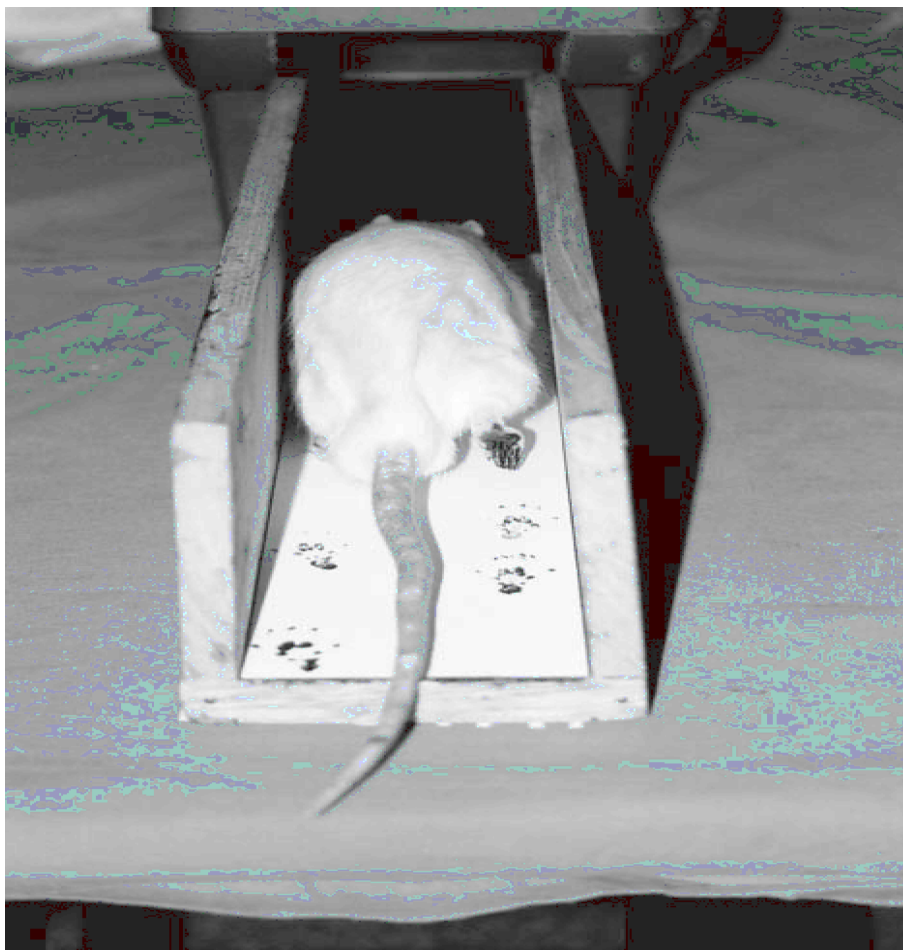


Figura 6. Aparato para obtenção das pegadas usadas no Índice de Função do Ciático. O animal tem suas patas traseiras manchadas com tinta nanquim preta e caminha livremente em direção à caixa escura no final do corredor. As pegadas são impressas em um papel apropriado. Reproduzido de *Methods for the experimental functional assessment of the rat sciatic nerve regeneration*, Varejão et al., 2004.

Na tentativa de simplificar a obtenção das pegadas, Bervar (2000) propôs o Índice Estático do Ciático (IEC) para ratos, que utiliza os parâmetros das pegadas na posição estática, ao invés de serem obtidos durante a marcha. Como no seu método os animais são filmados por baixo de uma caixa de acrílico quando estão parados, não há o problema de variação das medidas devido à velocidade dos animais (Figura 7). A praticidade na obtenção do IEC associada à sua precisão o torna um método interessante e promissor para avaliação funcional após lesão

do nervo ciático. Porém, ele ainda não foi adaptado para o camundongo, que é muito mais utilizado em pesquisas básicas do que o rato, devido principalmente à disponibilidade de modelos transgênicos.

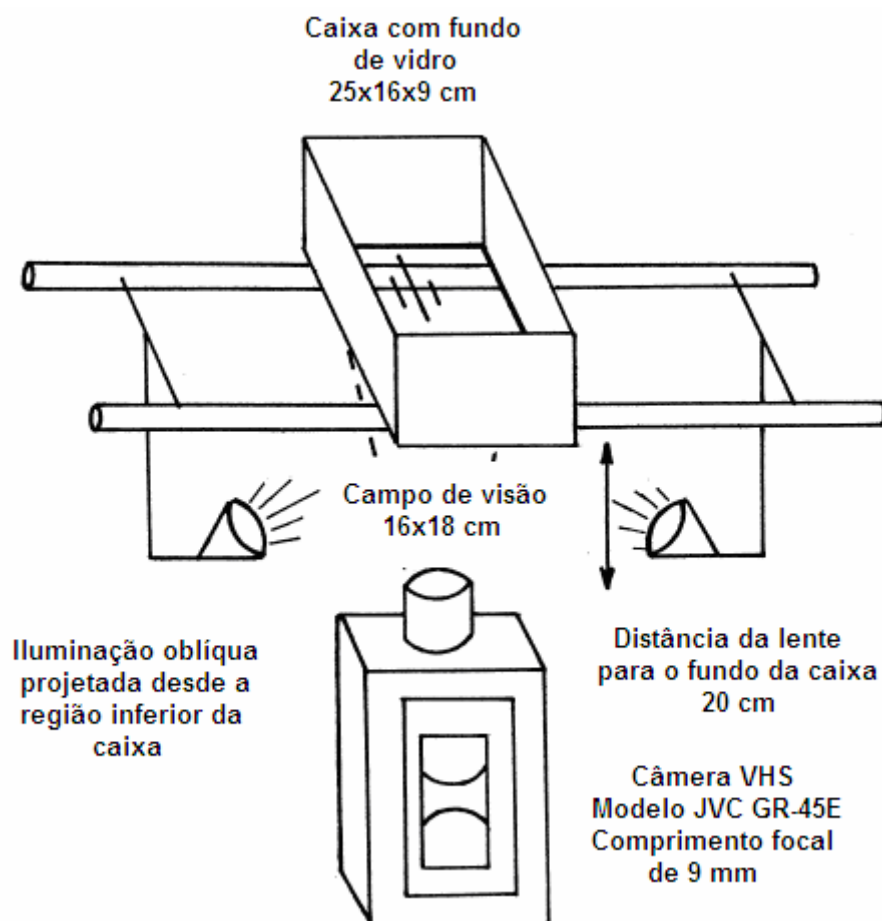


Figura 7. Aparato para a obtenção do Índice Estático do Ciático. Reproduzido e adaptado de *Vídeo Analysis of Standing – An Alternative Footprint Analysis to Assess Functional Loss Following Injury to Rat Sciatic Nerve*, Bervar, 2000

2. JUSTIFICATIVA

As lesões nervosas periféricas fazem parte de um conjunto de afecções normalmente subdiagnosticadas e subtratadas por profissionais de saúde. Quando a situação envolve uma lesão por transecção ou avulsão do nervo periférico, a sutura dos cotos é a conduta mais utilizada, porém os resultados são muitas vezes insatisfatórios. Nas lesões por esmagamento a conduta mais comum é “esperar o retorno das funções”, pois a manutenção dos tubos endoneurais facilita a regeneração.

As estratégias para incentivo da regeneração nervosa são importantes quando as lesões são por transecção ou avulsão e quando são muito próximas aos corpos celulares dos neurônios. As principais intervenções envolvem o uso de fatores neurotróficos, células-tronco, recursos físicos ou cirurgias. Muitas destas estratégias ainda não têm efetividade reconhecida e pouco se sabe sobre os mecanismos que estão envolvidos no seu funcionamento. No caso do uso de campos eletromagnéticos, a infinidade de métodos e parâmetros utilizados torna difícil a uniformização da pesquisa e das técnicas. Especialmente, a maioria dos trabalhos publicados até o momento usou corrente elétrica com eletrodos implantados ou percutâneos (técnicas locais) ou exposição de todo o corpo a campos magnéticos. É necessário que se conheça mais sobre outras formas de aplicação, como o uso transcutâneo de correntes elétricas ou a aplicação local de campos magnéticos. Por outro lado, é preciso desvendar os efeitos e mecanismos de ação de tais formas de terapia. Os resultados deste trabalho poderão ser utilizados para se conhecer melhor e ajudar a implementar o uso de recursos de baixo custo e simples aplicação.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral:

- Verificar o efeito de campos eminentemente elétricos ou magnéticos na regeneração nervosa periférica

3.2. Objetivos específicos:

- Adaptar o Índice Estático do Ciático para camundongos;
- Verificar se existe influência de EENT e CEMP na função locomotora e aspectos histológicos e ultraestruturais dos nervos tratados;
- Verificar se o CEMP influencia a expressão de espécies reativas de oxigênio.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo experimental foi realizado no biotério da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública e na Unidade de Microscopia Eletrônica do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz – FIOCRUZ / BA. Foi dividido em três etapas, sendo a primeira a adaptação do IEC para camundongos, a segunda a análise da influência da EENT na regeneração do nervo ciático submetido à lesão por esmagamento em camundongos e a terceira a análise da influência de um CEMP na regeneração usando o mesmo modelo anterior.

Em todos os experimentos foram usados camundongos suíços machos (*Mus musculus*), provenientes do biotério da Fundação Bahiana para Desenvolvimento das Ciências, pesando entre 35 e 45 g, mantidos em regime de 12/12 hs de ciclo de luz, com água e alimentação *ad libitum*. Como modelo de lesão nervosa periférica foi utilizado o esmagamento ou secção do nervo ciático. Para isto os animais foram anestesiados usando-se uma solução de cloridrato de cetamina (0,1mL/mg) e xylazina (0,2mL/mg) através da via intraperitoneal. Foram tomados como parâmetros para se verificar a efetividade da anestesia, a ausência dos reflexos flexores na cauda e pata operada, quando expostos a um estímulo doloroso (beliscão). Este protocolo anestésico foi usado durante os procedimentos cirúrgicos para lesão do nervo ciático e na eutanásia por perfusão transcardíaca, usada como etapa do processamento para microscopia eletrônica de transmissão. Quando ao final do período de acompanhamento de cada animal não necessitou de perfusão, os animais foram eutanasiados pelo mesmo procedimento anestésico seguido de deslocamento cervical e secção das carótidas. Durante o período de estimulação elétrica com EENT ou CEMP os animais foram anestesiados com halotano administrado através de um sistema de vaporização (Takaoka, EUA) associado a oxigênio na dose de 1 L/min.

Todos os projetos estavam de acordo com as normas dos Comitês de Ética no Uso de Animais de Laboratório do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz e da Fundação Bahiana para Desenvolvimento das Ciências.

4.1. Procedimento cirúrgico

A pele sob a região glútea direita foi tricotomizada e realizada assepsia com uma solução iodada (Povidine tópico), realizando-se então uma incisão longitudinal às fibras do músculo glúteo. O nervo ciático foi exposto e separado das estruturas vizinhas, sendo esmagado com uma pinça porta-agulha, com os dentes raspados e mantida fechada na primeira trava, por 30 segundos, ou totalmente seccionado a uma distância de um centímetro da medula espinhal. Quando seccionados, os cotos dos nervos foram deixados livres. Os planos muscular e cutâneo foram então suturados, o primeiro com fio absorvível e o segundo com fio não absorvível, ambos 4.0. Os animais foram mantidos em regime de recuperação cirúrgica dentro de suas caixas, sem maravalha, expostos a uma lâmpada incandescente colocada a uma distância de aproximadamente um metro, para prevenir a hipotermia. Durante o período dos experimentos foram observados sinais de sofrimento devido à lesão nervosa, como autotomia, perda de peso e hipomobilidade geral. Ao final do período de experimentação as carcaças dos animais foram depositadas em local apropriado para descarte de material biológico.

O cálculo amostral para cada um dos experimentos e o poder do estudo foi realizado utilizando-se o programa PEPI Versão 4.0 (ABRAMSON e GAHLINGER). Para a análise estatística foi considerado o intervalo de confiança de 95%, com alfa de 5% ($P < 0,05$) e poder de 80%. A análise descritiva foi feita através das médias ou medianas associadas às medidas

de dispersão cabíveis (desvio padrão ou quartis 25/75). Tanto as medidas das variáveis de cada estudo quanto à análise estatística foram realizadas de maneira cega. A análise específica para cada fase do trabalho está descrita na sua respectiva seção.

4.2. Adaptação do Índice Estático do Ciático para Camundongos

Nesta fase foram utilizados 63 animais, acondicionados em caixas próprias para sua espécie, um por caixa.

4.2.1. Testes funcionais

A cada semana, os animais foram submetidos a dois tipos diferentes de testes para avaliação da função da marcha após lesão do nervo ciático. No primeiro, os animais percorreram um corredor de acrílico com 4,5 cm de largura e 48 cm de comprimento que possuía um espelho situado abaixo do corredor a um ângulo de 45° (Figura 8). Quando em repouso, foram adquiridas três imagens de suas patas traseiras com uma *Web Cam (Drop Cam 100, Go Tec, China)* conectada a um computador e situada de forma perpendicular à parede do aparato de acrílico, a uma distância de 2,5 cm da linha que une suas bases. Após este procedimento os animais foram imobilizados, os aspectos plantares de suas patas pintados com tinta nanquim preta e, a seguir, incentivados a caminhar por um pequeno corredor de madeira, com as mesmas dimensões do corredor de acrílico, porém que possuía uma tira de papel próprio para impressão em nanquim em seu piso (Figura 6). As avaliações das pegadas foram feitas

semanalmente, por seis semanas, iniciando-se um dia antes da cirurgia, e então os animais foram eutanasiados.

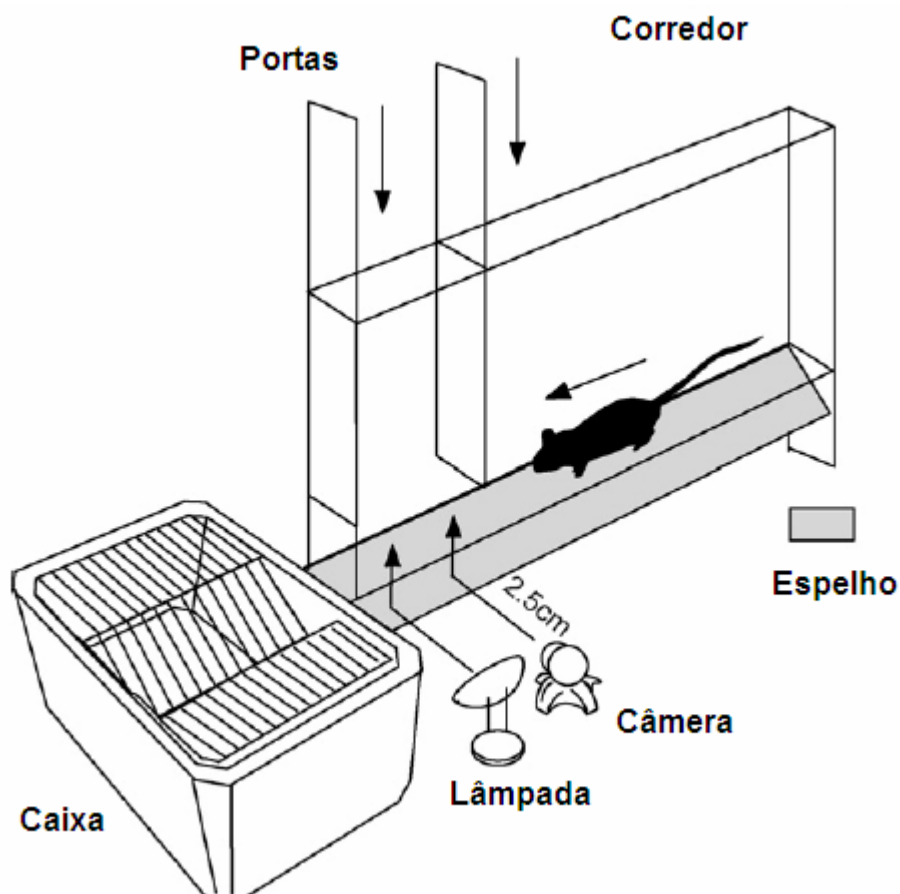


Figura 8. Dispositivo para avaliação da função locomotora. Os animais são incentivados a passar pelo corredor em direção à sua caixa. No final do caminho há uma parede de acrílico que impede a passagem e, neste lugar o animal para, sendo adquiridas fotos de suas patas através de um espelho colocado a 45° do piso. Para isto se utiliza uma *WebCam*, posicionada a 2,5 cm da linha que une as bases do dispositivo (detalhe à direita).

As pegadas provenientes das imagens adquiridas com *Web Cam* foram analisadas com o programa *Image J* (National Institute of Health - EUA), calibrado de acordo com um paquímetro escaneado. Esse mesmo paquímetro foi utilizado para se analisar as pegadas impressas. Os parâmetros avaliados em cada pegada foram a distância entre a ponta do primeiro e quinto dedos (ED), entre a ponta do segundo e quarto dedos (EID) e entre a ponta do terceiro dedo e o aspecto mais posterior da pegada (CP). Nas pegadas adquiridas com a

Web Cam, foi considerado o aspecto mais posterior da pegada como o ponto em que o contraste da imagem se modificou, com as margens da pata tornando-se menos definidas.

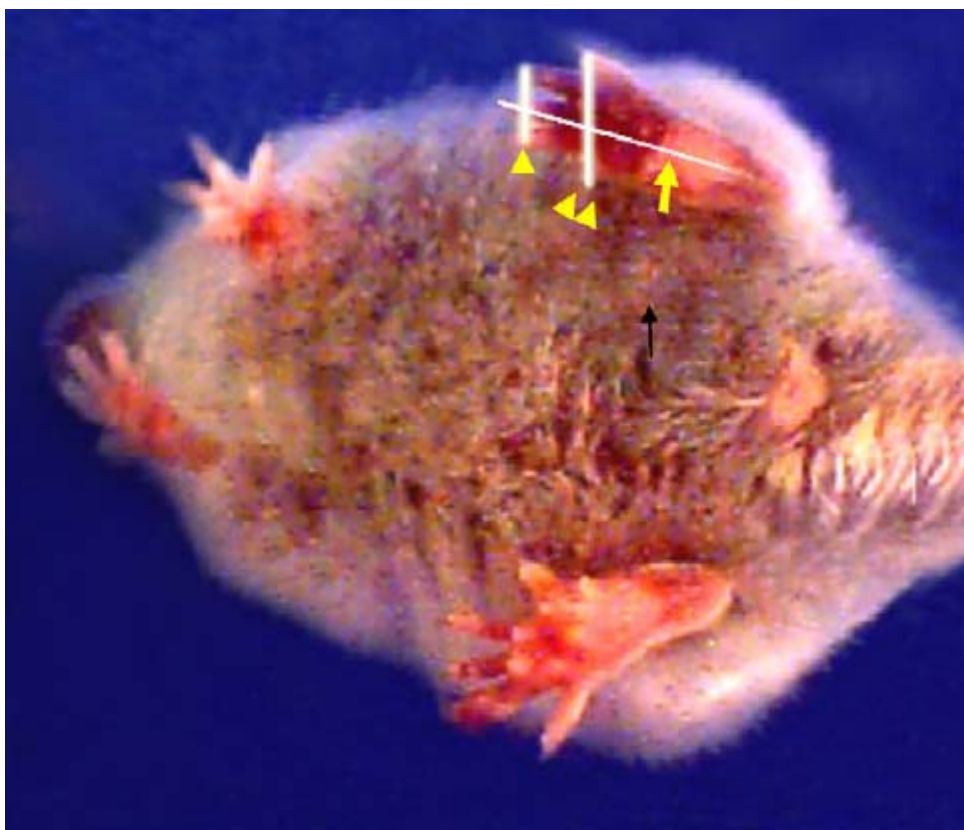


Figura 9. Fotografia mostrando o aspecto plantar de um camundongo. As barras mostram, na pata lesada, o espalhamento do primeiro ao quinto dedo (ED) (cabeça de seta dupla), o espalhamento intermediário dos dedos (EID), medido desde a ponta do segundo até a do quarto dedo (cabeça de seta) e o comprimento da pegada (CP), estimado pela distância da ponta do terceiro dedo até a parte mais posterior da pata em contato com o piso (seta). Três fotos foram adquiridas de cada animal e o ED, EID e CP estimados para avaliar a função da marcha. Notar que a pata lesada apresenta menor ED e EID e maior CP do que a lesada.

Os fatores para cada parâmetro (ED, EID e CP) foram calculados através da fórmula: valor do lado lesado – valor do lado não lesado / valor do lado não lesado (Ex.: Fator ED: FED = ED experimental – ED normal / ED normal), e o IFC com a fórmula concebida para camundongos por Inserra e colaboradores. (1998), onde $IFC = 118,9 \times FED - 51,2 \times FCP - 7,5$.

4.2.2. Análise dos dados

A análise estatística foi realizada em vários passos. Primeiro, foi avaliado o grau de variabilidade na função por grupo, através do período de seis semanas do experimento, usando-se a análise de variância pareada de Friedmann dos valores do IFC. O segundo passo foi achar a correlação entre cada parâmetro de pegada e seus fatores, obtidos das duas formas diferentes (foto e pegadas impressas) utilizando-se o Índice de Correlação de Pearson. Em terceiro, foi avaliada a reprodutibilidade das medidas, usando a análise de variância a um critério (ANOVA One way), para comparar a variabilidade de cada parâmetro entre as duas formas de avaliação, através do período experimental. Após um teste de ajustamento de curvas, para se verificar se os dados estavam distribuídos de uma maneira linear procedeu-se a análise de regressão linear múltipla. O SFI obtido através de todo o período foi considerado como variável dependente, e como variáveis independentes os fatores ED, EID e CP obtidos através das fotografias feitas no corredor de acrílico. Definindo-se o estado funcional como zero no pré-operatório e -100 no pós-operatório, a análise de regressão definiu então a fórmula do Índice Estático do Ciático para camundongos (IECc). A seguir foi feita uma análise de correlação entre o IFC e o IECc, agrupando novamente todos os valores dos três grupos (esmagamento, secção e controle), usando o índice de correlação de Pearson. A análise foi realizada com o pacote estatístico OPENSTAT 4.0.

4.3. Avaliação do efeito de campos eminentemente elétricos ou magnéticos na regeneração do nervo ciático submetido a lesão por esmagamento em camundongos

Foram utilizados 49 animais acondicionados em caixas próprias para sua espécie, um por caixa. Todos os animais sofreram lesão por esmagamento no nervo ciático direito, como descrito anteriormente. A variável independente foi considerada a exposição ou não à EENT ou ao CEMP. Quinze animais foram utilizados para o experimento com EENT e 34 para o experimento com CEMP.

4.3.1. Procedimento para estimulação elétrica

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em três grupos: EENT A, submetido à EENT com frequência portadora de 4 Hz, duração de pulso de 250 μ s, frequência de modulação de 2 Hz, com amplitude de corrente no limiar motor (5 mA) (n=5); EENT C, submetido a EENT com frequência de 100 Hz, duração de pulso de 80 μ s, padrão contínuo de pulsos, com amplitude de corrente exatamente abaixo do limiar motor (6 mA) (n= 5); e controle, submetido somente à anestesia para estimulação similar àquela dos dois outros grupos, porém sem receber tratamento (n=5). Devido ao fato de que a aplicação de correntes elétricas requer o uso de eletrodos em contato com a pele, a estimulação foi iniciada a partir do quarto dia após a lesão, para que se evitassem os efeitos mecânicos deletérios dos eletrodos sobre a cicatriz. Os dois grupos estimulados receberam estimulação elétrica através da pele (EENT), usando eletrodos de silicone / carbono com dimensões 0,5 x 0,5 cm e distância de 0,6 cm entre elas. Foi utilizado um aparelho gerador de corrente da marca Quark, com dois canais

(QUARK Produtos Médicos, Brasil). O meio de condução foi um gel de carbopol especial para uso em eletroestimulação terapêutica. Os eletrodos foram posicionados no trajeto da cicatriz cirúrgica com o pólo positivo proximal e o negativo distal à lesão. Os camundongos foram tratados com uma das formas de corrente por 30 minutos, cinco vezes por semana, durante cinco semanas, enquanto que o grupo controle era anestesiado pelo mesmo período, mas não se submetia a nenhuma intervenção.

4.3.2. Procedimento para a estimulação com o campo eletromagnético pulsado de baixa frequência

Os animais foram distribuídos em dois grupos: CEMP (n=17), submetidos a um campo eletromagnético com frequência de 72 Hz, dois Gauss de amplitude, duração de pulso <200 nanosegundos (ns) e tempo de subida abaixo de 10 ns (dB/dt) (SOLO - EM PROBE Technologies, EUA). O dispositivo encontrava-se tocando a pele do animal, focado sobre a cicatriz cirúrgica; Controle (n=17), animais anestesiados pelo mesmo período, mas que não sofreram tratamento. O tratamento foi executado 30 minutos, cinco vezes por semana, durante três semanas.

4.3.3. Testes de avaliação da função locomotora

Os animais foram avaliados semanalmente durante o período experimental através da aquisição de fotos seguindo o modelo para obtenção do IECc, descrita na primeira parte da seção de material e métodos

4.3.4. Processamento para microscopia óptica e eletrônica de transmissão

No dia subsequente ao último dia de cada experimento, todos os animais do experimento de EENT e 10 animais do experimento de CEMP (cinco experimentais e cinco controles) foram anestesiados e submetidos à perfusão intracardíaca. O procedimento consistiu em abrir o abdômen, cortar o diafragma e depois a caixa torácica longitudinalmente, começando pelo processo xifóide, a fim de expor o coração. Em seguida foi inserido no ventrículo esquerdo um escalpe ligado a uma seringa de vidro com solução fixadora (Paraformaldeído - PA a 4% e glutaraldeído - GA a 2% em tampão cacodilato 0,1M, pH 7,4) 50 mL. A seguir, o átrio direito foi seccionado e a solução administrada. O procedimento foi considerado terminado quando o animal estivesse duro, os órgãos pálidos e os vasos livres de sangue.

Os nervos ciáticos foram dissecados bilateralmente, sendo coletados três segmentos de dois milímetros cada do lado lesado e tratado e um segmento do lado não lesado. O primeiro segmento distava três milímetros da lesão (Figura 10). A porção entre a área da lesão e o primeiro segmento foi descartada por ser uma região muito próxima do esmagamento, onde as alterações morfológicas poderiam ser decorrentes da lesão mecânica compressiva.

Todos os segmentos foram imersos em solução fixadora de GA a 2,5% e PA a 4% em TPO₄ 0,1M (pH 7,4). Em seguida foram lavados com o mesmo tampão por duas vezes, cinco minutos cada, fixados em uma solução contendo tetróxido de ósmio (OsO₄) a 1%, ferricianeto de potássio (K₄[Fe(CN)₆]) a 0,8% e cloreto de cálcio (CaCl₂) 5 mM em tampão cacodilato por uma hora (agitando a cada 10 minutos). Após isto foram lavados em tampão cacodilato 0,1 M (pH 7,4) por três vezes cinco minutos cada e imersos em acetato de uranila a 1%, no escuro durante a noite.

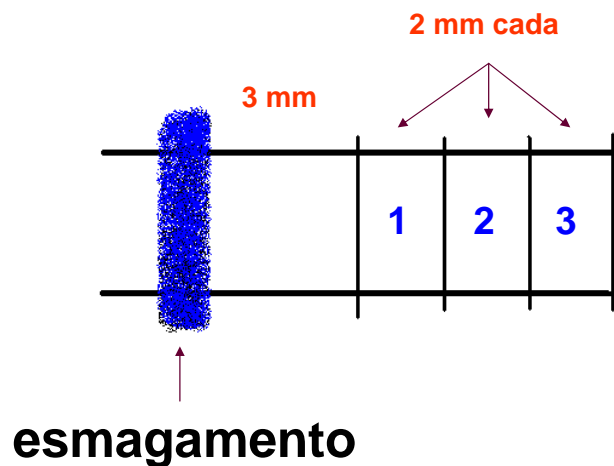


Figura 10. Local da lesão por esmagamento e das amostras dos nervos estudados. O esmagamento dos nervos ciáticos foi realizado próximo ao local em que ele sai do forame obturado. Foram coletados três segmentos de dois milímetros distais à lesão para análise histológica, estando o primeiro a três centímetros da lesão.

No dia seguinte os espécimes foram lavados em água destilada e desidratados em concentrações crescentes de acetona a 30, 50, 70, 80, 90 (duas lavagens de sete minutos cada) e 100% (duas lavagens de 15 minutos cada) e infiltrados com resina *Poly Bed* mais acetona 100% na proporção de 1/1 durante a noite no agitador. No terceiro dia foram infiltrados com resina *Poly Bed* pura no período da manhã, emblocados e orientados, no final da tarde, para cortes transversais e polimerizados a 60° C por 48 horas.

4.3.4.1. Microscopia óptica

O segmento proximal do lado lesado (segmento 1 – Figura 10) e o seu correspondente do lado não lesado foram usados para as análises. Os blocos foram aparados para que se pudesse retirar o excesso de resina que cobria o nervo. A trimagem foi feita em forma de trapézio e a partir daí obtidos cortes semi-finos (500 nm) com navalhas de vidro em um ultramicrótomo (Ultracut – Reichert-Jung). Os cortes foram corados com azul de toluidina para observação ao microscópio de campo claro. Foram adquiridas imagens com uma câmara digital (Evolution Color Modelo PL 1642 - Media Cybernetics) acoplada a um microscópio óptico (Olympus CX41) com aumento de 1.000 vezes para análise histológica e mensuração da área e número de vasos sangüíneos.

4.3.4.2. Microscopia eletrônica de transmissão

Os mesmos segmentos usados para análise na microscopia óptica serviram para a microscopia eletrônica, sendo obtidos cortes ultra-finos (70 nm) com navalha de diamante no ultramicrótomo (Ultracut – Reichert-Jung) e coletados em grades de cobre. A contrastação foi feita com impregnação em acetato de uranila por 30 minutos, seguida de três lavagens em água destilada e impregnação em citrato de chumbo por mais 10 minutos.

As imagens foram adquiridas de dez campos escolhidos de forma sistemática em cada grade, com aumento de 7.000 vezes. Para isto foi utilizado um microscópio eletrônico de transmissão (Zeiss EM 109) acoplado a um sistema de aquisição de imagens (MegaView II – Soft-Imaging-System).

Utilizando a microscopia eletrônica de transmissão foram avaliados a densidade de fibras, o diâmetro dos axônios mielinizados e não-mielinizados e o coeficiente *g* (*g ratio* - diâmetro do axônio / diâmetro da fibra mielinizados nos grupos tratados e controles (variáveis dependentes)).

4.3.5. Análise da formação de espécies reativas de oxigênio

Após o último dia de estimulação, sete animais estimulados com o CEMP foram alocados para a análise da formação de espécies reativas de oxigênio através do método de TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico - TBA), que se baseia no nível de peroxidação lipídica, sendo estes, um subproduto da produção de radicais livres. Os animais foram sacrificados por indução anestésica usando cloridrato de cetamina e xylazina como descrito previamente e, em seguida, deslocamento cervical associado a secção das carótidas. Segmentos de dois milímetros dos nervos ciáticos lesados e não-lesados incluindo a área da lesão foram retirados, isolados dos tecidos moles adjacentes (fáscia e músculos), lavados em solução salina tamponada com fosfato de sódio (PBS) e ressuspensos em 200 µL do mesmo tampão acrescido de 200 µL de TBA 1%. Posteriormente as amostras foram incubadas entre 97 e 100°C por duas horas e meia para obtenção da reação colorimétrica. As substâncias reativas com TBA (TBARS) foram lidas em espectrofotômetro a 532 nm.

4.3.6. Análise dos dados

A variável independente para todos os grupos foi o uso da EENT ou do CEMP. As variáveis dependentes foram derivadas das análises funcionais, histomorfométricas e os valores da reação de TBARS obtidos através da espectrofotometria. Na avaliação funcional usando o IECc, foram realizadas comparações pareadas (intra-grupo, entre os dias) e não-pareadas (entre grupos, a cada dia de avaliação). Na análise histomorfométrica foram consideradas como variáveis dependentes o número e área dos vasos sanguíneos (obtidos no aumento de 1.000 vezes), a densidade e diâmetro das fibras mielinizadas estratificadas por diâmetro em 0-2, 2-6 e 6-12 μm , a densidade e diâmetro das fibras não-mielinizadas, a densidade dos núcleos de células de Schwann e o coeficiente g (obtido no aumento de 7.000 vezes), estratificado nas faixas de 0.1-0.4, 0.4-0.5, 0.5-0.6, 0.6-0.7 e 0.7-0.9. Na análise por estratos, em cada faixa foram incluídos os valores inferiores e excluídos os superiores (Ex.: a faixa de 0-2 incluiu valores de 0-1.99, excluindo o 2). Na análise da formação de espécies reativas de oxigênio foi considerada a transmitância da solução a 532nm.

As inferências pareadas foram realizadas pelo teste não-paramétrico de Friedman e as não-pareadas pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste post-hoc de Student-Newmann-Keuls, quando necessário.

5. RESULTADOS

5.1. Adaptação do Índice Estático do Ciático para camundongos (IECc)

Os animais foram analisados semanalmente, desde o dia imediatamente antes da cirurgia, e a análise foi realizada por seis semanas. A análise dos valores do IFC através do teste de Friedmann não mostrou nenhuma mudança significativa na função do grupo controle durante o período ($F=6,454$; $gl=6$; $P=0,3743$). Os animais que tiveram seus nervos ciáticos seccionados apresentaram um padrão diferente, com uma diminuição marcante na função na primeira semana de acompanhamento e manutenção deste estado até o final do experimento ($F=50,526$; $gl=6$; $P<0,0001$) (Figura 11). O grupo esmagamento também mostrou a mesma diminuição na função na primeira semana ($F=60,00$; $gl=6$; $P<0,0001$), mas recuperando a função normal da marcha a partir daí (Figura 11). Dois animais foram excluídos dos grupos esmagamento e secção, devido à autotomia da pata. A correlação entre as medidas obtidas pelas fotografias e pela impressão das pegadas, usando o índice de Pearson, foi significativa para todos os parâmetros ($P<0,000$). Embora algumas destas correlações tenham sido baixas (ED da pata não lesada e CP e EID da pata lesada, o restante mostrou correlação de média a moderada (Tabela 1). A análise da reprodutibilidade dos parâmetros mostrou coeficientes de variação na faixa de 8,73% (ED, lado não lesado, método de impressão das pegadas) a 28,57% (EID, pata não lesada, método de impressão das pegadas). Os dois métodos de aquisição das pegadas foram sempre diferentes, com o método da fotografia sendo sempre mais reprodutível do que o método de impressão das pegadas. Esse último, só teve melhor reprodutibilidade para o ED e EID das patas não lesadas. O lado lesado apresentou, quase sempre maiores coeficientes de variação (Tabela 2). O ED pareceu ser a medida mais acurada, com coeficientes de variação na faixa de 8,73 a 10,38%.

Tabela 1. Correlação entre as medidas das variáveis das pegadas (ED, EID, CP) obtidas por foto ou impressão e seus fatores calculados (Fator = lesado – não lesado / não lesado).

Parâmetro	Graus de liberdade	Coefficiente de correlação (r)	Nível de significância (valor de P)
Espalhamento dos dedos 1-5 (ED)			
			P<0,000
Pata posterior não-lesada	413	0,363	P<0,000
Pata posterior lesada	413	0,882	P<0,000
Fator ED	413	0,875	P<0,000
Espalhamento dos dedos 2-4 (EDI)			
Pata posterior não-lesada	413	0,609	P<0,000
Pata posterior lesada	413	0,213	P<0,000
Fator EDI	413	0,608	P<0,000
Comprimento da pegada (CP)			
Pata posterior não-lesada	413	0,234	P<0,000
Pata posterior lesada	413	0,540	P<0,000
Fator CP	413	0,488	P<0,000
Fator = lesado – não lesado / não lesado			

Tabela 2. Reprodutibilidade dos parâmetros das pegadas.

Parâmetro	Graus de liberdade ^a	Coeficiente médio de variação		Técnica mais reprodutível (Valor de P)
		Impressão	Foto	
Espalhamento dos dedos 1-5 (ED)				
Pata posterior não-lesada	1	8,73%	10,38%	Impressão (P<0,01)
Pata posterior lesada	1	29,41%	8,82%	Foto (P<0,00)
Espalhamento dos dedos 2-4 (EID)				
Pata posterior não-lesada	1	18,22%	16,33%	Foto (P<0,00)
Pata posterior lesada	1	26,19%	28,57%	Impressão (P<0,00)
Comprimento da pegada (CP)				
Pata posterior não-lesada	1	13,9%	9,32%	Foto (P<0,05)
Pata posterior lesada	1	27,76%	11,1%	Foto (P<0,00)

^a entre grupos

Tabela 3. Modelo de regressão linear, mostrando o poder de cada fator na fórmula final do IECc.

Fator	R	R ²	R ² ajustado	Erro- padrão	Influência em R ²	Influência em F	g.l.1	g.l.2	Significância das influências de F
Fator ED	0,883 ^a	0,779	0,778	17,74	0,779	1.445,22	1	410	P<0,000
Fator PL	0,893 ^b	0,797	0,796	17,04	0,008	35,38	1	409	P<0,000

^a Preditores (constante), FED foto

^b Preditores (constante), FED foto, FED impressão

Tabela 4. Resultados da análise de regressão linear, mostrando o coeficiente beta (β) de cada fator associados ao erro-padrão, a constante relacionada e o nível de significância das estimativas.

Fator da pegada	Coeficientes não-padronizados β	Erro-padrão	Coeficientes padronizados, beta	<i>t</i>	Nível de significância (Valor de P)
Constante	-9,949	1,034		-9,618	<0,000
Fator ED	101.29	5,29	0,765	19,146	<0,000
Fator EID	5,64	5,78	0,036	0,975	0,330
Fator CP	-54,03	9,13	-0,159	-5,918	<0,000

Para encontrar a fórmula do IECc, foi realizada a regressão linear múltipla, usando como variável dependente os valores do IEC, obtidos através de todo o período do experimento, envolvendo os três grupos de animais (controle, secção e esmagamento). Para minimizar erros, foram utilizados somente aqueles valores que estavam entre 10 e -100. Quinze valores foram excluídos por não estarem nesta faixa. As variáveis independentes foram os três fatores obtidos através das fotografias (FED, FEID e FCP). Um teste de ajustamento de curvas foi realizado para verificar se eles possuíam uma distribuição linear. Todos atingiram um nível significativo, com o teste F sendo sempre maior no FED ($F=1.445,22$; $P<0,000$), seguido pelo FEID ($F=450,72$; $P<0,000$) e FCP ($F=231,96$; $P<0,000$).

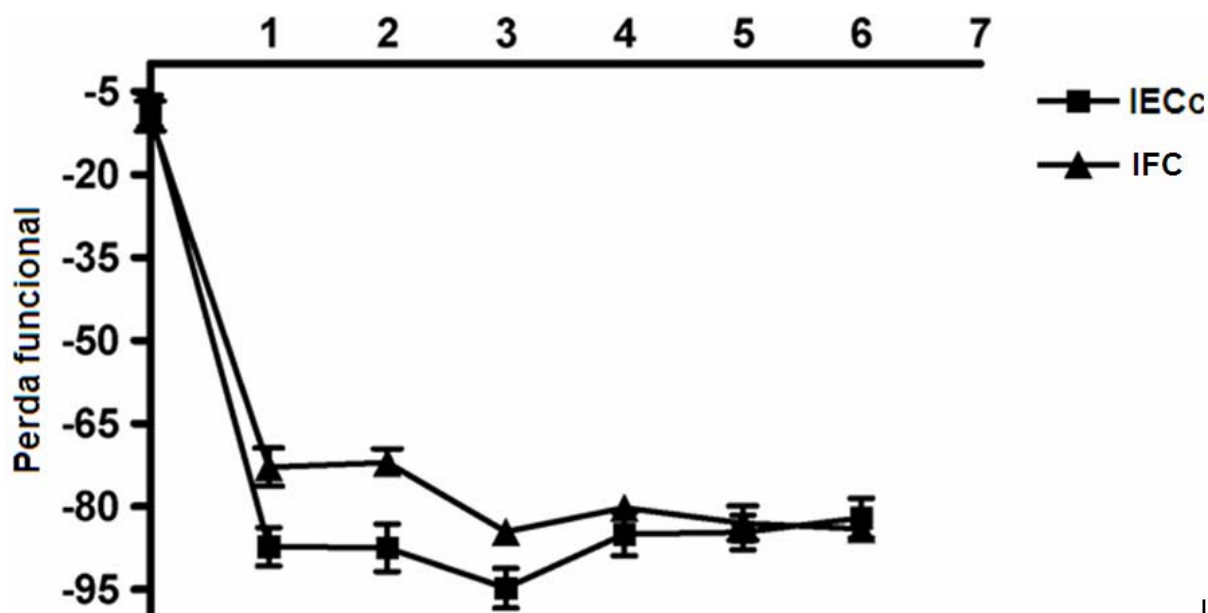


Figura 11. Comparação da recuperação determinada pelo Índice de Função do Ciático (IFC) (■) e Índice Estático do Ciático para camundongos (IECc) (▲) no grupo transecção. O gráfico mostra a função durante o período de seis semanas do experimento, avaliado pelo IFC e IECc. IECc parece ser um pouco mais sensível às consequências da transecção nervosa do que o IFC, pois apresenta uma maior queda nas primeiras três semanas de lesão. Dados são apresentados como média \pm erro-padrão.

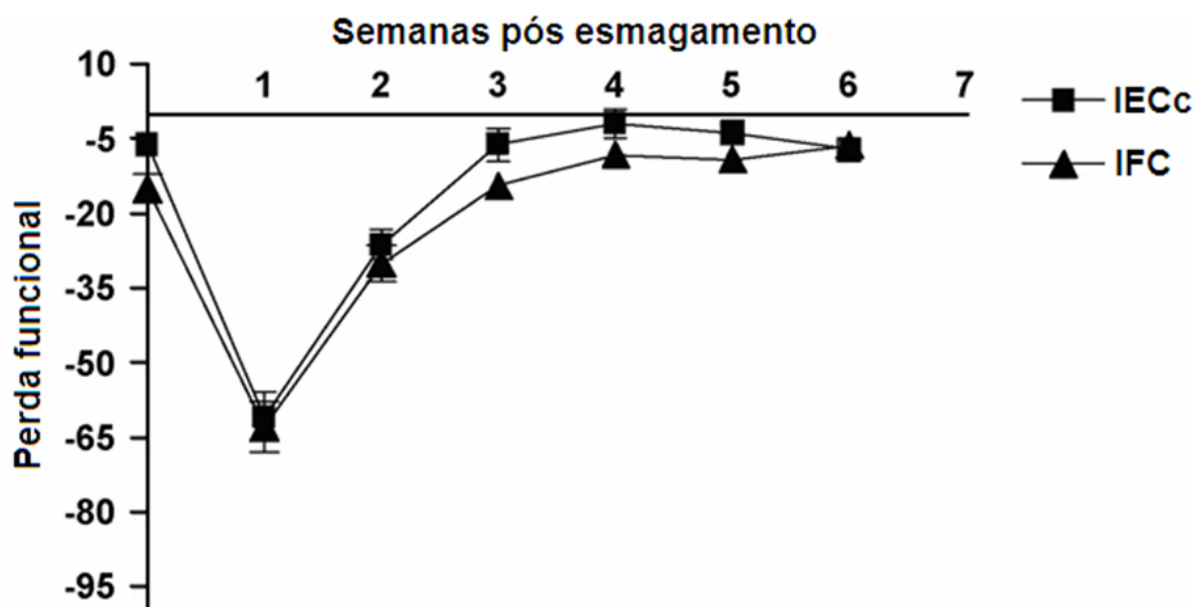


Figura 12. Comparação da recuperação determinada pelo Índice de Função do Ciático (IFC) (■) e Índice Estático do Ciático para camundongos (IECc) (▲) no grupo que sofreu esmagamento do nervo. O gráfico mostra a função durante o período de seis semanas do experimento, avaliado pelo IFC e IECc. Ambos os métodos apresentam um padrão similar, com uma importante diminuição na função na primeira semana

e retorno ao normal na terceira ou quarta semanas. Os dados são apresentados como média \pm erro-padrão.

A regressão múltipla foi realizada com o método passo a passo e mostrou que o ED foi o maior preditor da função, representando quase 78% das variações ($R^2=0,778$; $F=1.445,22$; $P<0,000$). O FEID não mudou a estimativa da função e o FCP gerou mudanças mínimas, porém significantes. Quando o FCP foi adicionado ao FED, eles passaram a representar, juntos, quase 80% das variações de função ($R^2=0,796$; $F=51.130,33$; $P<0,000$) (Tabela 3). Este modelo gerou a fórmula para o IECc (Tabela 4):

$$\text{IECc} = 101,3 \times \text{FED} - 54,03 \times \text{FCP} - 9,5$$

O valor de F para a equação foi 798,73, significativo no nível de $P<0,000$ (Tabela 4) e o próximo passo foi validar a nova fórmula estabelecendo sua correlação com o IFC, previamente estabelecido. O índice de Pearson foi utilizado para se estabelecer esta correlação, agrupando-se novamente todos os grupos através do período experimental. Foi

encontrada uma correlação alta e estatisticamente significativa entre os dois valores ($r=0,892$; bicaudal, $P<0,000$). O IECc gerou um padrão similar de função quando comparado com o IFC nos três grupos analisados. Pequenas diferenças foram notadas, como na primeira semana pós lesão, quando os valores do IFC não diminuíram tanto quanto os do IECc no grupo transecção (Figura 11). Estas diferenças, não foram notadas quando o IFC e IECc foram comparados no grupo esmagamento (Figura 12).

5.2. Efeitos de campos eletromagnéticos na regeneração do nervo ciático após lesão por esmagamento em camundongos

5.2.1. Estimulação elétrica nervosa transcutânea

Após a cirurgia para lesão do nervo ciático, todos os animais apresentaram sinais de disfunção na pata afetada. A partir do quarto dia de lesão foi iniciada a estimulação elétrica seguindo o protocolo previamente descrito.

5.2.1.1. Avaliação funcional

No último dia de avaliação, não existiam nos animais sinais de disfunção na marcha. Os três grupos exibiram um padrão similar de função durante todo o período de avaliação, como demonstrado pelo IECc. Na primeira semana após a cirurgia a marcha apresentava seus maiores impedimentos, mas após este período houve uma recuperação gradual nos três grupos (controle, EENT C e A). A análise pareada com o teste de Friedman mostrou diferenças significantes ao longo das semanas para os grupos controle ($Fr=15,63$; $P<0,01$), EENT C ($Fr=18,49$; $P<0,005$) e EENT A ($Fr=19,06$; $P<0,005$) (Figura 13). A análise não-pareada, comparando os três grupos ao longo das semanas, não mostrou diferenças significativas entre os grupos.

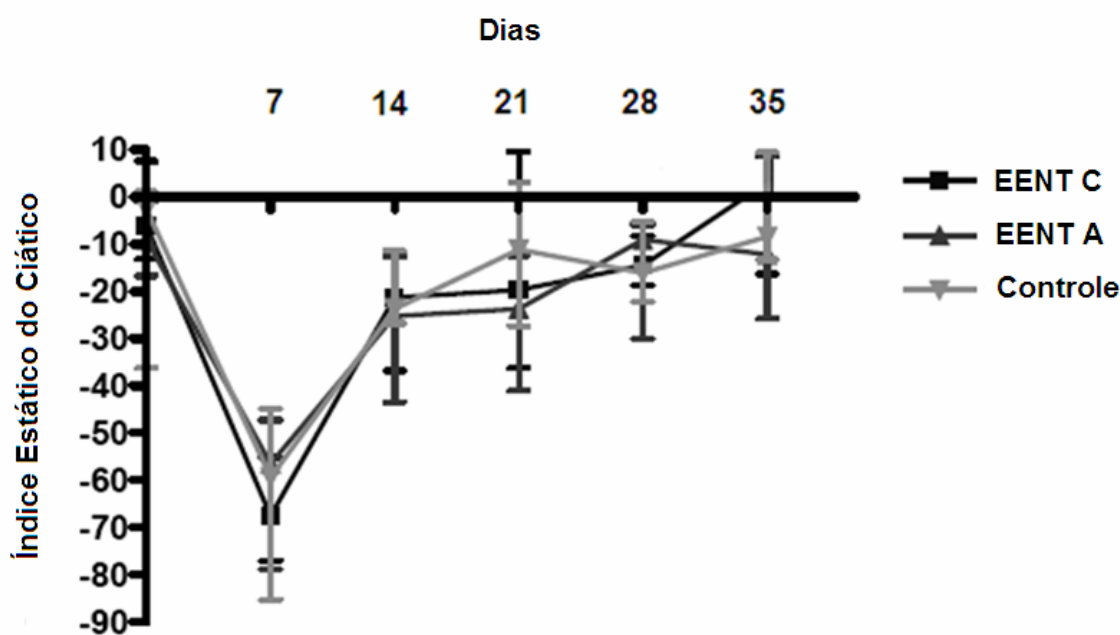


Figura 13. Índice Estático do Ciático para o camundongo (EENT). O gráfico mostra um padrão similar de função locomotora nos animais controles (lesão por esmagamento, sem estimulação), EENT C e A (lesão por esmagamento do nervo ciático unilateral e eletroestimulação) durante o período experimental de 35 dias. A função locomotora está pior na primeira semana após a lesão nos três grupos e retorna ao normal na segunda semana. Os dados são apresentados como mediana e quartis 25-75.

5.2.1.2. Avaliação morfológica

As alterações morfológicas foram avaliadas tanto nas imagens obtidas pela microscopia óptica quanto na eletrônica. Na microscopia óptica, os nervos esmagados e estimulados eletricamente normalmente apresentaram maiores espaços endoneurais, fibras de espessura menores e presença de axoplasma escuro, quando comparados com os nervos normais (Figuras 14 A, B, D). Somente os nervos estimulados com EENT A mostraram sinais de edema endoneural (Figura 14 B). Dois dos nervos controle tinham aparência similar aos normais, cujas fibras tinham distribuição mais compacta, com maiores diâmetros e menor espaço endoneural (Figura 14 C).

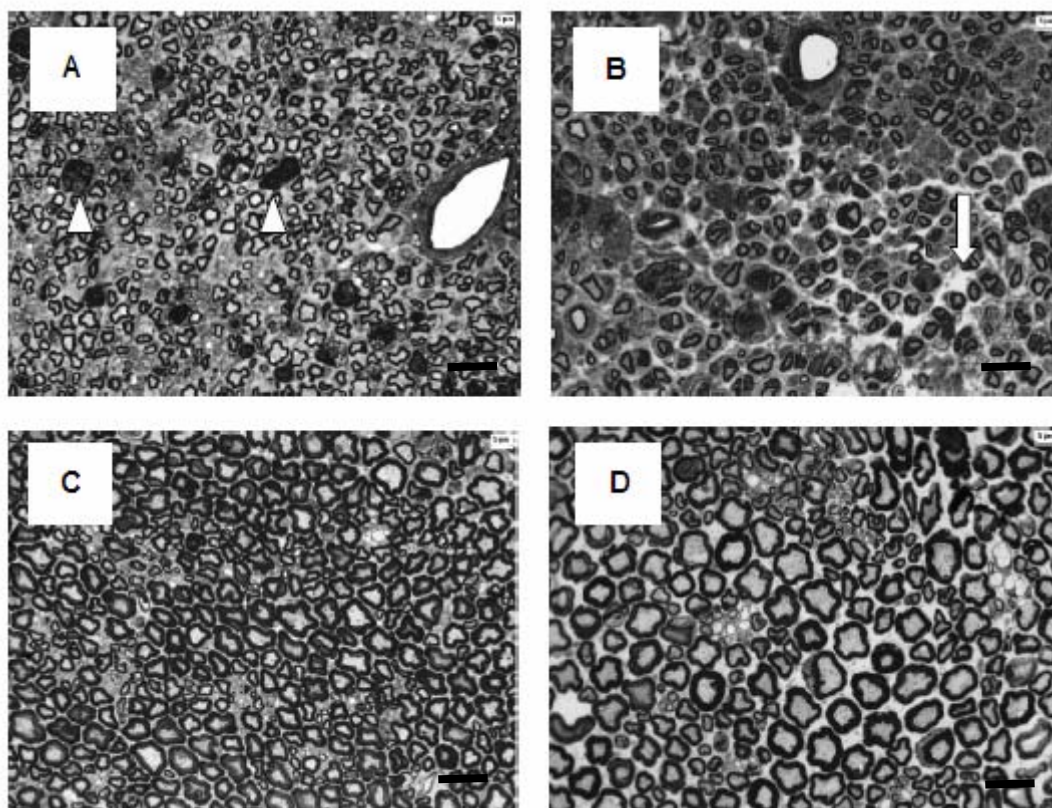


Figura 14. Cortes transversais semi-finos do nervo ciático (EENT). As imagens correspondem a cortes de uma área situada a 3 mm distal à lesão por esmagamento, cinco semanas após a lesão. **A.** Nervo EENT C (lesão por esmagamento e eletroestimulação com 100 Hz), apresentando fibras mielinizadas de fino calibre, dentre as quais encontram-se algumas com axoplasma escuro (cabeça de seta), que pode representar fibras ainda em processo de degeneração. **B.** Notar o edema (seta) encontrado em um dos nervos estimulados com EENT A (lesão por esmagamento e eletroestimulação com 4Hz), não encontrado nos outros nervos. Os nervos estimulados (A e B) sempre apresentaram fibras de menor calibre do que os controles (lesão por esmagamento sem eletroestimulação) ou normais (sem lesão ou eletroestimulação) (C e D). **C.** Um nervo controle apresentando algumas fibras com aspecto morfológico normal. **D.** Nervo normal, apresentando menos espaço endoneural e fibras com uma distribuição mais compacta. Aumento de 1.000X, barra 10 μ m.

A análise qualitativa das eletromicrografias foi consistente com os resultados descritos previamente para os nervos normais observados na microscopia óptica. Os nervos tratados com EENT C possuíam menos mielina, mas com aspecto axonal normal. Nestes nervos era mais fácil identificar ilhotas regenerativas, que se caracterizam por áreas em que se pode observar agrupamentos de fibra(s) envolta(s) pela membrana basal da(s) célula(s) de Schwann e relativamente isoladas no espaço endoneural (Figura 15 A). Os nervos EENT A e controles ocasionalmente apresentaram inclusões lipídicas, que não foram observadas nos nervos EENT C e normais (Figuras 15 B, C, D). A figura 15 C mostra um dos nervos controle, com um aspecto morfológico normal. Os nervos normais apresentaram menores espaços endoneurais e fibras com maior diâmetro e mais mielinizadas (Figura 15 D).

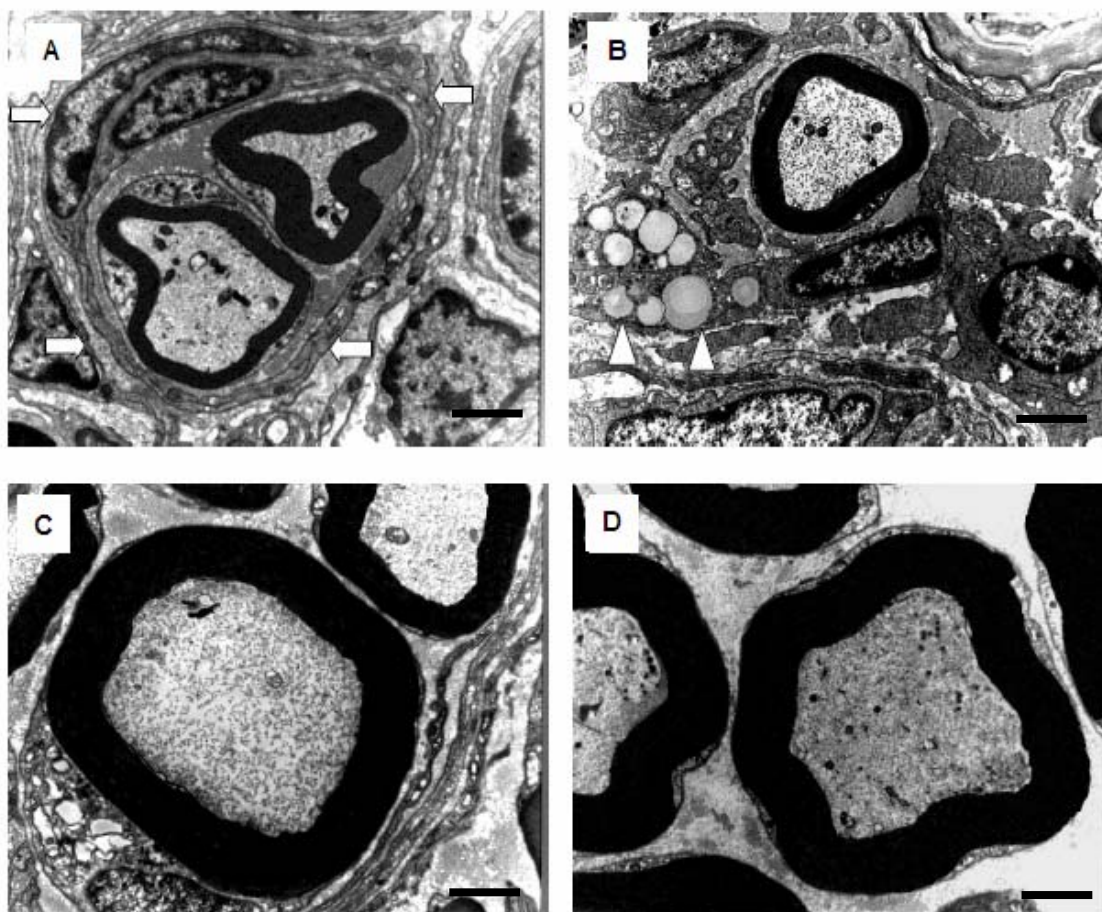


Figura 15. Cortes transversais ultra-finos do nervo ciático (EENT). As imagens correspondem a cortes de uma área situada a 3 mm distal à lesão por esmagamento, cinco semanas após a lesão. **A.** Nervo estimulado com EENT C (lesão por esmagamento e eletroestimulação com 100 Hz), mostrando uma ilhota regenerativa (setas) e fibras mielinizadas de fino calibre. **B.** Nervo estimulado com EENT A (lesão por esmagamento e eletroestimulação com 4 Hz), com um aspecto similar aos nervos estimulados com EENT C, também apresentando ilhotas regenerativas e algumas inclusões lipídicas (cabeça de seta). **C.** Nervo controle (lesão por esmagamento sem estimulação), apresentando fibras com maior diâmetro e mais mielinizadas do que os nervos lesados e estimulados. **D.** Nervo normal (sem lesão ou estimulação), apresentando fibras de grosso calibre e bem mielinizadas. Aumento de 7.000X, barra 2 μ m.

5.2.1.3. Histomorfometria

A análise morfométrica foi realizada utilizando-se tanto a microscopia óptica quanto eletrônica. O número e área de vasos sanguíneos, avaliados no aumento de 1.000 x, não diferiram entre os grupos ($P>0,05$). A avaliação das fibras mielinizadas estratificadas por diâmetro demonstrou que a maioria delas estava na faixa de 2-6 μm em todos os grupos. Na faixa de 6-12 μm de diâmetro, entretanto, os nervos estimulados possuíam menos fibras do que os controles ou normais. A densidade de núcleos de células de Schwann também foi maior nestes grupos (Tabela 5).

Tabela 5. Densidade de fibras e núcleos de células de Schwann (CS/mm²) – EENT.

Grupo	n	Fibras não-mielinizadas	Fibras mielinizadas			Núcleos de CS
			0-2µm	2-6µm	6-12µm	
Normal	15	2.590(1.192-3.372)	117,6(58,8-147,1)	1.529,4(1.235,3-1.735,3)	529,4(441,2-588,2)	0(0-0)
Controle	5	1.564(1.205-1.615)	58,8(0-117,6)	1.411,8(1.235,3-1.470,6)	352,9(294,1-588,2)	58,8(0-588)
EENT C	5	1.513 (1.282-2.538)	117,6(117,6-117,6)	1.705,9(1.470,6-1.823,5)	117,6(58,8-176,5) a*b**	58,8(58,8-58,8) a**
EENT A	5	1.179(1.103-1.205)	117,6(0-235,3)	1.647,1(1.529,4-1.882,4)	58,8(58,8-176,5) c*d****	58,8(29,4-58,8) c*

Dados expressos em termos de mediana e quartis 25-75.

EENT C x controle (a); EENT C x normal (b); EENT A x controle (c); EENT A x normal (d)

*P<0,05; **P<0,01; ****P<0,001 (Kruskal-Wallis + Student-Newmann-Keuls).

Em relação ao diâmetro das fibras, os nervos EENT C e controles apresentaram fibras significativamente menores do que os nervos normais, novamente na faixa de 6-12 μm (Tabela 6). Este padrão não foi observado quando da avaliação do diâmetro dos axônios (Tabela 7), indicando um menor conteúdo de mielina nos nervos EENT C e controles, quando comparados com os nervos normais. Os nervos EENT A atingiram valores normais de diâmetro de fibra e axônio, indicando mielinização normal (Tabelas 6 e 7).

Tabela 6. Diâmetro de fibras – EENT.

Grupo	n	Não-mielinizadas	Mielinizadas		
			0-2 μ m	2-6 μ m	6-12 μ m
Normal	15	0,59(0,56-0,61)	1,71(1,48-1,83)	3,84(3,63-3,97)	7,43(7,08-7,72)
Controle	5	0,61(0,54-0,63)	1,80(1,63-1,84)	4,12(3,24-4,16)	6,50(6,31-7,01) b*
EENT C	5	0,58(0,554-0,62)	1,58(1,42-1,68)	3,66(3,62-3,72)	6,57(6,35-6,78) a*
EENT A	5	0,63(0,53-0,66)	1,86(1,69-1,91)	3,59(3,46-3,82)	6,88(6,24-7,06)

Dados expressos em termos de mediana e quartis 25-75.

EENT C x normal (a); Controle x normal (b)

*P<0,05 (Kruskal-Wallis + Student-Newmann-Keuls)

Tabela 7. Diâmetro dos axônios de fibras mielinizadas – EENT.

Grupo	n	Diâmetro axonal		
		0-2 μ m	2-6 μ m	6-12 μ m
Normal	15	0,96(0,77-1,00)	2,03(1,91-2,14)	4,12(3,98-4,45)
Controle	5	1,07(0,95-1,14)	1,94(1,94-2,19)	4,48(4,36-4,61)
EENT C	5	0,97(0,87-1,00)	2,27(2,19-2,33)	4,67(4,31-4,85)
EENT A	5	0,73(0,70-0,91)	2,1(2,01-2,18)	4,00(3,82-4,46)

Dados expressos em termos de mediana e quartis 25-75.

A distribuição do coeficiente g também foi diferente entre os grupos. Os nervos normais, controles e EENT A apresentaram a maioria das fibras com coeficiente na faixa de 0,5-0,6. Os nervos EENT C, entretanto, diferiram dos outros apresentando a maioria de suas fibras na faixa de 0,6-0,7, confirmando a suposição de que nestes nervos a mielinização foi deficiente. Os nervos controle também mostraram um padrão alterado, com uma maior concentração de fibras na faixa de 0,7-0,9 (Figura 16).

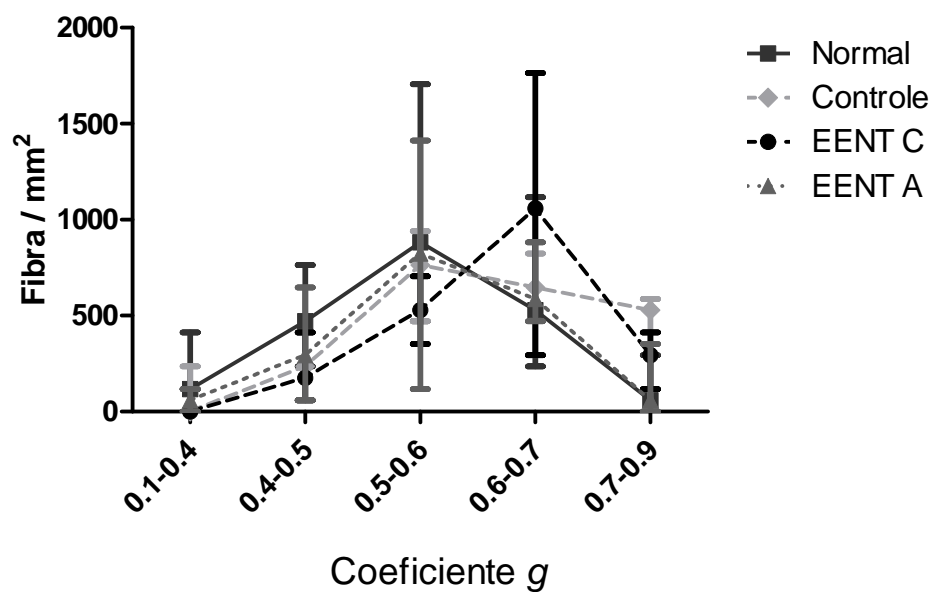


Figura 16. Coeficiente g estratificado por faixas (EENT). O coeficiente g foi obtido dividindo-se o diâmetro do axônio pelo diâmetro da fibra. As porções superiores de cada faixa foram incluídas e as inferiores excluídas. Notar que somente os nervos estimulados com EENT C (●) (lesão por esmagamento e eletroestimulação com 100 Hz) apresentaram um pico de densidade de fibras na faixa de 0,6-0,7. Os outros nervos apresentaram seus picos de densidade em 0,5-0,6. Os dados são apresentados como mediana e quartis 25-75.

5.2.2. Campo eletromagnético pulsado de baixa frequência (CEMP)

5.2.2.1. Avaliação funcional

Ao final da avaliação, na terceira semana após a lesão, os animais dos três grupos apresentavam um padrão de marcha sem características de disfunção sensório-motora. O padrão geral de disfunção durante o período experimental foi similar ao do experimento com EENT, ocorrendo piora na primeira semana após a cirurgia e a partir daí retorno à função normal, atingido pelos dois grupos na segunda semana após a lesão. Entretanto, a mediana dos valores do IECc não foram tão negativos quanto a dos animais submetidos a EENT, tanto no grupo experimental quanto no controle. A análise pareada com o teste de Friedman mostrou diferenças significantes através das semanas para os grupos controle ($Fr=25,73$; $P<0,0001$) e CEMP ($Fr=29,75$; $P<0,0001$), com a primeira semana apresentando os valores mais negativos de IECc. Na terceira semana de avaliação não havia mais diferença em relação ao período pré-operatório. As comparações entre grupos a cada dia não mostraram diferenças entre eles (Figura 17).

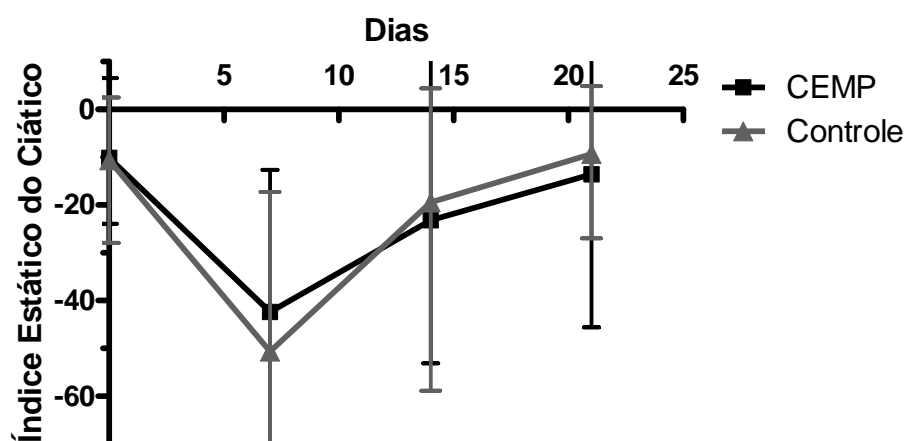


Figura 17. Índice Estático do Ciático para o camundongo (CEMP). O gráfico mostra os resultados do IEC durante o período de 21 dias do experimento. A função apresenta-se pior na primeira semana e um retorno gradual ao normal à partir daí, atingido na terceira semana após a lesão. Não há diferença nos valores do IEC entre os grupos controle (lesão por esmagamento do nervo ciático, sem estimulação) e CEMP (lesão por esmagamento e estimulação com CEMP de 72 Hz). Os dados são apresentados como mediana e quartis 25-75.

5.2.2.2. Avaliação morfológica

As alterações morfológicas foram avaliadas tanto nas imagens obtidas na microscopia óptica quanto na eletrônica. Um dos nervos do grupo normal foi descartado devido a problemas no emblocamento. Na microscopia óptica, tanto os nervos esmagados e estimulados com o CEMP quanto os controles apresentaram em geral fibras de menor calibre com maiores espaços endoneurais e presença de axoplasma escuro, quando comparados com os nervos normais (Figura 18 A, B, C). Os nervos estimulados com o CEMP apresentaram também vasos de grande diâmetro, enquanto que os controles e os normais possuíam mais vasos de pequeno e médio calibre. Em todos os nervos estimulados com o CEMP eram visíveis vasos endoneurais, o que não aconteceu nos controles ou normais. Não foram encontrados sinais de edema em nenhum dos nervos avaliados.

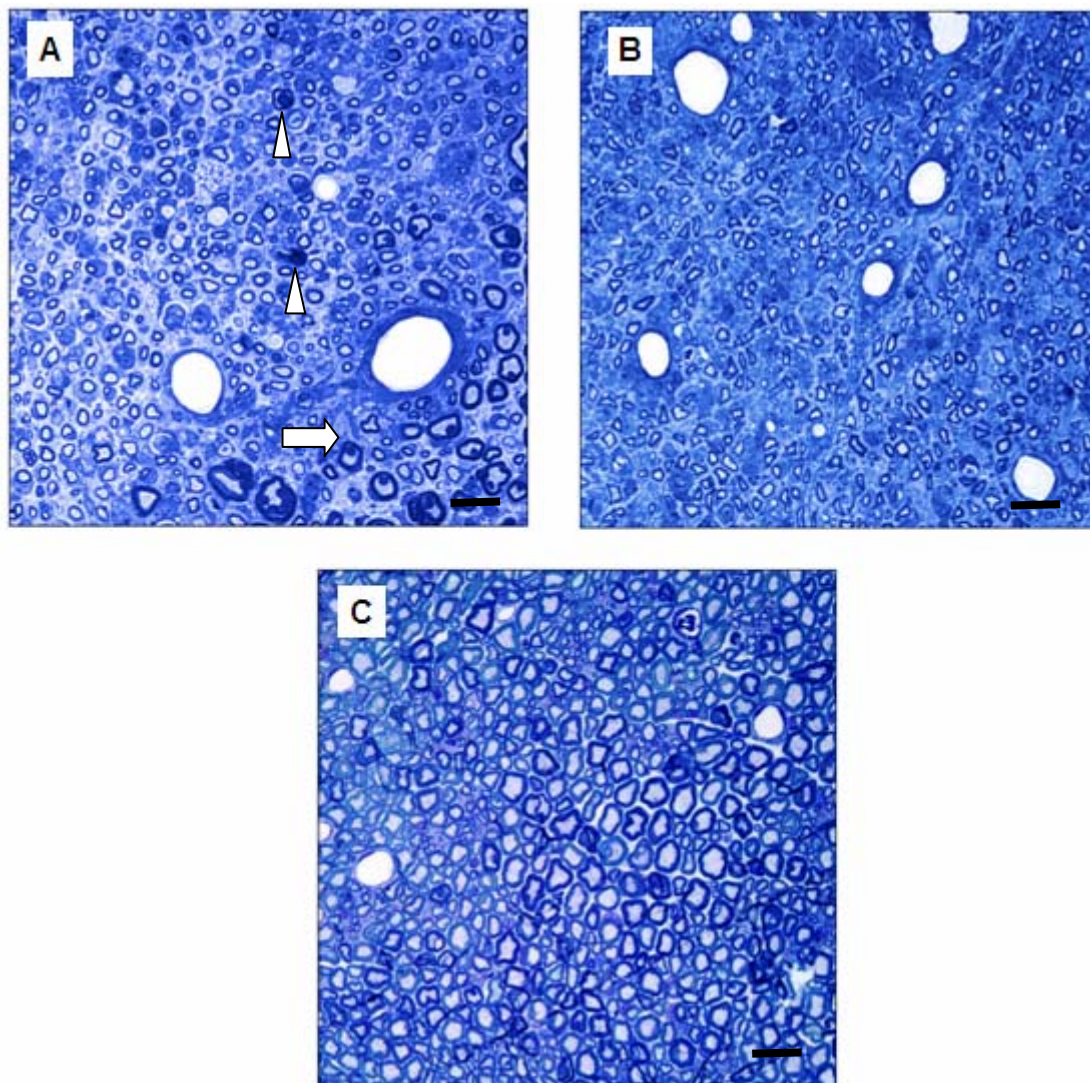


Figura 18. Cortes transversais semi-finos do nervo ciático (CEMP). As imagens correspondem a cortes de uma área situada a 3 mm distal à lesão por esmagamento, três semanas após a lesão. **A.** Nervo CEMP (lesão por esmagamento e exposição a um CEMP de 72 Hz) apresentando fibras mielinizadas predominantemente de fino calibre, porém com algumas fibras mais calibrosas agrupadas (seta). Notam-se fibras com axoplasma escuro (cabeça de seta), aumento do espaço endoneural e vasos de calibres variados. **B.** Nervo controle (lesão por esmagamento sem estimulação), com aspecto similar ao nervo estimulado com o CEMP; **C.** Nervo normal (sem lesão ou esmagamento), apresentando fibras mais mielinizadas mais calibrosas, distribuídas de forma mais compacta e com vasos de menor calibre. Aumento de 1.000X, barra 10 μ m.

Na microscopia eletrônica os nervos esmagados que foram ou não estimulados com o CEMP apresentaram aspecto similar, com fibras mielínicas de menor diâmetro, presença freqüente de “ilhas regenerativas”, inclusões lipídicas e figuras de mielina. Em alguns destes nervos foram encontradas fibras em processo inicial de regeneração, com camadas muito finas de mielina (Figuras 19 A, B). Os nervos normais apresentaram fibras mielinizadas de maior calibre, mielina bem formada e agrupamentos compactos de fibras amielínicas, além de possuírem menor espaço endoneural (Figura 19 C).

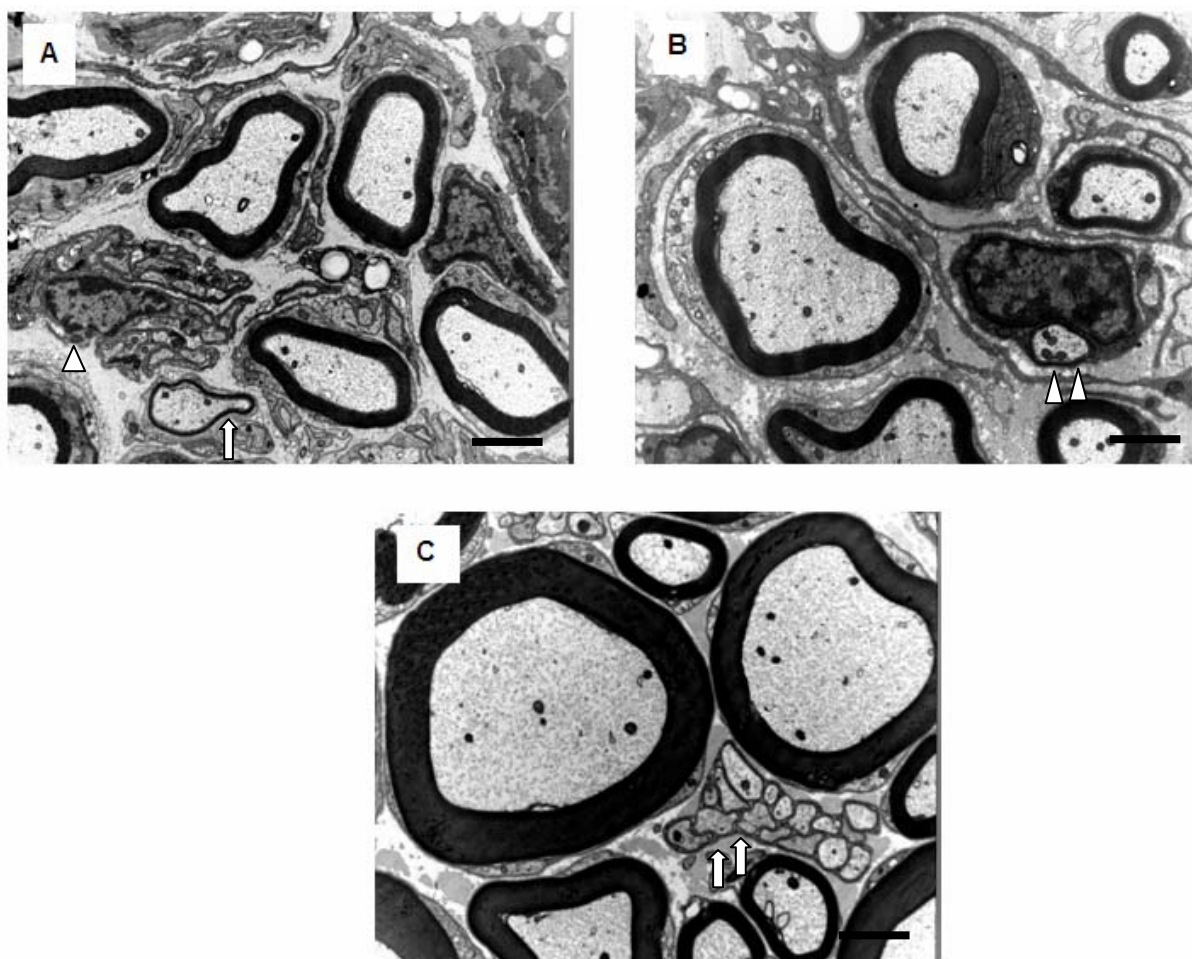


Figura 19. Cortes transversais ultra-finos do nervo ciático (CEMP). As imagens correspondem a cortes de uma área situada a 3 mm distal à lesão por esmagamento, três semanas após a lesão. **A.** Nervo CEMP (lesão por esmagamento e exposição a um CEMP de 72 Hz), apresentando fibras mielinizadas de calibres variados. Notam-se núcleos de células de Schwann (cabeça de seta) e uma fibra com camada muito fina de mielina (seta), provavelmente indicando regeneração inadequada ou atrasada. **B.** Nervo controle (lesão por esmagamento sem estimulação), onde se pode visualizar uma fibra envolta pela membrana basal de uma célula de Schwann que se encontra no processo inicial de mielinização, após 21 dias de lesão (cabeça de seta dupla). Nos nervos A e B são visíveis ilhotas regenerativas (incluindo as fibras mielinizadas), que fazem parte do processo inicial de regeneração no sistema nervoso periférico. **C.** Nervo normal (sem lesão ou estimulação), apresentando fibras mielinizadas de grosso calibre, menor espaço endoneural do que os nervos lesados e algumas fibras amielínicas agrupadas de forma compacta (seta dupla). Aumento de 7.000X, barra 2 μ m.

5.2.2.3. Histomorfometria

Na análise morfométrica utilizando-se a microscopia óptica, verificou-se que o número e área de vasos sanguíneos, avaliados no aumento de 1.000 x, não diferiram entre os grupos ($P>0,05$). A avaliação das fibras mielinizadas estratificadas por diâmetro demonstrou que a maioria delas estava na faixa de 2-6 μm em todos os grupos. Os nervos estimulados com o CEMP apresentaram uma quantidade significativamente maior de fibras mielinizadas de 2-6 μm do que os nervos normais, o que não aconteceu com os nervos controle. Esta proporção se inverteu na faixa de 6-12 μm de diâmetro, onde os nervos CEMP, mas não os controles, apresentaram uma densidade significativamente menor de fibras do que os normais. A densidade de núcleos de CS também foi maior nos nervos que sofreram esmagamento (controle e CEMP) em relação aos normais, mas não diferiu significativamente entre eles (Tabela 8).

Tabela 8. Densidade de fibras e núcleos de células de Schwann (CS/mm²) – CEMP.

Grupo	n	Fibras não-mielinizadas	Fibras mielinizadas			Núcleos de CS
			0-2µm	2-6µm	6-12µm	
Normal	9	5.294,12(2.720,59-8.544,12)	58,82(0-117,65)	882,35(823,53-1.411,77)	647,06(529,41-705,88)	58,82(0- 102,94)
Controle	5	9.294,12(7.176,47-9.352,94)	352,94(235,29-411,76)	1.823,53(1.647,06-1.882,35)	117,65(117,65-235,29) a *	823,53(529,41-882,35) a **
CEMP	5	7.705,88(3.764,71-10.058,82)	294,12(117,65-588,24)	2.058,82(1.705,88-2.058,82) a*	588,2(0,00-117,65) b**	705,88(647,06-882,35) b*

Dados expressos em termos de mediana e quartis 25-75.

Controle x normal (a); CEMP x normal (b);

*P<0,05; **P<0,01 (Kruskal-Wallis + Student-Newmann-Keuls)

Em relação ao diâmetro das fibras, os nervos CEMP e controles apresentaram fibras significativamente menores do que os nervos normais, novamente na faixa de 6-12 μm (Tabela 9). O diâmetro dos axônios de fibras mielinizadas manteve o mesmo padrão na faixa de 6-12 μm , porém na faixa de 2-6 μm de diâmetro, os axônios destas fibras foram significativamente menores do que os normais, o que não aconteceu nos nervos controle (Tabela 10). Estas relações indicam um atraso na regeneração ocorrido no grupo estimulado pelo CEMP.

Tabela 9. Diâmetro de fibras – CEMP.

Grupo	n	Não-mielinizadas	Mielinizadas		
			0-2 μ m	2-6 μ m	6-12 μ m
Normal	9	0,68(0,65-0,73)	1,81(1,76-1,87)	3,44(3,43-3,99)	8,17(7,35-8,78)
Controle	5	0,54(0,48-0,61)	1,60(1,54-1,71)	3,35(3,18-3,44)	6,55(6,55-6,61) a*
CEMP	5	0,53(0,48-0,64)	1,68(1,56-1,74)	3,30(2,93-3,54)	6,53(6,27-6,56) b*

Dados expressos em termos de mediana e quartis 25-75.

Controle x normal (a); CEMP x normal (b);

*P<0,05; **P<0,01 (Kruskal-Wallis + Student-Newmann-Keuls)

Tabela 10. Diâmetro dos axônios de fibras mielinizadas – CEMP.

Grupo	n	0-2 μ m	2-6 μ m	6-12 μ m
Normal	9	0,96(0,83-1,03)	2,30(2,15-2,46)	5,29(4,81-5,92)
Controle	5	0,93(0,91-0,96)	2,29(2,06-2,41)	4,76(4,53-5,07) a*
CEMP	5	0,99(0,92-1,09)	2,14(2,00-2,58) b*	4,59(4,12-4,62) b**

Dados expressos em termos de mediana e quartis 25-75.

Control x normal (a); CEMP x normal (b);

*P<0,05; **P<0,01 (Kruskal-Wallis + Student-Newmann-Keuls)

Em relação à distribuição do coeficiente g , os nervos normais e controles apresentaram a maioria das fibras na faixa de 0,6-0,7, enquanto que os nervos estimulados com o CEMP o tiveram na faixa de 0,7-0,9 (Figura 20), corroborando o fato de que houve inibição na regeneração nesse grupo.

A análise da formação de espécies reativas de oxigênio através do método de TBARS demonstrou uma diferença significativa entre os animais estimulados com o CEMP em relação aos controles e normais. O uso de CEMP esteve associado a um aumento importante na expressão de radicais livres, o que não aconteceu nos nervos controles ou normais (Figura 21).

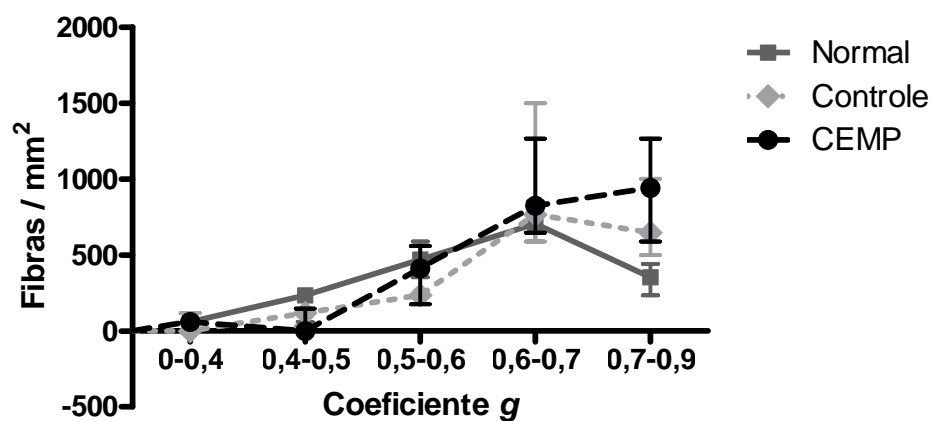


Figura 20. Coeficiente g estratificado por faixas (CEMP). O coeficiente g foi obtido dividindo-se o diâmetro do axônio pelo diâmetro da fibra. As porções superiores de cada faixa foram incluídas e as inferiores excluídas. Notar que enquanto os nervos normais (sem lesão ou estimulação com o CEMP) e os controles (lesão por esmagamento e estimulação com o CEMP de 72 Hz) possuem seus picos de coeficiente g em 0,6-0,7, os nervos lesados e estimulados com o CEMP possuem seu pico em 0,7-0,9, indicando mielinização deficiente neste grupo. Os dados são apresentados como mediana e quartis 25-75.

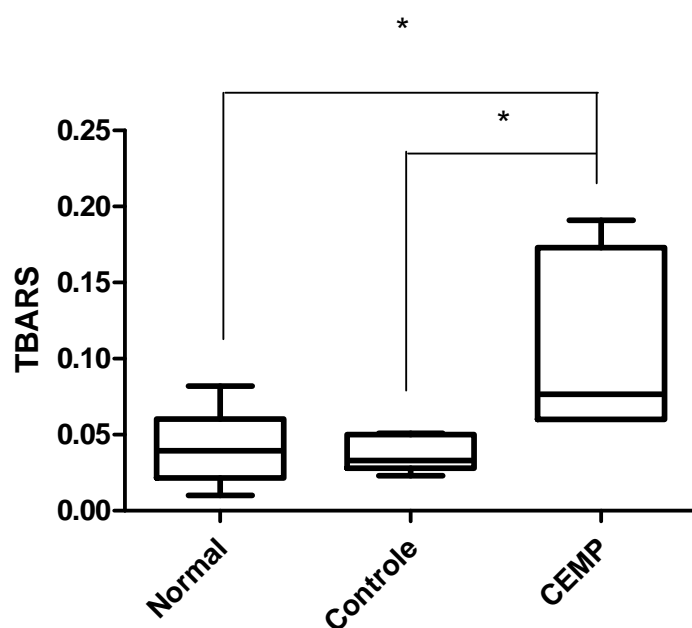


Figura 21. Análise da formação de espécies reativas de oxigênio pelo método de TBARS. A figura apresenta os resultados da formação de radicais livres avaliados através da peroxidação lipídica, usando o método de TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico), que se baseia no nível de peroxidação lipídica. Nota-se um aumento significativo da formação de radicais livres no grupo tratado com o CEMP, quando comparado com os nervos controles (lesão por esmagamento sem estimulação) ou normais (sem lesão ou estimulação) (* $P < 0,05$; Kruskal-Wallis + Student-Newman-Keuls). Não houve diferença significativa entre os nervos tratados e controles. Dados apresentados em termos de mediana, quartis e amplitude máxima e mínima.

6. DISCUSSÃO

Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de campos eletromagnéticos na regeneração nervosa periférica e foi desenvolvido em três estágios. A primeira parte dos nossos resultados apresenta a possibilidade de utilização de um teste mais simples e prático do que os já existentes para avaliar a função sensório-motora da pata após lesão experimental do nervo ciático em camundongos. A busca de um teste prático, reprodutível e sensível para analisar a recuperação da função após uma lesão nervosa periférica é muito importante, pois permite uma determinação quantitativa do processo de recuperação, que está relacionado à reinervação dos órgãos-alvo. Métodos de avaliação sensório-motora integrada em uma função podem fornecer dados importantes acerca da efetividade de estratégias usadas para se incentivar a regeneração. Muitos testes foram desenvolvidos e adaptados para este fim usando como modelo experimental o rato (De MEDINACELI et al., 1982; BAIN et al., 1989; SCHIAVETO de SOUZA et al., 2004; VAREJÃO et al., 2004a). Embora este roedor seja o animal mais amplamente utilizado em estudos sobre regeneração nervosa periférica, o camundongo não só é bem caracterizado geneticamente, mas também mais fácil de ser manipulado e mantido. O IFC foi adaptado para este animal por Inserra e colaboradores (1998). Neste trabalho, somente o CP o ED foram considerados relevantes para avaliar as variações de função. Para registrar as pegadas, o uso de tinta nanquim preta e uma tira de papel pode ser um método simples para se ter uma clara identificação dos parâmetros das pegadas. Com este método pode-se também escolher quais pegadas foram mais bem impressas, mas ao mesmo tempo muitas vezes a impressão necessita ser repetida, pois não ocorreu de forma adequada. Isto tende a estressar os animais e mudar a qualidade do teste. Alguns fatores podem também dificultar a impressão das pegadas, como contraturas,

autotomia, excrementos no corredor (BAIN et al., 1989; De MEDINACELI et al., 1982; VAREJÃO et al., 2004a) e variações na velocidade da marcha (WALKER et al., 1994a).

O IEC, desenvolvido por Bervar (2000), parece ser um teste mais fácil e rápido de ser executado e analisado, gerando menos estresse para os animais, pois não há necessidade de se impregnar a pata com tinta ou fazer os animais andarem repetidamente. No nosso método, similar ao de Bervar, nós encontramos imagens claras de serem analisadas, facilitando a mensuração dos parâmetros necessários. Além do mais, ele requer somente um dispositivo de baixo custo, que inclui um corredor de acrílico transparente, uma câmera fotográfica digital (*Web Cam*) e um sistema de processamento de imagens. Ele funciona bem sob baixa iluminação, aproximadamente 25% daquela utilizada por Bervar (2000), provavelmente reduzindo o estresse dos animais, que são aversivos à luz.

Neste experimento, os três grupos apresentaram padrões esperados de utilização da pata para apoio ou marcha durante o período experimental de seis semanas, similar aos estudos com ratos (BERVAR, 2000; GRASSO et al., 2004; VAREJÃO et al., 2004b) e camundongos (FUKUYAMA et al., 2000; ISLAMOV et al., 2002). Os métodos de registro de pegadas com tinta apresentaram diferentes reprodutibilidades. As medidas feitas nas fotos foram sempre mais acuradas, apresentando na maioria das vezes menores coeficientes de variação do que aquelas obtidas por impressão das pegadas. A maior variabilidade no método que usou tinta e papel deve ter sido devido a dificuldades com pegadas borradas, contraturas e variações da velocidade, aspectos também observados em outros estudos (DELLON e MACKINNON, 1989; JIHAD et al., 1989; VAREJÃO et al., 2001, 2004b; WALKER et al., 1994a). O estresse provocado pela repetição dos procedimentos de impressão das pegadas, algumas vezes necessário, também pode ser o motivo das maiores variações nos registros obtidos por

este método. O método de aquisição de fotos com o animal parado minimiza muitos destes problemas, pois o pesquisador pode esperar o momento em que o animal está parado para adquirir as imagens. Não existem também viéses em relação a pegadas borradas, pois se pode ver as patas como elas estão, ou à velocidade, pois os animais estão parados. Variações quanto ao peso ou sexo dos animais (DELLON e DELLON, 1991; PARKER e CLARK, 1990) também podem ser minimizadas, pois eles estão se apoiando em suas patas posteriores, dissipando as cargas mecânicas impostas no segmento, que poderiam influenciar os parâmetros das pegadas. Algumas vezes, os excrementos no corredor de acrílico, ou a adução forçada dos dedos pelo contato com as paredes laterais interferiram com as medidas. Nestas situações, a limpeza do dispositivo ou um pequeno incentivo para que o animal se movesse resolveu o problema. A adaptação prévia dos animais ao procedimento também se mostrou valiosa para que tais dificuldades não ocorressem. Se este cuidado era tomado, os animais apresentavam-se mais quietos, parando exatamente no final do corredor e mantendo a posição estática durante algum período.

A fórmula desenvolvida para o IECc mostrou a grande influência do ED como uma medida das disfunções da marcha relacionadas à lesão nervosa periférica. Este parâmetro representa a maioria das alterações e pode ser usado sozinho como um indicativo dos estágios da lesão, como tem sido demonstrado por outros pesquisadores (WALKER et al., 1994a; BERVAR, 2000). O EID, seguindo o mesmo padrão do IFC para camundongos (INSERRA et al., 1998), não tem um papel significativo em demonstrar as alterações da marcha após lesão do nervo ciático em camundongos, provavelmente porque sofre alterações similares nos grupos esmagamento e controle, ou por apresentar grande variabilidade. O CP apresentou uma contribuição pequena, mas significativa para a fórmula. Este parâmetro expressa a habilidade dos músculos solear e gastrocnêmio em manter o calcanhar elevado durante a marcha em

roedores. Como estes músculos são inervados pelo nervo ciático, devido à desnervação eles não conseguem manter o ângulo do tornozelo, permitindo que uma grande porção da pata entre em contato com o solo. Embora o CP possa ser muito variável devido à dificuldade de se estabelecer seu aspecto mais posterior, sua importância significativa também foi demonstrada no método de impressão das pegadas, que gerou o IFC (INSERRA et al., 1998).

A alta correlação entre o IFC e o IECc ($r = 0.892$, $P < 0.000$) dá validade ao uso da análise estática para avaliar disfunções do nervo ciático após lesão em camundongos. Além do mais, o IECc é muito mais simples de ser obtido, pois não requer o uso de tinta ou outros recursos que podem confundir as medidas de cada parâmetro. Também, como o animal não necessita andar, as variações devido à velocidade e mudanças na direção da marcha não influenciam o resultado do teste.

Na segunda parte dos nossos resultados apresentamos a influência de duas formas diferentes de utilização da energia eletromagnética, comumente usadas na prática clínica de profissionais de saúde, na regeneração do nervo ciático submetido a esmagamento. A primeira forma envolveu o uso de um campo eminentemente elétrico de baixa frequência e baixa intensidade aplicado de forma transcutânea (EENT) por cinco semanas e a segunda, o uso de um campo eminentemente magnético, também de baixa frequência e baixa intensidade (CEMP), aplicado por três semanas. Nas duas formas de aplicação o tempo diário de tratamento foi de 30 minutos, repetido cinco vezes por semana e respeitando os finais de semana. Tanto a EENT quanto o CEMP levaram a inibição da regeneração nervosa periférica, expressa pela menor quantidade de fibras de grosso calibre, que também eram menos mielinizadas e distribuídas de maneira menos compacta no endoneuro. A maior quantidade de núcleos de células de Schwann foi também outro indicativo do atraso

regenerativo. Embora sem influenciar significativamente na estrutura vascular, os nervos estimulados com o CEMP apresentaram aumento na formação de espécies reativas de oxigênio, que não foi medida nos nervos expostos à EENT. Embora os nervos estimulados tenham apresentado sinais de que tanto a EENT quanto o CEMP foram deletérios, a avaliação funcional durante o período experimental não mostrou diferenças significativas entre os grupos tratados e seus controles.

No nosso estudo, o aspecto morfológico dos nervos lesados e estimulados foi geralmente pior do que os nervos lesados, mas não estimulados ou normais. Os nervos estimulados eletricamente (EENT), mostraram sinais de comprometimento na regeneração tais como edema, distribuição menos compacta das fibras, maior quantidade de ilhotas regenerativas, presença de inclusões lipídicas e fibras com axoplasma escuro. Entretanto fibras não-mielinizadas ou tamanho e área de vasos não foram diferentes entre os grupos. Os estimulados com o CEMP não apresentaram sinais de edema, porém as outras características presentes nos estimulados eletricamente se mantiveram, embora a diferença para os seus controles não tenha sido tão importante quanto na EENT. Ocasionalmente, tanto os nervos estimulados com o CEMP como os seus controles apresentaram fibras mielinizadas com bainhas marcadamente finas, o que não foi notado nos animais do grupo EENT. Estes achados apontam para uma influência negativa das duas formas de estimulação na regeneração nervosa periférica, mais especificamente na sua fase final, já que as fibras não-mielinizadas ou as mielinizadas de fino calibre não foram afetadas.

A presença de um aspecto morfológico mais precário nos nervos tratados com o CEMP do que nos tratados com a EENT, expresso pela menor densidade e mielinização muito deficiente dos axônios e picos de coeficiente g , em faixas mais avançadas (0,7-0,9 no grupo CEMP,

contra 0,6-0,7 no grupo EENT C e 0,5-0,6 no grupo EENT A) pode ter acontecido devido ao acompanhamento pelo período de três e não de cinco semanas, como aconteceu nos estimulados com a EENT. Esta diferença de tempo de estimulação se deveu ao fato de que nos parecia, após os experimentos para adaptação do IECc e o com a EENT, que acompanhar os animais até a terceira semana pós-lesão seria suficiente, já que neste período os animais recuperavam a função sensório-motora da pata. Todavia, tanto o aspecto morfológico das fibras, quanto os dados morfométricos sugeriram que há diferenças estruturais e ultraestruturais durante estes dois períodos, que não são alcançadas pelos testes funcionais. Esta ausência de uma relação direta entre dados morfológicos e avaliação funcional já foi relatada em outros trabalhos (JIHAD et al., 1989; De MEDINACELLI, 1995). Entretanto os estudos morfológicos ou de condução nervosa não podem ser tão específicos quanto à avaliação da marcha na análise da reinervação adequada após lesões nervosas traumáticas (De MEDINACELI et al., 1983; GOLDBERG et al., 1984), pois não abordam a função global do nervo. Isto faz com que os testes funcionais continuem a ser utilizados.

A EENT necessita ultrapassar uma alta impedância elétrica exercida pela pele, e para isso normalmente emprega amplitudes de corrente elétrica 10 a 10.000 vezes maiores do que aquelas usadas nas aplicações com eletrodos percutâneos ou implantados. No nosso estudo, a combinação de amplitudes de pulso de 5 mA ou mais e duração de pulso maiores do que 80 μ s devem ter sido fatores importantes no atraso regenerativo provocado pelo uso de correntes elétricas. Cheng e colaboradores (1982) encontraram que em níveis menores (um miliampère), correntes elétricas inibiram a síntese de ATP em cultura de células. Desta forma, baixas concentrações de ATP podem ter levado a inibição no processo regenerativo no nervo periférico. Aydin e colaboradores (2006) fizeram exposição de todo o corpo em ratos com lesão por esmagamento do nervo fibular a um campo elétrico bifásico de 50 Hz, com um

campo elétrico induzido na faixa de 10mV/m e acharam uma discreta inibição na regeneração, expressa por defeitos morfológicos que não interferiram na marcha. É difícil se estimar a intensidade de um campo elétrico num determinado tecido quando se utiliza como modelo experimental o camundongo, já que não se conhece as constantes dielétricas destes animais. Entretanto, considerando-se que um campo com magnitude de 10mV/m seria o mínimo necessário para ultrapassar o ruído endógeno basal nas membranas celulares e produzir efeitos físicos e biológicos (ASTUMIAN et al., 1995; AYDIN et al., 2006), mesmo campos elétricos com intensidades muito baixas poderiam causar efeitos biológicos negativos na regeneração. Chen e colaboradores (2001) também acharam efeitos deletérios de campos elétricos na regeneração nervosa periférica, usando eletrodos percutâneos e uma corrente monofásica de um miliampère. Neste experimento, a corrente elétrica inibiu o número de fibras em regeneração que atravessaram uma lacuna experimental de 10 mm, embora as fibras que tenham conseguido ultrapassar essa barreira possuíssem melhor aspecto morfológico do que as do grupo controle. Estes resultados sugerem que correntes elétricas com amplitudes maiores do que um miliampère podem ter efeitos leves, mas significantes sobre a regeneração nervosa periférica, normalmente levando a uma diminuição no número e área de axônios ou conteúdo mielínico, mas insuficientes para afetar a função.

Os efeitos dos campos elétricos na circulação de sangue estão associados com o aumento do brotamento axonal e regeneração nervosa (McCAIG et al., 2005). Correntes elétricas de baixa frequência podem ativar seletivamente fibras sensoriais C e aumentar a expressão de neuropeptídeos tais como Substância P, que então geram vasodilatação (KASHIBA e UEDA, 1991; KJARTANSSON et al., 1988; BURSSSENS et al., 2005). A EENT A é usualmente associada com uma contração muscular rítmica, que também pode ter efeitos circulatórios (DOBSÁK et al., 2006). Entretanto, evidências recentes indicam que a EENT C também tem

efeito de aumento na circulação. De Vries e colaboradores (2007) demonstraram um aumento na circulação coronária conseqüente à EENT C. Os campos eminentemente magnéticos igualmente têm sido associados ao aumento na circulação sanguínea. Greenough (1992) demonstrou o efeito de aumento no calibre de vasos no pavilhão auditivo de coelhos após exposição a um CEMP. Varani e colaboradores (2002) demonstraram que um CEMP de 75 Hz, com amplitude variando de 0,2 a 3,5 mT, aplicado em cultura de neutrófilos por 30, 45, 60, 90 e 120 minutos, aumentou de maneira tempo e temperatura dependente a expressão de receptores A_2 de adenosina e a concentração de AMPc, enquanto que diminuiu a de superóxido aniônico (O_2^-). A ativação de receptores de adenosina A_{2a} está relacionada a aumento da circulação no nervo óptico (POLSKA et al., 2003) e medeia a vasodilatação cerebral induzida pela estimulação elétrica do nervo ciático (MENO et al., 2001). No nosso estudo, somente a estimulação com o CEMP pareceu ter alguma efeito sobre a circulação endoneural, já que todos os nervos estimulados apresentaram vasos bem visíveis, em contraste com os nervos controle e normais, onde nem sempre se podia observar o mesmo. Entretanto, o número e área de vasos sanguíneos não diferiram entre os grupos de nervos tratados, controles e normais, indicando talvez um comportamento diferente de outros tecidos nos nervos periféricos expostos a campos eletromagnéticos. Embora o método de avaliação da circulação utilizado não seja muito sensível, partindo do pressuposto que as técnicas utilizadas podem aumentar o aporte sanguíneo local, deveria ter havido incentivo e não inibição na regeneração. Por outro lado, deve ser considerado que a exposição a campos eletromagnéticos e conseqüente aumento na irrigação associado ou não a angiogênese não são sempre positivas, pois podem estar relacionadas ao aumento na concentração local de espécies reativas de oxigênio (ROSENSPIRE et al., 2001; SAUER et al., 2005) e lesão no DNA (DELIMARIS et al., 2006). Estes mecanismos podem explicar o atraso na regeneração provocada pela EENT e pelo CEMP. Provavelmente métodos de avaliação da circulação em

tempo real, como a LASER-DOPPLER fluxometria ou técnicas para avaliar a concentração de moléculas relacionadas à vascularização, como a VEGF, possam elucidar os efeitos destas modalidades de eletroestimulação sobre a circulação sanguínea e linfática e seus efeitos sobre a regeneração.

Os efeitos mais estudados da EENT são em relação ao controle da dor. A analgesia provocada pela EENT C está relacionada a ativação de receptores δ -opioides, enquanto que a EENT A ativa receptores μ -opioides (KALRA et al., 2001; SLUKA e WALSH, 2003). Sinatra e Ford (1979b) demonstraram que o uso crônico de morfina por 14 dias levou a um atraso na regeneração nervosa periférica, expressa por uma menor quantidade de perfis axonais, diminuição na remoção de restos de mielina, hipertrofia e proliferação de células de Schwann. Zeng e colaboradores (2007) também demonstraram que a exposição à morfina, agindo via receptores μ -opioides, aumentou a regeneração de fibras não mielinizadas, mas inibiu a de fibras mielinizadas após lesão por esmagamento do nervo ciático. Isto está de acordo com os nossos resultados, nos quais as fibras não mielinizadas não foram afetadas pela EENT, mas as mielinizadas de grosso calibre estiveram presentes em menor quantidade e apresentando menos conteúdo mielínico, especialmente no grupo EENT C. Entretanto o pior progresso apresentado pelo grupo de nervos estimulados por essa modalidade não pode ser completamente explicado pela ativação de receptores δ -opioides, já que isso está associado a neurogênese e neuroproteção no SNC de camundongos (ZHANG et al., 2002; NARITA et al., 2006) e poderiam ter a mesma função no SNP. A diferença fundamental entre o nosso estudo e aqueles nos quais a ativação de receptores opioides foi bem sucedida no incentivo a regeneração nervosa foi o tempo prolongado de utilização, que pode ter levado ao desenvolvimento de tolerância farmacológica. Chandran e Sluka (2003) demonstraram que a administração repetida de EENT C e A, 20 minutos por dia, levou a tolerância a opioides no

quarto dia de estimulação. Mao e colaboradores (2002) demonstraram que ela é mediada pela via NMDA-caspase e leva a apoptose de células neuronais na medula espinhal. Portanto, o uso prolongado da EENT pode ter levado ao desenvolvimento de tolerância a opióides e conseqüências neurotóxicas para as células envolvidas na regeneração. Curiosamente, as drogas que são frequentemente utilizadas para diminuir a tolerância opióide incluem os antagonistas seletivos de SP, CGRP, CCK e do receptor NMDA (KING et al., 2005). Após uma lesão nervosa periférica, α e β CGRP e CCK são sobre-regulados (SAIKA et al., 1991). A CCK também é sobre-regulada com a administração sustentada de morfina (ZHOU et al., 1993; STANFA et al., 1994) ou eletroacupuntura (FUKAZAWA et al., 2007), antagonizando os efeitos da morfina. Ela também está relacionada à regeneração nervosa, através do aumento na síntese de NGF e CGRP (SANCHEZ et al., 2001; MANNI et al., 2000, 2001). Conseqüentemente, sua sobre-regulação, possivelmente associada ao uso de EENT por 35 dias, poderia ter levado a efeitos benéficos na regeneração nervosa, equilibrando os efeitos neurotóxicos da tolerância opióide. Ainda é necessário demonstrar se a EENT pode realmente aumentar a concentração deste peptídeo e que parâmetros deveriam ser usados para evocar a neuroproteção potencial contra a tolerância opióide. Os efeitos de CEMPs sobre a dor não são bem elucidados, principalmente em relação aos seus mecanismos. Desta forma não se sabe se eles poderiam ter um efeito sobre opióides endógenos e assim contribuir para o desenvolvimento de tolerância à morfina e seus efeitos deletérios.

No caso do uso do CEMP a exposição crônica também pode ter sido um fator importante na falta de sucesso em relação à regeneração. Em alguns dos trabalhos que obtiveram efeitos benéficos devido ao uso de CEMPs, a exposição dos animais por curtos períodos foi efetiva. Sisken e colaboradores (1989) acharam que a exposição de ratos que sofreram lesão por esmagamento do ciático a um CEMP de 2 Hz, 0,3 mT, aumentou a taxa de regeneração, com

uma hora de tratamento por dia durante seis dias tendo o mesmo efeito do que quatro ou 10 hs por dia, porém em um outro experimento não acharam relação entre a exposição e o aumento no transporte axoplasmático (SISKEN et al., 1995). Walker e colaboradores (1994) encontraram que a exposição de ratos que sofreram lesão por esmagamento do ciático a um CEMP de 2 Hz, 0,3mT, gerou uma melhora na regeneração, com quatro horas de tratamento durante os primeiros cinco dias após a lesão. Em estudos com outros tipos de células, o tratamento breve também foi positivo. A exposição de células ósseas em cultura a um CEMP com 20 trens de pulso de 4,5 ms, repetidos em 15 Hz, 16 Gauss, tempo de subida de 200 μ s e descida de 25 μ s, oito horas por dia, durante um, dois ou quatro dias aumentou a concentração de fosfatase alcalina, mas não influenciou a osteocalcina. O tratamento também aumentou a concentração de TGF β -1 e PGN E₂, mas NO⁻² não sofreu alteração. O efeito do CEMP no TGF β -1 foi mediado por prostaglandinas, envolvendo Cox-1, mas não Cox-2 e esteve diretamente relacionado com o tempo. O CEMP também diminuiu a concentração de Cx43, especialmente as exposições prolongadas (GUERKOV et al., 2001; LOHMANN et al., 2000, 2003). A diminuição da Cx43 sugere diminuição na sinalização via junção comunicante.

Alguns trabalhos tiveram tempos de exposição ao CEMP similares aos nossos e ainda assim mostraram incentivo à regeneração, embora ocasionalmente com resultados questionáveis. Kim e colaboradores (2002) mostraram que a exposição de nervos laríngeos transecionados e suturados a um CEMP de 120 Hz, 0,4mT, quatro horas por dia, cinco dias por semana, por 12 semanas levou a aceleração da recuperação sensório-motora, relacionada com o aumento na expressão de PLC- γ 1, mas sem efeitos na nNOS ou S-100. Bervar (2005) tratou ratos submetidos à transecção ou esmagamento do nervo ciático usando um CEMP sinusoidal com corrente RMS de 0,875 A em 50 Hz, interrompido automaticamente numa frequência de 0,45 Hz, com período ativo de 1,4 segundos e pausa de 0,8 segundos (1,75:1), 0,5 mT, quatro

horas por dia, durante três semanas após a lesão, tendo verificado maior regeneração nos grupos tratados do que nos controles, avaliada apenas pelo Índice Estático do Ciático. Günay e colaboradores (2005) mostraram que os nervos ciáticos de ratos submetidos à lesão por esmagamento e tratados com um CEMP com trens de pulso de um, 10, 40 e 100 Hz, intensidade de 1,5 mT, uma hora e meia, por cinco, 15, 25 e 38 dias não levou a diferenças significativas do ponto de vista histológico ou no potencial de ação composto dos nervos entre grupos tratado e controle. Mais especificamente, os achados histológicos deste trabalho se assemelham com os nossos, porém a análise é puramente qualitativa, não havendo resultados de análise morfométrica. Em um outro estudo com modelo similar, este mesmo grupo obteve melhora ultraestrutural das fibras mielinizadas, que eram mais numerosas, apresentavam melhores formações e aumento nos potenciais de ação compostos após 38, mas não 15 dias da lesão (MERT et al., 2007). De Pedro e colaboradores (2005) mostraram que ratos com nervos ciáticos seccionados e suturados, submetidos a um CEMP DE 15 Hz, consistindo de 20 pulsos em forma de “dente de serra”, administrado por cinco milissegundos e seguido por um período refratário de 62 ms, separação “pico-a-pico” de 200 μ s e intensidade variando de 0,9 a 1,8 mT, tratados desde o período imediatamente após a cirurgia, seis horas por dia, por quatro semanas, apresentaram maior densidade de fibras mielinizadas e maior atividade da enzima acetilcolinesterase no músculo. Sua morfometria, entretanto, foi realizada com uma técnica automática e em baixa magnificação. A análise ultraestrutural foi puramente qualitativa, demonstrando complexos de Golgi e retículos sarcoplasmáticos mais abundantes.

Se a exposição prolongada a um CEMP pode levar a efeitos deletérios sobre a regeneração nervosa periférica, um dos maiores candidatos a mediador destes efeitos é o TGF β 1. Esta citocina é sintetizada por neurônios do gânglio da raiz dorsal, nervos periféricos após lesão por transecção e várias células do sistema imune, estimulando a proliferação de CS se estas

não estão em contato com neurônios. Nesta situação, as CS também diminuem a expressão de tPA e NGF e aumentam a secreção de PAI e colágeno tipo IV, que está presente na sua membrana basal (ROGISTER et al., 1993). Isto gera uma condição onde a CS passa a um estado não-mielinizante quando em contato com neurônios, diminuindo a expressão de P0, MBP e GFAP e aumentando a expressão de NCAM, L1 (GUÉNARD et al., 1995) e LIF (MATSUOKA et al., 1997). O brotamento axonal é estimulado, sendo fundamental para a fase inicial após a lesão (ROGISTER et al., 1993; EINHEBER et al., 1995). Este aumento na expressão do TGF β 1 leva também à retração e perda da GAP-43, que é mediada tanto por este fator de crescimento quanto pela concentração de AMPc intracelular (STEWART et al., 1995). Desta forma, enquanto na regeneração óssea o TGF β 1 irá levar a uma consolidação mais efetiva, na regeneração do SNP sua ação é muito importante na fase inicial da lesão, mas sua manutenção pode causar efeitos nocivos, possivelmente mantendo o estado não-mielinizante das CS. A via de sinalização do TGF β 1 inclui a ativação de espécies reativas de oxigênio em várias células tais como fibroblastos (KOO et al., 1999; JUNN et al., 2000), queratinócitos (CHIU et al., 2001), hepatócitos (HERRERA et al., 2001 a,b) e células mesangiais (JIANG et al., 2003). No SNC, TGF β 1 é um potente neuroprotetor para lesões diversas, induzindo a formação de espécies reativas de oxigênio (PRATT e McPHERSON, 1997; FLANDERS et al., 1998) e inibindo a concentração de glutathione, um importante antioxidante em vários tipos celulares (ARSALANE et al., 1997; JARDINE et al., 2002). Por outro lado a concentração de glutathione regula a atividade do TGF β 1 (LIU et al., 2004; VAYALIL et al., 2007). O CEMP leva a um aumento na expressão de TGF β 1 em células ósseas (LOHMANN et al., 2003; PATTERSON et al., 2006), com conseqüências já citadas sobre o estresse oxidativo. No nosso estudo a formação de espécies reativas de oxigênio estava mais alta nos nervos tratados com o CEMP do que nos controles ou normais. Isto pode

denotar um possível aumento na concentração de TGF β 1 após três semanas da lesão, que em contrapartida não permitiu a mielinização adequada das fibras em regeneração. Na análise histológica, os nervos estimulados com o CEMP apresentaram ocasionalmente fibras em estágios muito atrasados da regeneração, com bainhas de mielina desproporcionalmente pequenas em relação aos seus axônios. Futuros estudos poderiam analisar a concentração desta citocina, em diferentes fases da lesão associada à estimulação com o CEMP e estabelecer o melhor regime de tratamento neste sentido.

7. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

O IECc tem uma alta correlação com o IFC e, desta forma, pode substituir esse teste após lesões experimentais do nervo ciático em camundongos, com as vantagens de ser mais fácil de executar e estressar menos os animais. Estudos futuros deveriam investigar o uso do IECc para avaliar diferentes tipos de lesão, como secção e sutura ou tubulização, além de lesões crônicas, já que o IFC não parece ser capaz de demonstrar o estado funcional nestas situações, devido à presença de contraturas. Nessa situação, o padrão anormal da marcha pode levar a cauda a espalhar a tinta ou à sua retenção nas zonas contraturadas. Embora isto não aconteça nas avaliações por fotografia, contraturas são conseqüências importantes das lesões nervosas e novos estudos deveriam abordar sua influência no IECc. Correlações entre o IECc e medidas histomorfométricas também deveriam ser realizadas, já que a função da marcha expressa pelo IFC pode não estar correlacionada com achados morfológicos.

A exposição de camundongos que sofreram lesão aguda por esmagamento do nervo ciático a EENT A e C por um período de cinco semanas ou a um CEMP por três semanas, com aplicações diárias de 30 minutos, leva à inibição da regeneração nervosa. Estudos futuros deveriam avaliar o uso breve ou com baixas intensidades da EENT (abaixo de 1 mA) e o uso breve ou mais prolongado do CEMP, assim com avaliar os possíveis mecanismos envolvidos, incluindo a expressão de marcadores moleculares de regeneração, a manipulação farmacológica dos opioídes endógenos envolvido, no caso da EENT e do TGF β 1, no caso do CEMP. O efeito das duas modalidades sobre a circulação também deveria ser melhor avaliado, usando recursos com a LASER-Doppler fluxometria ou a marcação de proteínas relacionadas, com a VEGF.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADEY, W.R. Potential Therapeutic Applications of Nonthermal Electromagnetic Fields: Ensemble Organization of Cells in Tissue as a Factor in Biological Field Sensing. IN: ROSCH, P.J.; MARKOV, M.S. **Bioelectromagnetic Medicine**, Boca Raton: Taylor & Francis, Cap. 1, p. 1-16, 2004.

AL-MAJED, A.A.; BRUSHART, M.; GORDON, T. Electrical stimulation accelerates and increases expression of BDNF and TrKB mRNA in regenerating rat femoral motoneurons. **European Journal of Neuroscience**, v.12, n. 12, p. 4381-4390, 2000.

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

AL-MAJED, A.A.; TAM, S.L.; GORDON T. Electrical stimulation accelerates and enhances expression of regeneration-associated genes in regenerating rat femoral motoneurons. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 24, n. 3, p. 379-402, 2004.

ARSALANE, K.; DUBOIS, C.M.; MUANZA, T.; BÉGIN, R.; BOUDREAU, F.; ASSELIN, C.; CANTIN, A.M. Transforming growth factor-beta1 is a potent inhibitor of glutathione synthesis in the lung epithelial cell line A549: transcriptional effect on the GSH rate-limiting enzyme gamma-glutamylcysteine synthetase. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 17, n. 5, p. 599-607, 1997.

ASTUMIAN, R.D.; WEAVER, J.C.; ADARI, R.K. Rectification and signal averaging of weak electric fields by biological cell. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 92, p. 3740-3743, 1995.

AYDIN, M.A.; COMLEKCI, S.; OZGUNER, M.; CESUR, G.; NASIR, S.; AYDIN, Z.D. The influence of continuous exposure to 50 Hz electric field on nerve regeneration in a rat peroneal nerve crush injury model. **Bioelectromagnetics**, v. 27, p. 401-413, 2006.

BAE, C.S.; LIM, S.C.; KIM, K.Y.; SONG, C.H.; PAK, S.; KIM, S.G.; JANG, C.H. Effect of Ga-As laser on the regeneration of injured sciatic nerves in the rat. **In vivo**, v. 18, n. 4, p. 489-495, 2004.

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

BALCAVAGE, W.X.; ALVAGER, T. SWEZ, J.; GOFF, C.W.; FOX, M.T.; AFDULLYAVA, S.; KING, M.W. A mechanism for action of extremely low frequency electromagnetic fields on biological systems. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 222, p. 374-378, 1996.

BEVERIDGE, J.A.; POLITIS, MJ. Use of exogenous electric current in the treatment of delayed lesions in peripheral nerves. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 82 Out., n. 4, p. 573-579, 1988.

BERVAR, M. Video analysis of standing-an alternative footprint analysis to assess functional loss following injury to the rat sciatic nerve. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 102, n. 2, p. 109-116, 2000.

BERVAR, M. Effect of weak, interrupted sinusoidal low frequency magnetic field on neural regeneration in rats: Functional evaluation. **Bioelectromagnetics**, v. 26, p. 351-356, 2005.

BRUSHART, T.M.; HOFFMAN, P.N.; ROYALL, R.M.; MURINSON, B.B.; WITZEL, C.; GORDON, T. Electrical stimulation promotes motoneuron regeneration without increasing its speed or conditioning the neuron. **Journal of Neuroscience**, v. 22, n. 15, p.6631-6638, 2002.

BURSENS, P.; FORSYTH, R.; STEYAERT, A.; VAN OVOST, E.; PRAET, M.; VERDONK, R. Influence of burst TENS stimulation on the healing of Achilles tendon in man. **Acta Orthopaedica Belgica**, v. 69, n. 6, p. 528-532, 2003.

BURSENS, P.; FORSYTH, R.; STEYAERT, A.; VAN OVOST, E.; PRAET, M.; VERDONK, R. Influence of burst TENS stimulation on collagen formation after Achilles tendon suture in man. A histological evaluation with Movat's pentachrome stain. **Acta Orthopaedica Belgica**, v. 71, n. 3, p. 342-346, 2005.

CHANDRAN, P.; SLUKA, K.A. Development of opioid tolerance with repeated transcutaneous electrical nerve stimulation administration. **Pain**, v. 102, n. 1-2, p. 195-201, 2003.

CHARMAN, R.A. Propriedades Elétricas das Células e dos Tecidos. IN: KITCHEN, S.; BAZIN, S. **Eletroterapia de Clayton**, São Paulo: Manole, Cap. 2, p. 31-45, 1998.

CHAUHAN, S.P.; ROSE, C.H.; GHERMAN, R.B.; MAGANN, E.F.; HOLLAND, M.W.; MORRISON, J.C. Brachial plexus injury: a 23-year experience from a tertiary center. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 192, n. 6, p. 1795-1802, 2005.

CHEEMA, S.S.; RICHARDS, L.; MURPHY, M.L.; BARTLETT, P.F. Leukemia inhibitory factor prevents the death of axotomised sensory neurons in the dorsal root ganglia of the neonatal rat. **Journal of Neuroscience Research**, v. 37, p. 213-218, 1994.

CHEEMA, S.S.; RICHARDS, L.; MURPHY, M.L.; BARTLETT, P.F. Leukemia inhibitory factor rescues motoneurons from axotomy-induced cell death. **NeuroReport**, v. 5, p. 989-992, 1994.

CHEING, G.L.; LUK, M.L. Transcutaneous electrical nerve stimulation for neuropathic pain. **Journal of Hand Surgery**, v. 30, n. 1, p. 50-5, 2005.

CHEN, Y.; HU, C.; HSIEH, C.; LIN, J.; TSAI, C.; CHEN, T.; YAO, C. Effects of percutaneous electrical stimulation on peripheral nerve regeneration using silicone rubber chambers. **Journal of Biomedical Material Research**, v. 57, n.4, p. 541-549, 2001.

CHENG, N.; VAN HOOFF, H.; BOCKX, E.; HOOGMARTENS, M.J.; MULIER, J.C.; DE DIJCKER, F.J.; SANSEN, W.M. DE LOECKER, W. The effects of electric currents on ATP generation, protein synthesis, and membrane transport of rat skin. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 171, p. 264-272, 1982.

CHENG, Y.S.; HU, C.L.; HSIEH, C.L.; LIN, J.G.; TSAI, C.C.; CHEN, T.H.; YAO, C.H. Effects of percutaneous electrical stimulation on peripheral nerve regeneration using silicone rubber chambers. **Journal of Biomedical Material Research**, v. 57, n. 4, p.541-9, 2001

CHIU, C.; MADDOCK, D.A.; ZHANG, Q.; SOUZA, K.P.; TOWNSEND, A.R.; WAN, Y. TGF- β -induced p38 activation is mediated by Rac1-regulated generation of reactive oxygen species in cultured human keratinocytes. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 8, p. 251-255, 2001.

COUTO, L.A.; NARCISO, M.S.; HOKOÇ, J.N. MARTINEZ, A.M.B. Calpain Inhibitor 2 prevents axonal degeneration of Opossum Optic nerve fibers. **Journal of Neuroscience Research**, v. 77, p. 410-419, 2004.

CRISCI, A.R.; FERREIRA, A.L. Low-intensity pulsed ultrasound accelerates the regeneration of the sciatic nerve after neurotomy in rats. **Ultrasound in Medicine & Biology**, v. 28, n. 10, p. 1335-1341, 2002.

CUCCIONOTA, A. The Laws of the Physical World. Disponível em www.peoplephysics.com/physics-laws8.htm, acesso em 10/10/2006.

Del ZOPPO, G.J. Microvascular responses to cerebral ischemia/reperfusion, **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 14, n. 823, p. 132-147, 1997.

DELLON, E.S.; DELLON, A.L. Functional assessment of neurological impairment: track analysis in diabetic and compression neuropathies. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 88, p. 686-694, 1991.

DELLON, A.L.; MACKINNON, S.E. Sciatic nerve regeneration in the rat. Validity of walking track assessment in the presence of chronic contractures. **Microsurgery**, v. 10, n. 3, p. 220-225, 1989.

DELIMARIS, J.; TSILIMIGAKI, S.; MESSINI-NICOLAKI, N.; ZIROS, E.; PIPERAKIS, S.M. Effects of pulsed electric fields on DNA of human lymphocytes. **Cell Biology Toxicology**, v. 22, n. 6, p. 409-415, 2006.

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

De MEDINACELI, L.; FREED, W.J.; WYATT, R.J. Peripheral nerve reconnection: improvement of long term functional effects under stimulated clinical conditions in the rat. **Experimental Neurology**, v. 81, n. 2, p. 488-496, 1983.

De MEDINACELI, L. Interpreting nerve morphometry data after experimental traumatic lesions. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 58, n. 1-2, p. 29-37, 1995.

De PEDRO, J.A.; PÉREZ-CABALLER, A.J.; DOMINGUEZ, J.; COLLÍA, F.; BLANCO, J.; SALVADO, M. Pulsed Electromagnetic fields induce peripheral nerve regeneration and endplate enzymatic changes. **Bioelectromagnetics**, v. 26, p. 20-27, 2005.

De VRIES, J.; ANTHONIO, R.L.; DEJONGSTE, M.J.; JESSURUN, G.A.; TAN, E.S.; De SMET, B.J.; Van Den HEUVEL, A.F.; STAAL, M.J.; ZIJLSTRA, F. The effect of electrical neurostimulation on collateral perfusion during acute coronary occlusion. **BioMed Central Cardiovascular Disorders**, v. 7, p. 7-18, 2007.

DOBSÁK, P.; NOVÁKOVÁ, M.; SIEGELOVÁ, J.; FISER, B.; VITOVEC, J.; NAGASAKA, M.; KOHZUKI, M.; YAMBE, T.; NITTA, S.; EICHER, J.C.; WOLF, J.E.; IMACHI, K.

Low-frequency electrical stimulation increases muscle strength and improves blood supply in patients with chronic heart failure. **Circulation Journal**, v. 70, n. 1, p. 75-82, 2006.

EINHEBER, S.; HANNOCKS, M.J.; METZ, C.N.; RIFKIN, D.B. Transforming growth factor- β 1 regulates axon/Schwann cell interactions. **The Journal of Cell Biology**, v. 129, n. 2, p. 443-458, 1995.

ELENKOW, I.J.; CHROUSOS, G.P.; WILDER, R.L. Neuroendocrine regulation of IL-12 and TNF- α /IL-10 balance. Clinical implications. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 917, p. 94-105, 2000.

ENGSTRÖM, S. Magnetic Field Generation and Dosimetry. IN: ROSCH, P.J.; MARKOV, M.S. **Bioelectromagnetic Medicine**, Boca Raton: Taylor & Francis, Cap. 3, p. 39-49, 2004.

FLANDERS, K.C.; REN, R.F.; LIPPA, C.F. Transforming growth factor-betas in neurodegenerative disease. **Progresses in Neurobiology**, v. 54, n.1, p. 71-85, 1998.

FU, S.Y.; GORDON, T. The cellular and molecular basis of peripheral nerve regeneration. **Molecular Neurobiology**, v. 14, n. 1-2, p. 67-116, 1997.

FUKAZAWA, Y.; MAEDA, T.; KIGUCHI, N.; TOHYA, K.; KIMURA, M.; KISHIOKA, S. Activation of spinal cholecystinin and neurokinin-1 receptors is associated with the attenuation of intrathecal morphine analgesia following electroacupuncture stimulation in rats. **Journal of Pharmacological Science**, v. 104, n. 2, p. 159-166, 2007.

FUKUYAMA, R.; OHTA, M.; OHTA, K.; SAIWAKI, T.; FUSHIKI, S.; AWAYA, A. A synthesized pyrimidine compound, MS-818, promotes walking function recovery from crush injury of the sciatic nerve through its indirect stimulation of Schwann cells. **Restorative Neurology and Neuroscience**, v. 17, p. 9-16, 2000.

GARCIA, E.A.C. **Biofísica**, São Paulo: Sarvier, 2006, pp. 387.

GOLDBERG, N.H.; DESHPANDE, S.S.; MAY, C.S.; TOY, F.K.; SMOOT, R.T.; MESHUL, C.K.; ALBUQUERQUE, E.X. Disparity between neurophysiologic measurements and clinical reality following peripheral nerve transaction and microneuroraphy. **Surgery Forum**, n. 35, p. 608-610, 1984.

GORDON, T; SULAIMAN, O; BOYD, JG. Experimental strategies to promote functional recovery after peripheral nerve injuries. **Journal of the Peripheral Nervous System**, v. 8, p. 236-250, 2003.

GRASSO, G.; SFACTERIA, A.; BRINES, M.; TOMASELLO, F. A new computed-assisted technique for experimental sciatic nerve function analysis. **Medical Science Monitoring**, v. 10, p. 1-3, 2004.

GREENOUGH, C.G. The effects of pulsed electromagnetic fields on blood vessel growth in the rabbit ear chamber. **Journal of Othopaedic Research**, v. 10, p.256-262.

GUÉNARD, V.; GWYNN, L.A.; WOOD, P.M. Transforming growth factor- β blocks myelination but not ensheathment of axons by Schwann cells *in vitro*. **The Journal of Neuroscience**, v. 15, n. 1, p. 416-428, 1995.

GUÉNARD, V.; ROSENBAUM, T.; GWYNN, L.A.; DOETSCHMAN, T.; RATNER, N.; WOOD, P.M. Effect of transforming growth factor-beta 1 and -beta 2 on Schwann cell proliferation on neuritis. **Glia**, v. 13, n. 4, p. 309-318, 1995.

GUERKOV, H.H.; LOHMANN, C.H.; LIU, Y.; DEAN, D.D.; SIMON, B.J.; HECKMAN, J.D.; SCHWARTZ, Z.; BOYAN, B.D. Pulsed electromagnetic fields increase growth factor release by nonunion cells. **Clinical Orthopaedic and Related Research**, v. 384, p. 365-279, 2001.

GÜNAY, M.G.I.; ÖZGÜNEN, K.; ZORLUDEMIR, S. Effect of pulsed magnetic field on regenerating rat sciatic nerve: an in-vitro electrophysiological study. **International Journal of Neuroscience**, v. 115: p. 881,892, 2005.

HAAR, G.T. Princípios Eletrofísicos. IN: KITCHEN, S.; BAZIN, S. **Eletroterapia de Clayton**, São Paulo: Manole, Cap. 1, p. 3-30, 1998.

HANAI, F. Effect of electrical stimulation of peripheral nerves on neuropathic pain. **Spine**, v. 25 (nov. 15), p. 1886-1892, 2000.

HANSON, S.M.; MCGINNIS, M.E. Regeneration of rat sciatic nerves in silicone tubes: characterization of the response to low intensity d.c. stimulation. **Neuroscience**, v. 58, n. 2, p. 411-421, 1994

HERRERA, B.; ALVAREZ, A.M.; SANCHEZ, A.; FERNANDEZ, M.; RONCERO, C.; BENITO, M.; FABREGART, I. Reactive oxygen species mediates the mitochondrial-dependent apoptosis induced by transforming growth factor- β in fetal hepatocyte. **FASEB Journal**, v. 15, v. 3, p. 741-751, 2001.

HERRERA, B.; FERNANDEZ, M.; RONCERO, C.; VENTURA, J.J.; PORRAS, A.; VALLADARES, A.; BENITO, M.; FABREGAT, I. Activation of p38MAPK by TGF- β in fetal rat hepatocytes requires radical oxygen production, but is dispensable for cell death. **FEBS Letters**, v. 499, n. 3, p. 225-229, 2001.

HOKE, A. Mechanisms of Disease: what factors limit the success of peripheral nerve regeneration in humans? **Nature Clinical Practice Neurology**, v. 2, n. 8, p. 448-454, 2006.

HONG, Y.H.; PENG, H.B.; LA FATA, V.; LIAO, J.K. Hydrogen peroxide-mediated transcriptional induction of macrophage colony-stimulator factor by TGF- β 1. **Journal of Immunology**, v. 159, p.2418-2423, 1997.

INOUE, M.; HOJO, T.; YANO, T.; KATSUMI, Y. The effects of electroacupuncture on peripheral nerve regeneration in rats. **Acupuncture Medicine**, V. 21 Jun, n. 1-2, p. 9-17, 2003.

INSERRA, M.M.; BLOCK, D.A.; TERRIS, D.J. Functional indices for sciatic, peroneal, and posterior tibial nerve lesions in the mouse. **Microsurgery**, v. 18, n. 2, p. 119-124, 1998.

ISLAMOV, R.R.; HENDRICKS, W.A.; JONES, R.J.; LYALL, G.J.; SPANNIER, N.S.; MURASHOV, A.K. Beta-estradiol stimulates regeneration of sciatic nerve in female mice. **Brain Research**, v. 943, p. 283-286, 2002.

JARDINE, H.; MacNEE, W.; DONALDSON, K.; RAHMAN, I. Molecular mechanism of transforming growth factor (TGF)-beta-1-induced glutathione depletion in alveolar epithelial cells. Involvement of AP-1/ARE and Fra-1. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 24, p. 21158-21166, 2002.

JIANG, Z.; SEO, J.Y.; HA, H.; LEE, E.A.; KIM, Y.S.; HAN, D.C.; UH, S.T.; PARK, C.S.; LEE, H.B. Reactive oxygen species mediate TGF- β 1-induced plasminogen activator inhibitor-1 upregulation in mesangial cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 309, v. 4, p. 961-966, 2003.

JIHAD, M.; SHEMAQ, M.D.; SALEH, M.; SHENAG, M.D.; MELVIN, S. Reliability of sciatic function index in assessing nerve regeneration across a 1 cm gap. **Microsurgery**, v. 10, n. 3, p. 214-219, 1989.

JUNN, E.; LEE, K.N.; JU, H.R.; HAN, S.H.; IM, J.Y.; KANG, H.S.; LEE, T.H.; BAE, Y.S.; HA, K.S.; LEE, Z.W.; RHEE, S.G.; CHOI, L. Requirement of hydrogen peroxide generation in TGF- β 1 signal transduction in human lung fibroblast cells: Involvement of hydrogen

peroxide and Ca^{2+} in TGF- β 1 induced IL-6 expression. **Journal of Immunology**, v. 165, p. 2190-2197, 2000.

KAADA, B.; EMRU, M. Promoted healing of leprosy ulcers by transcutaneous nerve stimulation. **Acupuncture & Electro-therapeutics Research**, v. 13, n. 4, p. 165-176, 1988.

KAHN, J. Transcutaneous electrical nerve stimulation for nonunited fractures; a clinical report. **Physical Therapy**, v. 62 Jun., n. 6, p. 840-844, 1982

KALRA, A.; URBAN, M.O.; SLUKA, K.A. Blockade of opioid receptors in rostral ventral medulla prevents antihyperalgesia produced by transcutaneous electrical stimulation (TENS). **Journal of Pharmacological Experimental Therapy**, v. 298, n. 1, p. 257-263, 2001.

KANJE, M.; RUSOVAN, A.; SISKEN, B.; LUNDBORG, G. Pretreatment of rats with pulsed electromagnetic fields enhances regeneration of the sciatic nerve. **Bioelectromagnetics**, v. 14, n. 4, p. 353-329, 1993.

KASHIBA, H.; UEDA, Y. Acupuncture to the skin induces release of Substance P and calcitonin gene-related peptide from peripheral nerve terminals of primary sensory neurons in the rat. **American Journal of Chinese Medicine**, v. 19, n. 3-4, p. 189-197, 1991.

KENNEDY, J.M.; ZOCHODNE, D.W. Impaired peripheral nerve regeneration in diabetes mellitus. **Journal of the Peripheral Nervous System**, v. 10, n. 2, p.144-157, 2005.

KERNS, J.M.; FAKHOURI, A.J.; WEINRIB, H.P.; FREEMAN, J.A. Electrical stimulation of nerve regeneration in the rat: the early effects evaluated by a vibrating probe and electron microscopy. **Neuroscience**, v. 40, n. 1, p. 93-107, 1991

KHALIL, Z.; MERHI, M. Effects of aging on neurogenic vasodilator responses evoked by transcutaneous electrical nerve stimulation: relevance to wound healing, **Journal of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences On Line**, v. 55, n. 6, p. 257-263, 2000.

KIM, S.S.; SHIN, H.J.; EOM, D.W.; HUH, J.R.; WOO, Y.; KIM, H.; RYU, S.H.; SUH, P.G.; KIM, M.J.; KIM, J.Y.; KOO, T.W.; CHO, Y.H.; CHUNG, S.M. Enhanced expression of neuronal nitric oxide synthase and phospholipase C- γ 1 in regenerating murine neuronal cells by pulsed electromagnetic field. **Experimental Molecular Medicine**, v. 34, n 1, p. 53-59, 2002.

KING, T.; OSSIPOV, M.H.; VANDERAH, T.W.; PORRECA, F.; LAI, J. Is paradoxical pain induced by sustained opioid exposure an underlying mechanism of opioid antinociceptive tolerance? *Neurosignals*, v. 14, p. 194, 2005.

KJARTANSSON, J.; LUNDEBERG, T.; SAMUELSON E.U.; DALSGAARD, J. Transcutaneous electrical nerve stimulation (TENS) increases survival of ischemic musculocutaneous flaps. *Acta Physiologica Scandinava*, v. 134, p. 95-99, 1988.

KNIGHT K.L. **Crioterapia no Tratamento das Lesões Esportivas**. São Paulo: Manole, 2000, p. 304.

KOO, H.Y.; SHIN, I.; LEE, Z.W.; LEE, S.H.; KIM, S.H.; LEE, C.H.; KANG, H.S.; HA, K.S. Roles of RhoA and phospholipase A2 in the elevation of intracellular H₂O₂ by transforming growth factor-beta in Swiss 3T3 fibroblasts. *Cell Signaling*, v. 11, n. 9, p. 677-83, 1999.

KRIEGLSTEIN, K.; FARKAS, L.; UNSICKER, K. TGF-beta, regulates the survival of ciliary ganglionic neurons synergistically with ciliary neurotrophic factor and neurotrophins. *Journal of Neurobiology*, v. 37, n. 4, p. 563-572, 1998.

KRIEGLSTEIN, K.; HENHEIK, P.; FARKAS, L.; JASZAI, J.; GALTER, D.; KROHN, K.; UNSICKER, K. Glial cell line-derived neurotrophic factor requires transforming growth factor- β for exerting its full neurotrophic potential on peripheral and CNS neurons. *The Journal of Neuroscience*, v. 18, n. 23, p. 9822-9834, 1998.

LAFON, C. MATHIEU, C.; GUERRIN, M.; PIERRE, O.; VIDAL, S.; VALETTE, A. Transforming growth factor beta 1-induced apoptosis in human ovarian carcinoma cells: protection by antioxidant N-acetylcysteine and bcl-2. *Cell Growth and Differentiation*, v. 7, n. 8, p. 1095-1194, 1996.

LATINOVIC, R.; GULLIFORD, M.C.; HUGHES, R.A. Incidence of common compressive neuropathies in primary care. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, v. 77, n. 2, p. 263-265, 2006

LEEM, J.W.; PARK, E.S.; PAIK, K.S. Electrophysiological evidence for the antinociceptive effect of transcutaneous electrical stimulation on mechanically evoked responsiveness of dorsal horn neurons in neuropathic rats. *Neuroscience Letters*, v. 192, n. 3, p. 197-200, 1995.

LIBOFF, A.R.; JENROW, K.A. Physical mechanisms in neuroelectromagnetic therapies. *Neurorehabilitation*, v. 17, p. 9-22, 2002.

LIEBANO, R.C.; FERREIRA, L.M.; NETO, M.S. Experimental model for transcutaneous electrical nerve stimulation on ischemic random skin flap in rats. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 18, p. 54-59, 2003

LINK, A.A.; KINO, T.; WORTH, J.A.; McGUIRE, J.L.; CRANE, M.L.; CHROUSOS, G.P.; WILDER, R.L.; ELENKOV, I.L. Ligand-activation of adenosine A2a receptors inhibits IL-12 production by human monocytes. **The Journal of Immunology**, v. 164, p. 436-442, 2000.

LIU, R.M.; LIU, Y.; FORMAN, H.J.; OLMAN, M.; TARPEY, M.M. Glutathione regulates transforming growth factor β -stimulated collagen production in fibroblasts. **American Journal of Physiology – Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 286, n. 1, p. L121-128, 2004.

LOHMANN, C.H.; SCHWARTZ, Z.; LIU, Y. GUERKOV, H.; DEAN, D.D.; SIMON, B.; BOYAN, B.D. Pulsed electromagnetic field stimulation of MG63 osteoblast-like cells affects differentiation and local factor production. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 18, n. 4, p. 637-646, 2000.

LOHMANN, C.H.; SCHWARTZ, Z.; LIU, Y.; LI, Z.; SIMON, B.J.; SYLVIA, V.L.; DEAN, D.D.; BONEWALD, L.F.; DONAHUE, H.J.; BOYAN, B.D. Pulsed electromagnetic fields affect phenotype and connexin 43 protein expression in MLO-Y4 osteocyte-like cells and ROS 17/2.8 osteoblast-like cells. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 21, n. 2, p. 326-324, 2003.

LOPES, F.R.P.; CAMPOS, L.C.M.; CORRÊA JR., J.D.; BALDUINO, A.; LORA, S.; LANGONE, F.; BOROJEVIC, R.; MARTINEZ, A.M.B. Bone marrow stromal cells and resorbable collagen guidance tubes enhance sciatic nerve regeneration in mice. **Experimental Neurology**, v. 198, p. 457-468, 2006.

LOW, J.; REED, A. **Eletroterapia Explicada**, São Paulo: Manole, 2001, p. 472.

LUNDBORG, G. **Nerve Injury and Repair – Regeneration, Reconstruction and Cortical Repair**. Edinburgh: Churchill Livingstone, 2004, pp. 248.

LUNDY-EKMAN L. **Neurociência – Fundamentos para a Reabilitação**. Elsevier, Rio de Janeiro, 2004.

MALBOUISSON, A.M.B.; GHABRIEL, M.N.; ALLT, G. Axonal degeneration in large and small nerve fibres. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 67, p. 307-318, 1985.

MANNI, L.; LUNDEBERG, T.; TIRASSA, P.; ALOE, L. Cholecystokinin-8 enhances nerve growth factor synthesis and promotes recovery of capsaicin-induced sensory deficit. **British Journal of Pharmacology**, v. 129, n. 4, p. 744-750, 2000.

MANNI, L.; ALOE, L.; TIRASSA, P.; FINN, A.; LUNDEBERG, T. Cholecystokinin-8 promotes recovery of sympathectomy induced by 6-hydroxydopamine in adult mice. **Neuroreport**, v. 12, n. 8, p. 1621-1627, 2001.

MAO, J.; SUNG, B.; JI, R.R.; LIM, G. Neuronal apoptosis associated with morphine tolerance: Evidence for an opioid-induced neurotoxic mechanism. **Journal of Neuroscience**, v. 22, n. 17, p. 7650-7661, 2002.

MARTINEZ, A.M.; RIBEIRO, L.C. Ultrastructural localization of calcium in peripheral nerve fibers undergoing Wallerian-Degeneration: an oxalate-pyroantimoniate and X-ray microanalysis study. **Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology**, v. 30, n. 3, p.451-8, 1998.

MATSUOKA, I.; NAKANE, A.; KURIHARA, K. Induction of LIF-mRNA by TGF- β 1 in Schwann cells. **Brain Research**, v. 776, p. 170-180, 1997.

McCAIG, C.D.; RAJNICEK, A.M.; SONG, B.; ZHAO, M. Has electric growth cone guidance found its potential? **Trends in Neurosciences**, v. 25, n. 7, p.354-359, 2002.

McCAIG, C.D.; RAJNICEK, A.M.; SONG, B.; ZHAO, M. Controlling cell behavior electrically: Current views and future potential. **Physiology Reviews**, v. 85, n. 943-978, 2005.

McDEVITT, L.; FORTNER, P.; POMERANZ, B. Application of weak electric field to the hindpaw enhances sciatic motor nerve regeneration in the adult rat. **Brain Research**, v. 416, n. 2, p. 308-14, 1987.

McGINNIS, M.E.; MURPHY, D.J. The lack of an effect of applied d.c. electric fields on peripheral nerve regeneration in the guinea pig. **Neuroscience**, v. 51, n. 1, p. 231-244, 1992

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

MENO, J.R.; CRUM, A.V.; WINN, H.R. Effect of adenosine receptor blockade on pial arteriolar dilatation during sciatic nerve stimulation. **American Journal of Physiology – Heart Circulation Physiology**, v. 281, p. 2018-2027, 2001.

MERT, T.; GUNAY, I.; GOCMEN, C.; KAYA, M.; POLAT, S. Regenerative effects of pulsed magnetic field on injured peripheral nerves. **Alternative Therapies in Health and Medicine**, v. 12, n. 5, p. 42-49, 2007.

MEWS, M.; MEYER, M. Modulation of Schwann cell phenotype by TGF-beta 1: inhibition of P0 mRNA expression and downregulation of the low affinity NGF receptor. **Glia**, v. 8, n. 3, p. 208-217, 1993.

MOLTENI, R.; ZHENG, J.K.; YING, Z.; GOMEZ-PINILHA, Z.; TWISS, J.L. Voluntary exercises increases axonal regeneration from sensory neurons. **Developmental Dynamics**, v. 231, n.1, p. 109-121, 2004.

NAM, T.S.; CHOI, Y.; YEON, D.S.; LEEM, J.W.; PAIK, K.S. Differential antinociceptive effect of transcutaneous electrical stimulation on pain behavior sensitive or insensitive to phentolamine in neuropathic rats. **Neuroscience Letters**, v. 301, p. 17-20, 2001.

NARITA, M.; KUZUMAKI, N.; MIYATAKE, M.; SATO, F.; WACHI, H.; SEYAMA, Y.; SUZUKI, T. Role of delta-opioid receptor function in neurogenesis and neuroprotection. **Journal of Neurochemistry**, v. 97, n. 5, p. 1494-1505, 2006.

NIX, W.A.; HOPF, H.C. Electrical stimulation of regenerating nerve and its effect on motor recovery. **Brain Research**, v. 272, p. 21-25, 1983

OSCHMAN, J.L. Recent Developments in Bioelectromagnetic Medicine. IN: ROSCH, P.J.; MARKOV, M.S. **Bioelectromagnetic Medicine**, Boca Raton: Taylor & Francis, Cap. 6, p. 77-92, 2004.

OTTANI, V.; De PASQUALE, V.; GOVONI, P.; FRANCHI, M.; ZANIOL, P. RUGGERI, A. Effects of pulsed extremely-low-frequency magnetic fields on skin wounds in the rat. **Bioelectromagnetics**, v. 9, n. 1, p. 53-62, 1988.

PANAGOPOULOS, D.J.; KARABARBOUNIS, A.; MARGARITIS, L.H. Mechanism for action of electromagnetic fields on cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 298, p. 95-102, 2002.

PAQUET-DURAND, F.; JOHNSON, L.; EKSTRÖM, P. Calpain activity in retinal degeneration. **Journal of Neuroscience Research**, v. 85, n. 4, p. 693-702, 2007.

PANAGOPOULOS, D.J.; MESSINI, N. KARABARBOUNIS, A.; PHILIPPETIS, A.L.; MARGARITIS, H. A mechanism for action of oscillating electric fields on cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 272, p. 634-640, 2000.

PARKER, A.J.; CLARK, K.A. Gait topography in rat locomotion. **Physiology and Behavior**, v. 48, p. 41-47, 1990.

PATTERSON, T.E.; SAKAI, Y.; GRABINER, M.D.; IBIWOYE, M.; MIDURA, R.J.; ZBOROWSKI, M.; WOLFMAN, A. Exposure of murine cells to pulsed electromagnetic fields rapidly activates the mTOR signaling pathway. **Bioelectromagnetics**, v. 27, p. 535-544, 2006.

POLITIS, M.J.; ZANAKIS, M.F., ALBALA, B.J. Facilitated regeneration in the rat peripheral nervous system using applied electric fields. **Journal of Trauma**, v. 28, n. 9, p. 1375-1381, 1988.

POLSKA, E.; EHRLICH, P.; LUKSCH, A.; FUCHSJÄGER-MARYL, G.; SCMETTERER, L. Effects of adenosine on intraocular pressure, optic nerve head blood flow, and choroidal blood flow in healthy humans. **Investigative Ophthalmology and Vision Science**, v. 44, n. 7, p. 3110-3114, 2003.

POMERANZ, B.; MULLEN, M.; MARKUS, H. Effect of applied electrical fields on sprouting of intact saphenous nerve in adult rat. **Brain Research**, v. 303, p. 331-336, 1984

POMERANZ, B.; CAMPBELL, J.J. Weak electric current accelerates motoneuron regeneration in the sciatic nerve of ten-month-old rats. **Brain Research**, v. 603, p. 271-278, 1993

POP-BUSUI, R.; SIMA, A.; STEVENS, M. Diabetic neuropathy and oxidative stress. **Diabetes/Metabolism Research and Reviews**, v. 22, n. 4, p. 257-273, 2006.

PRATT, B.M.; McPHERSON, J.M. TGF-beta in the central nervous system: potential roles in ischemic injury and neurodegenerative diseases. **Cytokine and Growth Factors Reviews**, v. 8, n.4, p. 267-292, 1997.

PROELL, V.; CARMONA-CUENCA, I.; MURILLO, M.M.; HUBER, H.; FABREGAT, I.; MIKULITS, W. TGF-beta dependent regulation of oxygen radicals during transdifferentiation of activated hepatic stellate cells to myofibroblastoid cells. **Comparative Hepatology**, v. 20, p. 6:1, 2007.

RAJI, A.R.; BOWDEN, R.E. Effects of high-peak pulsed electromagnetic field on the degeneration and regeneration of the common peroneal nerve in rats. **Journal of Bone and Joint Surgery**, v. 65, n. 4, p. 478-492, 1983.

RHYU, D.Y.; YANG, Y.; HA, H.; LEE, G.T.; SONG, J.S.; UH, S.T.; LEE, H.B. Role of reactive oxygen species in TGF- β 1-induced mitogen-activated protein kinase activation and epithelial-mesenchymal transition in renal tubular epithelial cells. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 16, p. 667-675, 2005.

ROBBINS, S.L. **Patologia Estrutural e Funcional**, Rio de Janeiro: Interamericana, 1974, p. 1421.

ROBINSON, A.J.; SNYDER-MACKLER, L. **Eletrofisiologia Clínica – Eletroterapia e teste eletrofisiológico**. Porto Alegre, Artmed, 2002.

ROGISTER, B.; DELRÉE, P.; LEPRINCE, P.; MARTIN, D.; SADZOT, C.; MALGRANGE, B.; MUNAUT, C.; RIGO, J.M.; LEFEBVRE, P.P.; OCTAVE, J.N. Transforming growth factor beta as a neuronogial signal during peripheral nervous system response do injury. **Journal of Neuroscience Research**, v. 34, n. 1, p. 32-43, 1993.

ROSENSPIRE, A.J.; KINDZELSKII, A.L.; PETTY, H.R. Pulsed DC electric fields couple to natural NAD(P)H oscillations in HT-1080 fibrosarcoma cells. **Journal of Cell Science**, v. 114, n. 8, p. 1515-1520, 2001.

RUSOVAN, A.; KANJE, M.; MILD, K.H. The stimulatory effect of magnetic fields on regeneration of the rat sciatic nerve is frequency dependent. **Experimental Neurology**, v. 117, n. 1, p. 81-84, 1992.

SAIKA, T.; SENBA, E.; NOGUCHI, K.; SATO, M.; KUBO, T.; MATSUNAGA, T.; TOHYAMA, M. Changes in expression of peptides in rat facial motoneurons after facial nerve crushing and resection. **Brain Research Molecular Brain Research**, v. 11, n. 3-4, p. 187-196, 1991.

SANCHEZ, A.; BILINSKI, M.; VILLAR, M.J.; TRAMEZZAINI, J.H. Coexistence of neuropeptides and their possible relation to neuritic regeneration in primary cultures of

magnocellular neurons isolated from adult rat supraoptic nuclei. **Histochemistry Journal**, v. 33, n. 2, p. 121-128, 2001.

SANDBERG, M.L.; SANDBERG, M.K.; DAHL, J. Blood flow changes in the trapezius muscle and overlying skin following transcutaneous electrical nerve stimulation. **Physical Therapy**, v. 87, n. 8, p. 1047-1055, 2007.

SAUER, H.; BEKHITE, M.M.; HESCHELER, J.; WARTENBERG, M. Redox control of angiogenic factors and CD31-positive vessel-like structures in mouse embryonic stem cells after direct current electric field stimulation. **Experimental Cell Research**, v. 304, n. 2, p. 380-390, 2005.

SCHIAVETO de SOUZA, A.; Da SILVA, C.A.; Del BEL, E.A. Methodological evaluation to analyze functional recovery after sciatic nerve injury. **Journal of Neurotrauma**, v. 21, n. 5, p. 627-635, 2004.

SCHLAEPFER, W.W. **Experimental alterations of neurofilaments and neurotubules by calcium and other ions.** *Experimental Cell Research*, v.67, p.73-80, 1971.

SCHÖBER, A.; HERTEL, R.; ARUMĂE, U.; FARKAS, L.; JASZAI, J.; KRIEGLSTEIN, K.; SAARMA, M.; UNSICKER, K. Glial cell line-derived neurotrophic factor rescues target-deprived sympathetic spinal cord neurons but requires transforming growth factor- β as cofactor *in vivo*. **The Journal of Neuroscience**, v. 19, n. 6, p. 2008-2015, 1999.

SCOTT, JJA. Recovery of denervated muscle receptors following treatments to accelerate nerve regeneration. **Brain Research**, v. 563, p. 195-202, 1991.

SEO, T.B.; HAN I.S.; YOON, J.H.; HONG, K.E.; YOON, S.J.; NAMGUNG, U. Involvement of Cdc2 in axonal regeneration enhanced by exercise training in rats. **Medicine and Sciences in Sports and Exercises**, v. 38, n. 7, p. 1267-1276, 2006.

SINATRA, R.S.; FORD, D.H.; RHINES, R.K. The effects of acute morphine treatment on the incorporation of [3H]L-lysine by normal and regenerating facial nucleus neurons. **Brain Research**, v. 171 n. 2, p. 307-317, 1979.

SINATRA, R.S.; FORD, D.H. The effects of acute and chronic morphine treatment on the process of facial nerve regeneration. **Brain Research**, v. 175, n. 2, p. 315-325, 1979.

SISKEN, B.F.; KANJE, M.; LUNDBORG, G.; HERBST, E.; KUTZ, W. Stimulation of rat sciatic nerve regeneration with pulsed electromagnetic fields. **Brain Research**, v. 485, n. 2, p. 309-316, 1989.

SISKEN, B.F.; JACOB, J.M.; WALKER, J.L. Acute treatment with pulsed electromagnetic fields and its effects on fast axonal transport in normal and regenerating nerve. **Journal of Neuroscience Research**, v. 42, n. 5, p. 692-699, 1995.

SLUKA, K.A.; WALSH, D. Transcutaneous electrical nerve stimulation: Basic science mechanisms and clinical effectiveness. **The Journal of Pain**, v.4, n. 3, p.109-121, 2003.

SOMERS, D.L.; CLEMENTE, F.R. Transcutaneous electrical nerve stimulation for the management of neuropathic pain: the effects of frequency and electrode position on prevention of allodynia in a rat model of complex regional pain syndrome type II. **Physical Therapy**, v. 86, n. 5, p. 698-709, 2006.

SOMERS, D.L., SOMERS, MF. Treatment of neuropathic pain in a patient with diabetic neuropathy using transcutaneous electrical nerve stimulation applied to the skin of the lumbar region. **Physical Therapy**, v. 79, n. 8, p. 767-775, 1999

SONG, B.; ZHAO, M.; FORRESTER, J.; McCAIG, C. Nerve regeneration and wound healing are stimulated and directed by an endogenous electric field in vivo. **Journal of Cell Science**, v. 117, p. 4681-1690, 2004.

SMITH, A.A.; HUI, F. Inhibition of neurotrophic activity in salamanders treated with opioids. **Experimental Neurology**, v. 39, n. 1, p. 36-43, 1973.

STEWART, H.J.; CURTIS, R.; JESSEN, K.R.; MIRSKY, R. TGF-beta and cAMP regulate GAP-43 expression in Schwann cells and reveal the association of this protein with the trans-Golgi network. **European Journal of Neuroscience**, Agosto 1, v. 7, n 8, p. 1761-1772, 1995.

STOLL, G.; JANDER, S.; MYERS, R.R.. Degeneration and regeneration of the peripheral nervous system: From Augustus Waller's observation to neuroinflammation. **Journal of the Peripheral Nervous System**, v. 7, p. 13-27, 2002.

STOLL, G.; MÜLLER, H.W. Nerve injury, axonal degeneration and neural regeneration: Basic insights. **Brain Pathology**, v. 9, p. 313-325, 1999.

STOLL, G.; TRAPP, B.D.; GRIFFIN, J.W. Wallerian degeneration of the peripheral nervous system: participation of both Schwann cells and macrophages in myelin degradation. **Journal of Neurocytology**, vol. 18, p. 671-683, 1989.

SULAIMAN, O.A.; GORDON, T. Effects of short and long term Schwann denervation on peripheral nerve regeneration, myelination and size. **Glia**, v. 32, n. 3, p. 234-243, 2000.

THAM, S.; DOWSING, B.; FIKELSTEIN, D.; DONATO, R. CHEEMA, S.S.; BARTLETT, P.F.; MORRISON, W.A. Leukemia inhibitory factor enhances the regeneration of transected rat sciatic nerves and the function of reinnervated muscle. **Journal of Neuroscience Research**, v.47, p.208-215, 1997).

TOHILL, M.; TERENGI, G. Stem-cell plasticity and therapy for injuries in the peripheral nervous system. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 40, p. 17-24, 2004.

VARANI, K.; GESSI, S.; MERIGHI, S.; IANNOTTA, V.; CATTABRIGA, F.; SPISANI, S.; CADOSSO, R.; BOREA, P.A. Effect of low frequency electromagnetic fields on A2A adenosine receptors in human neutrophils. **British Journal of Pharmacology**, v. 136, n. 1, p. 57-66, 2002.

VAREJÃO, A.S.; CABRITA, A.M.; MEEK, M.F.; BULAS-CRUZ, J.; MELO-PINTO, P.; RAIMONDO, S.; GEUNA, S.; GIACOBINI-ROBECCHI, M.G. Functional and morphological assessment of a standardized rat sciatic nerve crush injury with a non-serrated clamp. **Journal of Neurotrauma**, v. 21, n. 11, p. 1652-1670, 2004.

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

VAYALIL, P.K.; ILES, K.E.; CHOI, J.; YI, A.K.; POSTLETHWAIT, E.M.; LIU, R.M. Glutathione suppresses TGF-beta-induced PAI-1 expression by inhibiting p38 and JNK MAPK and the binding of AP-1, SP-1 and Smad to PAI-1 promoter. **American Journal of Physiology – Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 293, n. 5, p. L1281-1292, 2007.

WALKER, J.L.; EVANS, J.M.; RESIG, P.; GUARNIERI, S.; MEADE, P.; SISKEN, B.S. Enhancement of functional recovery following a crush lesion to the rat sciatic nerve by exposure to pulsed electromagnetic fields. **Experimental Neurology**, v. 125, n. 2, p. 302-305, 1994.

WALKER, J.L.; EVANS, J.M.; MEADE, P.; RESIG, P.; SISKEN, B.F. Gait-stance duration as measure of injury and recovery in the rat sciatic nerve model. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 52, p. 47-52, 1994.

WATSON, T. Estimulação elétrica para cicatrização de feridas. IN: Kitchen, S.; Bazin, S. **Eletroterapia de Clayton**, São Paulo: Manole, Cap. 21, p. 311-337, 1998.

YU, G.; HE, Z. Glial inhibition of CNS regeneration. **Nature Neuroscience Reviews**, v. 7, n. 8, p. 617-627, 2006.

ZENG, Y.S.; NIE, J.H.; ZHANG, W.; CHEN, S.J.; WU, W. Morphine acts via μ -opioid receptors to enhance spinal regeneration and synaptic reconstruction of primary afferent fibers injured by sciatic nerve crush. *Brain Research*, v. 1130, p. 108-113, 2007.

ZHANG, J.; GIBNEY, G.T; ZHAO, P.; XIA, Y. Neuroprotective role of delta-opioid receptors in cortical neurons. **American Journal of Physiology – Cell Physiology**, v. 282, p. 1225-1234, 2002.

ZHOU, Y.; SUN, Y.H.; ZHANG, Z.W.; HAN, J.S. Increased release of immunoreactive cholecystinin octapeptide by morphine and potentiation of mu-opioid analgesia by CCKB receptor antagonist L-365, 260 in rat spinal cord. **European Journal of Pharmacology**, n. 234, p. 147-154, 1993.

ANEXO I

A new approach to assess function after sciatic nerve lesion in the mouse—Adaptation of the sciatic static index

Abrahão Fontes Baptista^{a,b,c}, Joyce Rios de Souza Gomes^b, Júlia Teixeira Oliveira^b,
Soraia Moreira Garzedim Santos^b, Marcos André Vannier-Santos^c,
Ana Maria Blanco Martinez^{a,*}

^a Departamento de Histologia e Embriologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

^b Fundação Bahiana para Desenvolvimento das Ciências, Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, Bahia, Brazil

^c Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Bahia, Brazil

Received 24 March 2006; received in revised form 22 November 2006; accepted 27 November 2006

Abstract

Among the numerous ways of assessing regeneration after peripheral nerve lesions, the analysis of gait is one of the most important, because it shows the recovery of function, which is the ultimate goal of the repair machinery. The sciatic function index was introduced as a method to assess reinnervation after an experimental sciatic nerve lesion, and was adapted to the mouse model. The sciatic static index (SSI), is more simple and practical to perform, and is not so influenced by gait's velocity, but this method has not yet been adapted to the mouse model of sciatic lesion. We used 63 male Swiss mice (*Mus musculus*) to develop a formula to the sciatic static index in mice (SSIm). The animals were divided on three groups (control, transection and crush). They were evaluated at the preoperative and 7th, 14th, 21st, 28th, 35th and 42nd days postoperative by the ink track method (SFI), and by the acquisition of photographs of the plantar aspects of the injured and uninjured hind paws. The parameters evaluated were the 1–5 toe spread (TS), the 2–4 toe spread (ITS) and the distance between the tip of the third toe and the most posterior aspect of the paw (PL), on both methods. After verifying the temporal pattern of function, correlation and reproducibility of the measurements, we performed a multiple regression analysis using SFI values as dependent variable, and the TS, ITS and PL measured with the photo method as independent variables, and found the formula of the SSI for mice (SSIm). The three groups (control, transection and crush) had a characteristic pattern of dysfunction. The parameters measured in the ink and photo method had variable but significant correlations between them ($P < 0.000$), but photo method of measurement showed a better reproducibility. The correlation between SFI and SSIm showed a high correlation coefficient ($r = 0.892$, $P < 0.000$), and demonstrates that SSIm can be used as an alternative method to assess the functional status relative of sciatic nerve activity in mice.

© 2006 Published by Elsevier B.V.

Keywords: Functional tests; Mice; Sciatic nerve; Sciatic function index; Sciatic static index

1. Introduction

After an axonal lesion, there is an extensive degeneration of the distal segment, known as Wallerian Degeneration. Specially in the peripheral nervous system, the proximal stump, that is connected to the cell body, can regenerate to reinnervate the target organs. Although this process is often facilitated by a per-

missive environment in the periphery (Stoll and Muller, 1999), some factors can impede normal return to function, such as the distance from injury site (Gordon et al., 2003), metabolic disturbances (Kennedy and Zochodne, 2005), age (Verdu et al., 2000) and type of lesion (Lundborg, 2004).

Strategies developed to improve peripheral nerve regeneration require quantitative approaches for evaluating functional outcome. The majority of such studies use rats as the chosen animal experimental model. In these studies, regeneration can be assessed by numerous methods, including histomorphometry, electrophysiology and gait analysis. Due to the fact that the sciatic represents the most used nerve in experimental approaches, some tests were developed to assess its function after injuries.

* Corresponding author at: Departamento de Histologia e Embriologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Cidade Universitária-Ilha do Fundão, Centro de Ciências da Saúde, Sala F012, Rio de Janeiro, RJ 21949-900, Brazil. Tel.: +55 21 25626431; fax: +55 21 25626431.

E-mail address: martinez@histo.ufrj.br (A.M.B. Martinez).

The sciatic function index (SFI) is one of the most widely used forms of functional assessment. It compares parameters from the normal and experimental footprints by a mathematical formula, and provides information concerning the recovery of sensory-motor connections and cortical integration related to gait function and mediated by the sciatic nerve, without requiring terminal assessment. Since the SFI (DeMedinaceli et al., 1982) was introduced, it was modified several times in order to become simpler and more reliable (Bain et al., 1989; Carlton and Goldberg, 1986).

The sciatic static index (SSI), introduced by Bervar (2000), is another way of assessing recovery of function after sciatic injury in animal models. It uses the footprints, acquired when the animal is on a static position, and minimizes bias related to gait's velocity. Also, the SSI improves the acquisition of footprints, and is more repeatable and accurate than the SFI.

The SFI and the SSI were first developed to be used in rats (Bervar, 2000; DeMedinaceli et al., 1982). The SFI was adapted to be used in mice (Inserra et al., 1998), but the SSI, that is very simple and easy to perform, has not yet been adapted to this animal model. Furthermore, the use of mice in peripheral nerve regeneration studies is very common, because of the similarity of its biological processes with the human's, availability of transgenic models and because it is easier to manipulate. Nevertheless, functional tests in the mice model of sciatic nerve injury are poorly investigated. So, our goal was to develop the SSI formula for mice.

2. Material and methods

2.1. Experimental animals and surgical procedure

We used 63 male Swiss mice (*Mus musculus*), weighing 35–45 g, from our animal facility. The study was in accordance with the rules of the Committee for Ethics in Animal Experimentation of the Gonçalo Moniz Research Center/Oswaldo Cruz Foundation, Brazil. The animals were housed in individual cages with food and water *ad libitum* and a cycle of 12 h light/12 h dark. Animals were deeply anesthetized with ketamine (0.1 mL/mg) and xylazine (0.2 mL/mg) and then submitted to asepsis and trichotomy of the right gluteus region. After a longitudinal incision, the sciatic nerve was either only exposed and isolated from the adjacent tissues (control group) ($n=21$), crushed at 1 cm from the spinal cord with a non-serrated needle holder, with an uniform pressure applied for 30 s (crush group) ($n=21$), or transected at the sciatic notch, with the removal of a 2 mm gap (transection group) ($n=21$). The muscle and skin were sutured by layers.

2.2. Functional tests

In the previous day and on 7th, 14th, 21st, 28th, 35th and 42nd days post lesion, the animals were evaluated to obtain three footprint parameters—the distance between the first and fifth toes: toe spread (TS), the distance between the second and fourth toes: intermediary toe spread (ITS) and the distance between

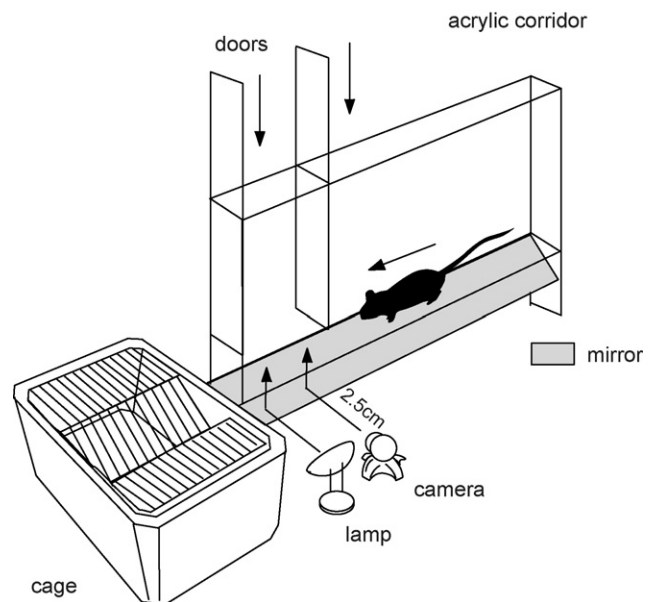


Fig. 1. Apparatus to gait photo assessment. The animals were induced to walk in its cage direction, through a transparent acrylic corridor, with a mirror at 45° underneath the floor. At the end of the track, two doors were closed and, when the animal stopped, the photos were acquired with a Web Cam positioned 2.5 cm apart from the mirror, under illumination of a 50 W lamp. After the photos were acquired, the animals were permitted to go to the cage's grid and transported inside.

the tip of the third toe and the most posterior part of the foot in contact with the ground: print length (PL).

The assessment was carried out in two ways. First, the animals were disposed on an acrylic corridor (48 cm × 4.5 cm) with a mirror placed underneath the apparatus at an angle of 45° (Varejão et al., 2001; Westerga and Gramsberg, 1990). A 50 W lamp, with the focus directed to the mirror, illuminated the corridor (Fig. 1). The animal's cage was placed at the end of the corridor to induce the animal to walk in this direction, and before it got into it, the corridor was closed (Fig. 1). When the animals stopped, at the end of the corridor, three photos were acquired with a Web Cam (Drop Cam 100, Go Tec, China), positioned 2.5 cm from the mirror, and the parameters' means of the footprint assessed with an image analysis software (Image J, National Institute of Health, USA), calibrated with a scanned pachymeter. The TS and ITS were defined with the most lateral and medial edges of the proper toes, and the PL with the most anterior edge of the third toe and the most posterior portion in contact with the ground, where the limits of the paw became less clear, pale and discolored (Fig. 2).

After the photos were obtained on the acrylic corridor, the animals were disposed on a similar dispositive, made of wood and lined on the bottom with a sheet white paper. The animals were immobilized and had the hind limb paws painted with black China's ink, until the rear portion of the foot. Then they were allowed to walk along the corridor and the footprints were registered. For each animal, a mean of three pairs of footprints, each from the same gait cycle, was used in the assessment. These parameters were measured with a pachymeter, and the TS and ITS measurements followed the same criteria as the photo ones.

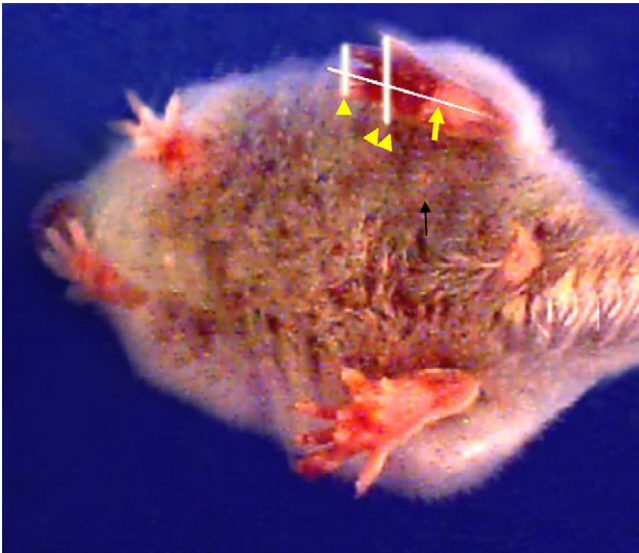


Fig. 2. Photograph showing the plantar aspect of a mouse. Bars show 1–5 toe spread (TS) (arrow head), 2–4 intermediary toe spread (ITS) (double arrow head) and print length (PL), estimated as the distance from the tip of the third toe to the most posterior aspect of the paw in contact with the floor (arrow). Three photos were acquired from each animal and the mean TS, ITS and PL achieved to assess gait function.

For the PL we considered the tip of the third toe and the most posterior aspect of the footprint.

The factors for each parameter (TS, ITS and PL) were calculated with the formula: injured – uninjured/uninjured values (e.g. TSF (toe spread factor) = TS experimental – TS normal/TS normal), and the SFI with the one conceived by Inserra et al. (1998), where $SFI = 118.9 \times TSF - 51.2 \times PLF - 7.5$.

2.3. Data analysis

Statistical analysis was performed in various steps. First, we assessed the degree of variability on function per group, across the 6-week period of experiment, using Friedmann's paired analysis of variance on the SFI values. The second step was to find correlation between each footprint parameter and also their factors, obtained with the two methods (photo and ink), using Pearson's correlation index. Third, we verified the reproducibility of the measurements, using ANOVA to compare variability of each parameter between the two forms of assessment (ink and video), across the period of experiment. After a curve fit test, to verify if the values were distributed on a linear disposition, we used multiple linear regression analysis. It was considered as dependent variable the values of the SFI through all the period, and as independent variables the TS, ITS and PL factors, obtained with the photo method. We defined the functional losses as zero preoperatively and –100 postoperatively and, using regression analysis, generated the adequate SSI formula for mice (SSIm). Then we assessed correlation between SSIm and SFI, pooling again all the three groups (control, transection and crush), using Pearson's correlation index. It was accepted the significance level of 5% ($P < 0.05$). The analysis was carried out with the OPENSTAT 4.0 statistical package.

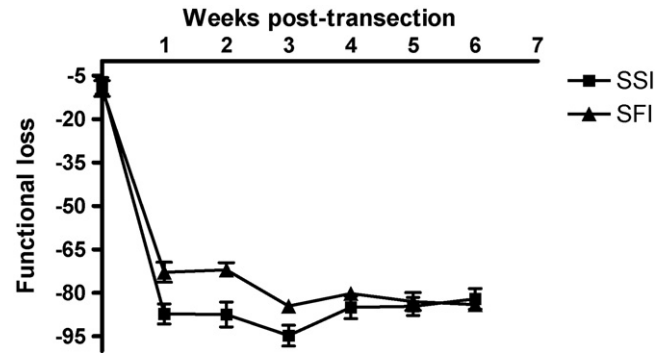


Fig. 3. Comparison of the recovery determined by sciatic function index (SFI) (▲) and sciatic static index for the mouse (SSIm) (■) in the transection group. The graph shows function during the 6-week period of experiment, assessed by the SFI and SSIm. Static sciatic index for the mouse seems to be a little more sensitive to transection than SFI, showed by a more prominent decrease of function on the first 3 weeks post lesion. Data are presented as mean \pm S.E.M.

3. Results

The animals were analyzed weekly, from the day immediately before surgery, and the analysis was carried out for 6 weeks. Statistical tests using Friedmann analysis of variance on SFI values, showed no significant shift on the control group function, during the 6 weeks period of experiment ($F = 6.454$, d.f. = 6, $P = 0.3743$). Transection group followed a different pattern, with a marked decrease on function at the first week post-lesion, and maintained this status until the end of the experiment ($F = 50.526$, d.f. = 6, $P < 0.0001$) (Fig. 3). Crush group also showed the same decrease on function in the first week ($F = 60.00$, d.f. = 6, $P < 0.0001$), but recovering normal gait at the third week (Fig. 4). Two animals were excluded from both, crush and transection groups, due to autotomy.

Correlation between ink and photo measurements, using Pearson's index, was significant for all the parameters ($P < 0.000$). Although some of them were low (uninjured TS and PL, and injured ITS), the remaining showed mild to high correlation (Table 1). The analysis of the parameter's reproducibility showed coefficients of variations ranging from 8.73% (TS, uninjured side, ink method) to 28.57% (ITS, uninjured

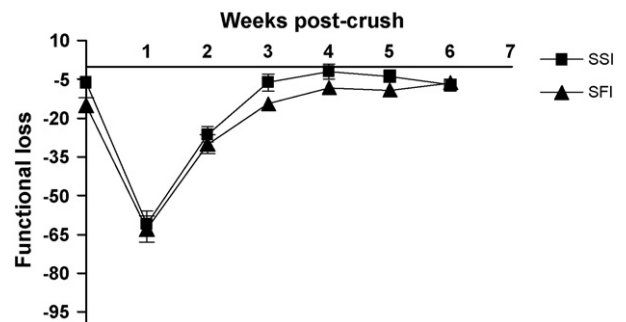


Fig. 4. Comparison of the recovery determined by sciatic function index (SFI) (▲) and sciatic static index for the mouse (SSIm) (■) in the crush group. The graph shows function during the 6-week period of the experiment, assessed by the SFI and SSIm. Both methods show similar pattern, with marked decrease of function on the first week, and return to normal on the third or fourth weeks. Data are presented as mean \pm S.E.M.

Table 1
Correlation between photo vs. ink measurements of the footprint variables (TS, ITS and PL) and their calculated factors

Parameter	Degrees of freedom (d.f.)	Correlation coefficient (<i>r</i>)	Significance level (<i>P</i> -value)
1–5 toe spread (TS)			
Uninjured hind foot	413	0.363	<0.000
Injured hind foot	413	0.882	<0.000
TS factor	413	0.875	<0.000
2–4 toe spread (ITS)			
Uninjured hind foot	413	0.609	<0.000
Injured hind foot	413	0.213	<0.000
ITS factor	413	0.608	<0.000
Print length (PL)			
Uninjured hind foot	413	0.234	<0.000
Injured hind foot	413	0.540	<0.000
PL factor	413	0.488	<0.000

Factor = injured – uninjured/uninjured.

Table 2
Reproducibility of the footprint parameters

Parameter	Degrees of freedom (d.f.) ^a	Average coefficient of variation (%)		Most repeatable technique (<i>P</i> -value)
		Ink	Photo	
1–5 toe spread (TS)				
Uninjured hind foot	1	8.73	10.38	Ink (<i>P</i> <0.01)
Injured hind foot	1	29.41	8.82	Photo (<i>P</i> <0.00)
2–4 toe spread (ITS)				
Uninjured hind foot	1	18.22	16.33	Photo (<i>P</i> <0.00)
Injured hind foot	1	26.19	28.57	Ink (<i>P</i> <0.00)
Print length (PL)				
Uninjured hind foot	1	13.9	9.32	Photo (<i>P</i> <0.05)
Injured hind foot	1	27.76	11.10	Photo (<i>P</i> <0.00)

^a Between groups.

side, ink method). Ink and photo methods of acquiring footprint parameters were always different, with photo method being more reproducible than ink method on almost all conditions. Ink method was more repeatable only for the uninjured TS and ITS measurements. Injured side had, almost always, bigger coefficients of variation (Table 2). Toe spread measurements seemed to be the most accurate measurements, with coefficients of variation ranging from 8.73 to 10.38%.

In order to find the SSI formula for mice (SSIm), we performed multiple linear regression using as dependent variable SFI values, obtained through all period of experiment, pooling the three groups of animals (control, transection and crush). To

minimize errors, we used only those values that were between 10 and –100. Fifteen values were excluded because they were not in this range. The independent variables were the three factors obtained in the photo assessment (FTS, FITS and FPL). A curve fit test was performed to verify if they had a linear distribution. All of the three achieved a significance level, with the *F* test being stronger in the FTS group ($F = 1445.22$, $P < 0.000$), followed by the FITS ($F = 450.72$, $P < 0.000$) and the FPL ($F = 231.96$, $P < 0.000$).

Multiple linear forward stepwise regression analysis was performed, and showed toe spread factor as the major function predictor, representing almost 78% of the variations ($R^2 = 0.778$, $F = 1445.22$, $P < 0.000$). Intermediary toe spread factor did not change the estimative of function, and PLF generated minor but significant changes. When PLF was added to FTS, they turned to represent almost 80% of the variations ($R^2 = 0.796$, $F = 51130.33$, $P < 0.000$) (Table 3). Based on this model we found the formula $SSIm = 101.3 \times TSF - 54.03 \times PLF - 9.5$ (Table 4). The *F* value for the equation was 798.728, significant at the $P < 0.000$ level.

The next step was to validate the new formula finding its correlation with the previous SFI index. Pearson's index was performed to correlate all SFI index values with the ones now obtained using the SSIm formula, pooling again all the groups across the period of experiment. We found a high and significant correlation between the values obtained by the two formulae ($r = 0.892$, two-tailed, $P < 0.000$). Static sciatic index for mice generated a similar pattern of function compared to SFI on the three groups analyzed. Little differences were seen, like on the first week post lesion, where SFI values did not decrease so much as SSIm on the transection group (Fig. 3). These differences were not seen when SFI and SSIm were compared on the crush group (Fig. 4)

4. Discussion

The search for a practical, reproducible and sensitive test to analyze function recovery after a peripheral nerve lesion is very important because these methods allow the quantitative determination of the recovery process, which relies on the functional reinnervation of the target organs. *Bona fide* quantitative methods are needed for the assessment of rehabilitation. Many tests were developed and adapted to assess sensory-motor recovery in the rat model of sciatic nerve injury (Schiveto de Souza et al., 2004; Varejão et al., 2004a). Although this rodent is the most widely used animal model in studies of peripheral nerve regeneration, the mouse is not only well characterized genetically,

Table 3
Linear regression model, showing the power of each factor on the final SSI formula for mice

Factor	<i>R</i>	<i>R</i> ²	Adjusted <i>R</i> ²	S.E.	Change statistics				
					<i>R</i> ² change	<i>F</i> change	d.f.1	d.f.2	Sig. <i>F</i> change
TS factor	0.883 ^a	0.779	0.778	17.74395	0.779	1445.217	1	410	<i>P</i> <0.000
PL factor	0.893 ^b	0.797	0.796	17.04376	0.018	35.379	1	409	<i>P</i> <0.000

^a Predictors: (constant), fitsV.

^b Predictors: (constant), fitsV, fplV.

Table 4

Results of the linear regression analysis, showing the beta coefficients of each factor (*B*) associated with standard errors (S.E.), the constant generated and significance level of the estimations

Footprint factor	Unstandardized coefficients		Standardized coefficients, beta	<i>t</i>	Significance level (<i>P</i> -value)
	<i>B</i>	S.E.			
Constant	−9.949	1.034		−9.618	<0.000
TS factor	101.29	5.29	0.765	19.146	<0.000
ITS factor	5.64	5.78	0.036	0.975	0.330
PL factor	−54.03	9.13	−0.159	−5.918	<0.000

but also easier to manipulate and maintain. Gait assessment is expressive to represent regeneration after peripheral nerve lesions, since it integrates sensory and motor fibers on a specialized pattern of movement. The SFI was adapted to the mouse model of sciatic lesion by *Inserra et al. (1998)*. In this work, only the print length (PL) and the toe spread (TS) were considered relevant to assess function variations. To register the footprints, the use of China's ink and paper may be a simple method to allow clear identification of the footprint parameters and permits various gait cycles to choose, but it may stress the animals and is time consuming. Also, there are some negative factors that can introduce bias in the study, such as foot contractures, autotomy, excrements on the corridor (*Bain et al., 1989; DeMedinaceli et al., 1982; Varejão et al., 2004a*) and variations due to gait velocity (*Walker et al., 1994a*).

The SSI, developed by *Bervar (2000)*, seems to be easier and faster to be acquired and analyzed, generating considerably less stress to the animals. In our method we found that the images turned out to be very clear, facilitating the measurement of the parameters involved. Besides, it requires only a low cost dispositive, that includes a device with transparent bottom, a photographic camera and an imaging processing system, and works well under low illumination, i.e. approximately 25% of the power used by *Bervar (2000)*, presumably reducing the animal's stress, as rodents are light averse.

The three groups on our experiment showed an expected pattern of function during the 6 weeks period, similar to other studies in rats (*Bervar, 2000; Grasso et al., 2004; Varejão et al., 2004b*) and mice (*Fukuyama et al., 2000; Islamov et al., 2002*). Ink and photo methods used to acquire footprint parameters had, always, different reproducibility. Photo measurements were more accurate, presenting most of the time lower coefficients of variation than ink method. The bigger variability on the ink method may be due to difficulties with smeared footprints, contractures and variations on gait velocity, already seen by others (*Dellon and Mackinnon, 1989; Jihad et al., 1989; Varejão et al., 2001, 2004b; Walker et al., 1994a*). Also, the dynamic procedure to achieve footprints has sometimes to be repeated, because of the low quality of some prints. This repetition stresses the animals and can contribute to greater variations on the measurements. The photos used on the static analysis minimize most of these problems, because the researcher can wait for the moment where animals are stopped to acquire the images. There is no bias due to smeared footprints, as we can see paws as they are, or to gait velocity variations, because the animals are stopped. Maybe variations due to weight or sex (*Dellon and Dellon, 1991;*

Parker and Clark, 1990) can also be minimized with the static method, because the animal is lying on its posterior paws, dissipating mechanical charges. Sometimes, excrements or forced adduction of the lateral toes by the cages' walls interfered with the measurements. On these situations, we cleaned the acrylic dispositive or gently moved the animals to another position. We consider that it is very important to adapt the animals to the procedure. When it was not a new situation, they seemed to be quieter, stopping just at the end of the corridor, and maintaining a static position.

The formula developed for the SSIm, shows the big influence of the TS as a measure of gait dysfunction due to sciatic nerve lesion. This parameter represents the majority of alterations and may be used alone as an indicative of the lesion's stage, as have been demonstrated by other investigators (*Bervar, 2000; Walker et al., 1994a*). Intermediary toe spread, following the same pattern of the SFI for mice (*Inserra et al., 1998*), did not have a significant role on demonstrating dysfunction, probably because it is very similar on the crush and control groups, or because of its big variations. The PL gave a small but significant contribution to the formula. This parameter expresses the ability of the soleus and gastrocnemius muscles to maintain the heel elevated during walking in rodents. As these muscles are innervated by the sciatic nerve, when impaired they cannot maintain the normal ankle angle, letting a bigger portion of the paw to be in contact with the floor. Although the PL may be very variable, due to the difficulty to establish its posterior aspect, its significance has also been demonstrated in the ink track method, which generated the SFI formula for the mouse (*Inserra et al., 1998*).

The high correlation between the SFI and SSIm ($r=0.892$, $P<0.000$) validates the use of the static analysis to assess sciatic nerve dysfunction after lesions in mice. Afterwards, SSIm is much more simple to perform, because it does not require the use of paint or other resources that can confound the measurement of each parameter. Also, as the animal does not need to walk, variations due to gait velocity and changes on the direction are not involved.

Further studies should investigate the use of the SSIm to assess different types of lesions, like transection and repair or tubulization. Also it is necessary to assess the use of SSIm to evaluate chronic injuries, as the SFI does not seem to be capable to demonstrate functional status in these situations due to the presence of contractures. In this situation, the abnormal gait pattern may influence the tail to smear ink or retain it in the claws, generating difficulties to interpretation of data (*Dellon*

and Mackinnon, 1989). Although this does not happen on photo assessments, contractures are important consequences of nerve injury, and studies should be developed to assess its influence on SSIm. Correlations between the SSIm and histomorphometric measurements should also be performed, as Jihad et al. (1989) showed that function assessed by the SFI may not be correlated with morphological findings.

Acknowledgement

This research was supported by grants from Fundação Bahiana para Desenvolvimento das Ciências, CAPES, FAPESB, FAPERJ and CNPq. We would like to thank to Israel Souza, Marcos Aguiar and Maurício Cardeal for statistical analysis support and Tarcísio de Sá Cardoso for the illustrations.

References

- Bain JR, Mackinnon SE, Hunter DA. Functional evaluation of complete sciatic, peroneal and posterior tibial nerve lesions in the rat. *Plast Reconstr Surg* 1989;83(1):129–38.
- Bervar M. Video analysis of standing—an alternative footprint analysis to assess functional loss following injury to the rat sciatic nerve. *J Neurosci Meth* 2000;102(2):109–16.
- Carlton JM, Goldberg NH. Quantitative integrated muscle function following reinnervation. *Plast Reconstr Surg* 1986;37:611–2.
- Dellon ES, Dellon AL. Functional assessment of neurological impairment: track analysis in diabetic and compression neuropathies. *Plast Reconstr Surg* 1991;88:686–94.
- Dellon AL, Mackinnon SE. Sciatic nerve regeneration in the rat. Validity of walking track assessment in the presence of chronic contractures. *Microsurgery* 1989;10(3):220–5.
- DeMedinaceli 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):634–43.
- Fukuyama R, Ohta M, Ohta K, Saiwaki T, Fushiki S, Awaya A. A synthesized pyrimidine compound, MS-818, promotes walking function recovery from crush injury of the sciatic nerve through its indirect stimulation of Schwann cells. *Restor Neurol Neurosci* 2000;17(1):9–16.
- Gordon T, Sulaiman O, Boyd JG. Experimental strategies to promote functional recovery after peripheral nerve injuries. *J Peripher Nerv Syst* 2003;8:236–50.
- Grasso G, Sfactoria A, Brines M, Tomasello F. A new computed-assisted technique for experimental sciatic nerve function analysis. *Med Sci Monit* 2004;10(1):BR1–3.
- Insera MM, Bloch DA, Terris DJ. Functional indices for sciatic, peroneal, and posterior tibial nerve lesions in the mouse. *Microsurgery* 1998;18(2):119–24.
- Islamov RR, Hendricks WA, Jones RJ, Lyall GJ, Spanier NS, Murashov AK. 17Beta-estradiol stimulates regeneration of sciatic nerve in female mice. *Brain Res* 2002;943(2):283–6.
- Jihad M, Shenaq MD, Saleh M, Shenaq MD, Melvin S. Reliability of sciatic function index in assessing nerve regeneration across a 1 cm gap. *Microsurgery* 1989;10(3):214–9.
- Kennedy JM, Zochodne DW. Impaired peripheral nerve regeneration in diabetes mellitus. *J Peripher Nerv Syst* Jun 2005;10(2):144–57.
- Lundborg G. Nerve injury and repair—regeneration, reconstruction and cortical repair. Philadelphia: Elsevier/Churchill Livingstone; 2004.
- Parker AJ, Clark KA. Gait topography in rat locomotion. *Physiol Behav* 1990;48:41–7.
- Schiaveto de Souza A, da Silva CA, Del Bel EA. Methodological evaluation to analyze functional recovery after sciatic nerve injury. *J Neurotrauma* 2004;21(5):627–35.
- Stoll G, Muller HW. Nerve injury, axonal degeneration and neuronal regeneration: basic insights. *Brain Pathol* Apr 1999;9(2):313–25.
- Varejão ASP, Meek MF, Ferreira AJA, Patrício JAB, Cabrita AMS. Functional evaluation of peripheral nerve regeneration in the rat: walking track analysis. *J Neurosci Meth* Jul 2001;108(1):1–9.
- Varejão ASP, Melo-Pinto P, Meek MF, Filipe VM, Bulas-Cruz J. Methods for the experimental functional assessment of rat sciatic nerve regeneration. *Neurol Res* 2004a;26(2):186–94.
- Varejão ASP, Cabrita AM, Meek MF, Bulas-Cruz J, Melo-Pinto P, Raimondo S, et al. Functional and morphological assessment of a standardized rat sciatic nerve crush injury with a non-serrated clamp. *J Neurotrauma* 2004b;21(11):1652–70.
- Verdu E, Ceballos D, Vilches JJ, Navarro X. Influence of aging on peripheral nerve function and regeneration. *J Peripher Nerv Syst* Dec 2000;5(4):191–208.
- Walker JL, Evans JM, Meade P, Resig P, Siskin BF. Gait-stance duration as a measure of injury and recovery in the rat sciatic nerve model. *J Neurosci Meth* 1994a;52(1):47–52.
- Westerga J, Gramsberg A. The development of locomotion in the rat. *Brain Res Dev Brain Res* 1990;57(2):163–74.

ANEXO II

RESEARCH REPORT

High- and low-frequency transcutaneous electrical nerve stimulation delay sciatic nerve regeneration after crush lesion in the mouse

Abrahão F. Baptista^{1,2,3}, Joyce R. S. Gomes³, Júlia T. Oliveira³, Soraia M. G. Santos³, Marcos A. Vannier-Santos², and Ana M. B. Martinez¹

¹Universidade Federal do Rio de Janeiro, Departamento de Histologia e Embriologia, Instituto de Ciências Biológicas, Centro de Ciências da Saúde, Cidade Universitária, Rio de Janeiro; ²Fundação Oswaldo Cruz – Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Unidade de Microscopia Eletrônica, Salvador; and ³Fundação Bahiana para Desenvolvimento das Ciências, Grupo de Pesquisas em Dinâmica do Sistema Neuromusculoesquelético, Salvador, Brazil

Abstract The stimulation of peripheral nerve regeneration has been studied in different ways, including the use of electrical fields. The capacity of this modality to enhance nerve regeneration is influenced by the parameters used, including current type, frequency, intensity, and means of administration. Transcutaneous electrical nerve stimulation (TENS) is a frequently used form of administering electrical current to the body, but its effects on peripheral nerve regeneration are not known. This study assessed the influence of TENS on sciatic nerve regeneration, using a model of crush lesion in the mouse. Mice were stimulated 30 min a day, 5 days a week, for 5 weeks with both high- (100 Hz) and low- (4 Hz) frequency TENS. Control animals had the sciatic nerve crushed but were not stimulated. Assessment was performed weekly by functional analysis using the Static Sciatic Index for the mouse and at the end of the experiment by light and electron microscopy. The results showed that although there were no differences between the groups regarding the Sciatic Static Index values, TENS led to nerves with morphological signs of impaired regeneration. At light microscopy level, TENS nerves presented more axons with dark axoplasm, signs of edema, and a less organized cytoarchitecture. Electronmicrographs showed fewer and thinner thick myelinated fibers and increased number of Schwann cell nuclei. Myelinated axon diameters and density and diameter of nonmyelinated fibers were not affected by TENS, leading to the conclusion that this regimen of electrical stimulation leads to a delayed regeneration after a crush lesion of the sciatic nerve in the mouse. All these effects were more pronounced on high-frequency TENS nerves.

Key words: function recovery, histology, mice, nerve, regeneration, sciatic, transcutaneous electric nerve stimulation

Introduction

Degeneration and regeneration of a peripheral nerve involve a complex sequence of events initiated by Wallerian degeneration (WD) of the distal stump, which may or not favor target-organ reinnervation (*Ide, 1996*). The time course of degeneration and regeneration varies among species, site of lesion,

[1] Address correspondence to: Ana Maria Blanco Martinez, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Departamento de Histologia e Embriologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Centro de Ciências da Saúde, Bloco F, sala F012, Cidade Universitária, Ilha do Fundão, Rio de Janeiro, RJ, CEP 21.949-900, Brazil. Tel/Fax: 55 71 2562-6431; E-mail: martinez@histo.ufrj.br

nerve, and fiber type (Griffin et al., 1995). Also, different types of lesions have different prognoses. Crush lesions maintain the basal lamina, generating a propitious environment for regeneration, which is not observed in a transection injury (Stoll and Müller, 1999). Successful regeneration may be impeded by the distance to be covered by the growing nerve fibers. When the lesion occurs far from the target organ (e.g., brachial plexus injury), physiological regeneration speed in humans (1 mm/day) can be insufficient to promote functional reinnervation because of prolonged denervation and atrophy (Gordon et al., 2003). Therefore, to promote adequate function recovery, strategies to enhance regeneration are important.

Many studies have investigated the influence of electrical fields on peripheral nerve regeneration using laboratory animals. Most of them have used implanted or percutaneous electrodes, and positive effects were achieved with different stimulus parameters (weak constant, DC and AC pulsed electrical fields) (Nix and Hopf, 1983; Pomeranz et al., 1984; McDevitt et al., 1987; Beveridge and Politis, 1988; Politis et al., 1988; Kerns et al., 1991; Pomeranz and Campbell, 1993; Chen et al., 2001; Inoue et al., 2003; Mendonça et al., 2003). Transcutaneous electrical nerve stimulation (TENS) is a very simple, practical, low-cost and non-invasive means to provide therapeutic electrical stimulation (Sluka and Walsh, 2003). It uses biphasic and balanced pulses, with short width (about 150 μ s) and frequencies ranging from 2 to 150 Hz. Biphasic pulses are not commonly used to induce peripheral nerve regeneration because they do not have electrophoretic effects, as opposed to monophasic currents. The electrophoretic effects attributed to monophasic currents are thought to have a beneficial effect because they can provide orientation to cell membrane proteins toward the cathode, creating an "electric cue" for regeneration (McCaig et al., 1994). Nevertheless, positive results have been demonstrated with the use of biphasic currents, such as spreading of fibers in the saphenous nerve (Pomeranz et al., 1984), increases in regeneration speed and precision, expression of regeneration-associated genes, brain-derived neurotrophic factor, tyrosine kinase B receptor, α 1-tubulin and growth-associated protein-43, and reduction in neurofilament expression (Al-Majed et al., 2000a; 2000b; Brushart et al., 2002; Al-Majed et al., 2004).

Previous studies have assessed the influence of TENS on regeneration of tissues such as tendons (Bursens et al., 2003; 2005), skin (Kaada and Emru, 1988; Kjartansson et al., 1988; Khalil and Merhi, 2000; Lievano et al., 2003), and bone (Kahn, 1982), with varied results. The effects of TENS on nervous system

regeneration, however, remain to be unequivocally demonstrated. This modality has been associated with improvement of blood flow (de Vries et al., 2007; Sandberg et al., 2007) or collagen synthesis (Bursens et al., 2005). However, electrical current amplitudes above 1 mA are frequently used to overcome skin impedance and reach deep tissues. These amplitudes may be associated with decreased ATP concentrations (Cheng et al., 1982) and could lead to inhibition of regeneration.

Also, TENS is usually employed to control neuropathic pain (Leem et al., 1995; Hanai, 2000; Nam et al., 2001; Cheing and Luk, 2005; Somers and Clemente, 2006), which is often associated with peripheral nerve lesions and sometimes WD (Latinovic et al., 2006). TENS analgesic effects are related to the release of endogenous opioids (Sluka and Walsh, 2003); this is related to another controversy on its use to improve nerve regeneration because chronic opioid exposure may be associated with tolerance and inhibition of various steps of the peripheral nerve restoration process (Smith and Hui, 1973; Sinatra and Ford, 1979; Sinatra et al., 1979; Zeng et al., 2007).

Because we could find no reports on the influence of TENS on peripheral nerve regeneration, this study was performed as an exploratory approach, to assess the influence of two different TENS protocols on peripheral nerve regeneration in mice, using the sciatic crush model. Animals were treated 30 min a day, 5 days a week, for 5 weeks, and nerve regeneration was assessed by functional, morphological, and histomorphometric analyses.

Materials and Methods

We used 15 male Swiss mice (*Mus musculus*) from our animal facility, weighing 35–45 g. All procedures were approved by the Committee for Ethics in Animal Experimentation of the Fundação Bahiana para Desenvolvimento das Ciências, Salvador, Brazil. The animals were housed in individual cages with food and water *ad libitum* and a 12:12 h light/dark cycle.

Surgical procedures

Animals were deeply anesthetized with ketamine (0.1 mL/mg) and xylazine (0.2 mL/mg) and then submitted to asepsis and trichotomy of the right gluteus region. After a longitudinal incision, the sciatic nerve was exposed, isolated from the adjacent tissues, and crushed 1 cm from the spinal cord using a nonserrated needle holder, maintained on the first lock for 30 s. Muscle and skin were then sutured by layers using 4.0 suture (Ethicon).

Electrical stimulation

Electrical stimulation was initiated 4 days after surgery to avoid interference of the electrodes in preventing initial scar tissue formation. For the stimulation, the animals were lightly anesthetized with halotane and immobilized on a special apparatus. Electrical stimulation was provided using a clinical biphasic pulse generator (TENS vif 962, QUARK Medical), previously calibrated for the study. As the interface between the apparatus and the skin, we used two square silicon rubber electrodes, soaked with a special gel for electrostimulation, 1.5 cm² in area, positioned longitudinally to the incision. The distance between them was 2 cm. Electrostimulation parameters were based on those reported to generate analgesia (*Low and Reed, 2001; Nelson et al., 2003*).

The animals were divided into three groups according to the procedure to be used:

- (1) high-frequency TENS (high TENS): 100 Hz frequency, 80- μ s pulse width, in a continuous pattern, with amplitude immediately below motor threshold ($n = 5$);
- (2) low-frequency TENS (low TENS): 4 Hz frequency, 240- μ s pulse width, modulated in 4 Hz bursts, with amplitude exactly on the motor threshold, where visible contractions should be observed ($n = 5$);
- (3) control: animals submitted to the same anesthesia protocol but without stimulation ($n = 5$).

Animals were stimulated for 5 weeks, as this period of stimulation is sufficient to allow recovery from crush lesions in mice (*Baptista et al., 2007*).

Functional assessment

On the previous day and on days 7, 14, 21, 28, and 35 postlesion, the animals were evaluated to obtain two footprint parameters: the distance between the first and the fifth toes, or toe spread (TS) and the distance between the tip of the third toe and the most posterior part of the foot in contact with the ground, or print length (PL). These values were used to obtain the Static Sciatic Index for the mouse (SSIm).

The SSIm was obtained with a previously described protocol (*Baptista et al., 2007*). Briefly, animals were placed in an acrylic corridor (48 \times 4.5 cm) with a mirror placed underneath the apparatus at an angle of 45°. A 50W lamp, placed longitudinally to the floor, illuminated the corridor. The animal's cage was placed at the end of the corridor to induce it to walk in this direction, and before they entered the cage, the corridor was closed. When the animals stopped, three photos were taken with a Web Cam (Drop Cam 100, Go Tec), positioned 2.5 cm from the mirror. The

means for the footprint parameters were assessed with image analysis software (Image J, National Institutes of Health), calibrated with a scanned caliper. The TS and PL were estimated and generated the TS factor and PL factor (factor = experimental value – normal value/normal value) that were used in the formula:

$$SSIm = 101.3 \times TSF - 54.03 \times PLF - 9.5$$

In the SSIm, a value of 0 corresponds to normal function and a value of –100 corresponds to complete loss of function.

Histomorphometric assessment

One day after the last functional analysis, on day 35 postlesion, the animals were deeply anesthetized and euthanized by transcardiac perfusion with fixative solution (4% paraformaldehyde and 2% glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer, pH 7.4, 25 mL/animal). The sciatic nerves ipsilateral to the lesion were harvested, and a 2-mm segment, 3 mm distal from the lesion site was dissected. Contralateral nerves were also dissected, and a 2-mm segment collected from the equivalent portion of the lesioned nerve.

The segments were postfixed, dehydrated in increasing concentrations of acetone (30–100%), osmicated, infiltrated, and plastic embedded. Transverse sections of 0.5 μ m (semithin) and 70 nm (ultrathin) were obtained using an ultramicrotome (Ultracut, Reichert-Jung). The semithin sections were stained with 1% toluidine blue. Images were acquired on a light microscope (Olympus CX41) connected to a digital camera (Evolution Color PL 1642, Media Cybernetics). A \times 1,000 magnification was used to assess the general morphological condition of the nerves and the number and area of blood vessels.

For the ultrastructural analysis, 70-nm sections were obtained and contrasted with 1% uranyl acetate and lead citrate and observed through a transmission electron microscope (Zeiss EM 109) equipped with an image acquisition system (MegaView II, Analysis-Imaging-System). A magnification of \times 7,000 was used for morphological assessment and measurement of the densities and diameters of myelinated and nonmyelinated fibers, as well as the number of Schwann cell nuclei. Densities were calculated by dividing the number of cells by the total area of 10 systematically chosen fields. Using these measurements, G ratios (axon diameter/fiber diameter) were also obtained.

Statistical analysis

The independent variable for all groups was the use of high- and low TENS. Dependent variables were

derived from functional analysis and histomorphometry. In functional analysis using the SSIm, paired (intra-group, between days) and unpaired (between groups on each day) comparisons were made. For histomorphometric analysis, we considered as dependent variables the number and area of blood vessels (obtained at $\times 1,000$ magnification), density and diameter of myelinated fibers stratified by diameter on 0–2, 2–6, and 6–12 μm , density and diameter of nonmyelinated fibers, density of Schwann cell nuclei and G ratio (obtained at $\times 7,000$ magnification), stratified in ranges of 0.1–0.4, 0.4–0.5, 0.5–0.6, 0.6–0.7, and 0.7–0.9. When ranges were used, the lowest portions were always included and the highest portions excluded (e.g., the 0–2 range includes 0 through 1.99, excluding 2). Paired inferences were done by the Friedman nonparametric test and unpaired inferences by the Kruskal-Wallis nonparametric test, associated with the Student-Newmann-Keuls post-hoc analysis, when necessary. The CI was 95%, with an accepted alpha value of 5% ($p < 0.05$). The analyses were carried out using the BioEstat 4.0 statistical software (Mamirauá).

RESULTS

Functional assessment

There were no signs of motor impairment on the last day of the study. The three groups exhibited a similar pattern of function throughout the assessment period, as shown by the SSIm. The first week represented the functional nadir, with gradual recovery in all groups (control, high-, and low TENS). Paired analysis with Friedman nonparametric test showed significant differences among weeks for the control ($F_r = 15.63$, $p < 0.01$), high TENS ($F_r = 18.49$, $p < 0.005$), and low TENS ($F_r = 19.06$, $p < 0.005$) (Fig. 1).

Unpaired analysis comparing the three groups weekly by the Kruskal-Wallis nonparametric test showed no differences.

Morphological assessment

Morphological changes were assessed using images acquired by both light and electron microscopy. Viewed by light microscopy, crushed and electrically stimulated nerves generally showed larger endoneurial spaces and smaller fibers compared with normal nerves. Fibers with dark axoplasm could also be observed in these nerves (Fig. 2A). Only one nerve stimulated with low TENS showed signs of edema (Fig. 2B). Two of the control nerves appeared similar to normal nerves, where fibers were more compacted, with larger diameters and less endoneurial space (Figs. 2C and 2D).

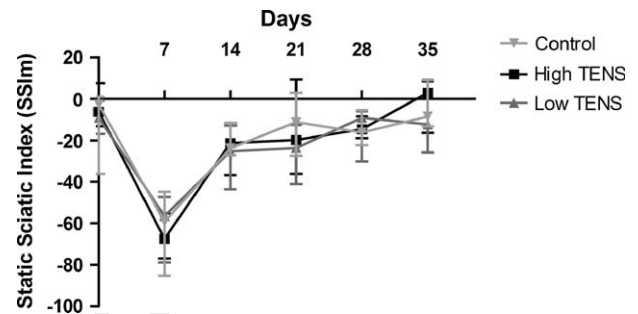


Figure 1. Static Sciatic Index for the mouse. Graph shows a similar pattern of locomotor function for the control (crush lesion, without stimulation), high-TENS, and low-TENS (crush lesion and stimulation) groups during the 35-day experimental period. Locomotor function was worse in the first week postlesion on the three groups and came back to normal on the second week. Data are presented as median and 25–75 quartiles.

Qualitative analysis of electromicrographs was consistent with the results previously described for the normal nerves as seen by light microscopy. The nerves treated with high TENS had less myelin in their fibers, but the normal axonal aspect was maintained. In these nerves, the regenerative clusters were more easily identifiable (Fig. 3A). Low-TENS and control nerves occasionally contained lipid inclusions that could not be seen in high-TENS or normal nerves (Figs. 3B and 3C). Fig. 3C shows one of the control nerves, with a normal pattern of fiber morphology. Normal nerves always had less endoneurial space and larger and more myelinated fibers (Fig. 3D).

Histomorphometry

Morphometric analysis was performed using both light and electron microscopy. The number and area of blood vessels assessed at $\times 1,000$ magnification did not differ between groups ($p > 0.05$). Myelinated fibers, assessed at $\times 7,000$ magnification, were stratified by diameter in 0–2, 2–6, and 6–12 μm , and the majority of them were in the 2–6 μm diameter range in all groups. In the 6–12 μm range, stimulated nerves had significantly fewer fibers than the normal or control nerves. Schwann cell nuclei density was greater in high- and low-TENS nerves (Table 1).

Regarding fiber diameter, high-TENS and control nerves showed significantly smaller fibers than normal nerves, again in the 6–12 μm range (Table 2). This pattern was not observed for axon diameters (Table 3), indicating less myelin content in the high-TENS and control groups compared with normal nerves. Low TENS reached normal values of fiber and axon diameters, indicating normal myelination (Tables 2 and 3).

G ratio distribution was also different between groups. Normal, control, and low-TENS nerves had

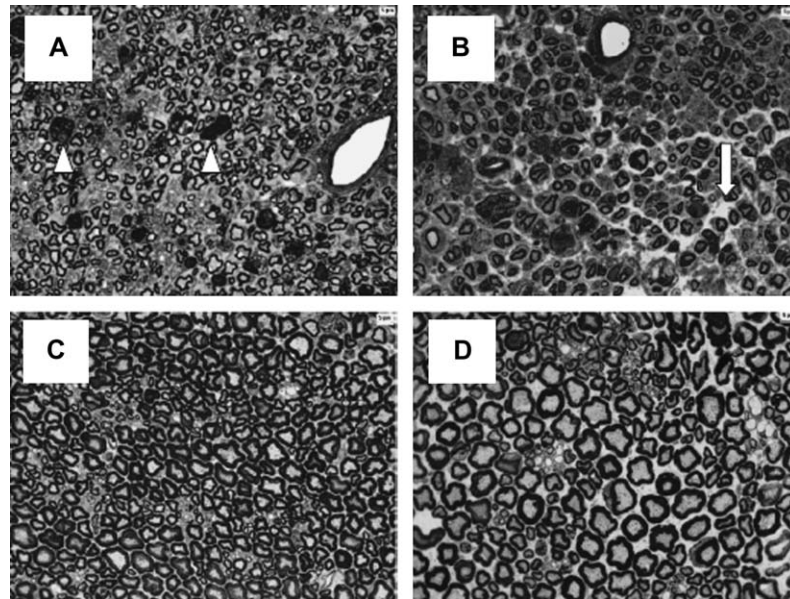


Figure 2. Semithin transverse sciatic nerve section. (A) High-TENS nerve (crush and 100 Hz stimulation) presenting small diameter myelinated fibers. Some of them present dark axoplasm (arrow heads), may be representing fibers which are still in the process of axon degeneration. (B) Note the edema (arrow) found in a low TENS (nerve crush lesion and 4 Hz stimulation) that was not seen on the others. Stimulated nerves (A and B) always presented smaller fibers than control (crush lesion, without stimulation) or normal nerves (no lesion or stimulation) (C and D). (C) A control nerve with some fibers with normal morphological aspect. (D) Normal nerve with less endoneurial space and fibers with a more compacted distribution. Magnification $\times 1,000$.

the majority of fibers in the range of 0.5–0.6. High-TENS nerves differed from the others showing a rightward deviation with its peak in the 0.6–0.7 range. This confirms the supposition that high TENS led to less myelin content. Control nerves also showed an altered pattern, with a significantly higher concentration of fibers in the 0.7–0.9 range (Fig. 4).

Discussion

In our study, the morphological aspect of stimulated nerve groups was generally worse than crushed but not stimulated, and normal groups. Electrically stimulated nerves showed signs of compromised regeneration such as edema, reduced fiber compaction, more regenerative clusters, and the presence of lipid inclusions (Figs. 2 and 3). The reduction in number of large myelinated fibers (6–12 μm diameter) and increasing in the number of Schwann cell nuclei (Table 1), associated to both types of electrical stimulation, can be related to a delay in the regeneration process. The G quotient indicates the ratio between axon diameter and fiber diameter, and high G ratios are normally associated with low myelin content. High-TENS nerves presented fibers with a G ratio peak in 0.6–0.7 (Fig. 4), differing from the other

groups, that had the peak in the 0.5–0.6 range, probably indicating inhibited myelin formation. Despite the negative effect of low TENS on the number of large fibers, myelination reached normal levels (Tables 2 and 3). Additionally, electrical stimulation did not interfere significantly on the area or number of blood vessels, showing no influence on structural revascularization (data not shown). Although electrical stimulation was associated with morphological and morphometric abnormalities, these did not significantly impact gait (Fig. 1). In summary, our findings point to a negative influence of TENS on peripheral nerve regeneration, most prominently of high TENS.

The lack of a direct relationship between morphological data and functional studies in laboratory animals, as observed in this study, has also been reported by other (*de Medinaceli, 1995*). Morphological or nerve conduction assessment cannot be as specific as gait analysis to assess proper reinnervation after traumatic nerve lesions (*de Medinaceli et al., 1983; Goldberg et al., 1984*) because these kinds of assessment do not address overall nerve function. Our study showed no significant differences in paw function between groups (Fig. 1), indicating that despite the worse morphological aspect of nerve regeneration after electrical stimulation, there were no negative effects on sensory-motor function.

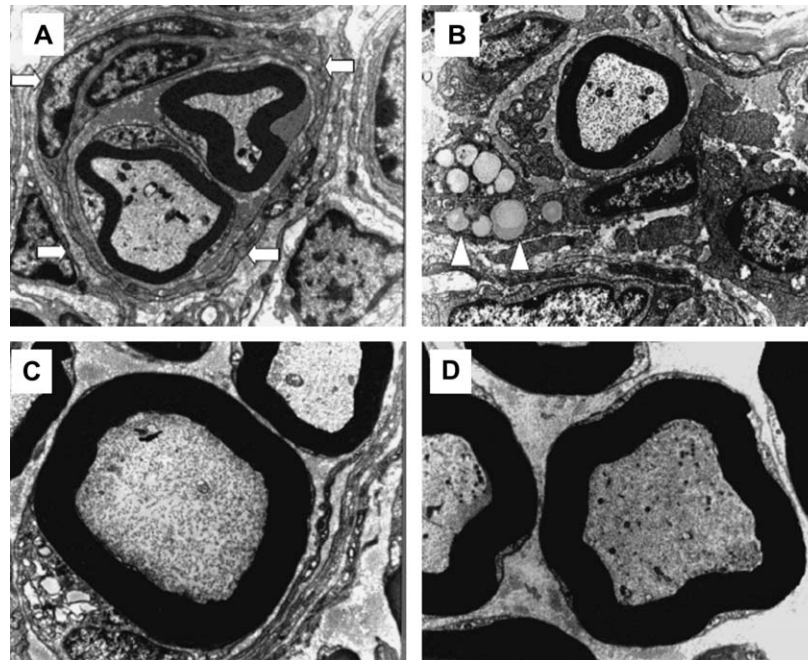


Figure 3. Ultrathin transverse sciatic nerve sections. (A) High-TENS nerve (crush lesion and 100 Hz stimulation) showing a regenerative cluster (arrows) and small diameter myelinated fibers. (B) Low-TENS nerve (crush lesion and 4 Hz stimulation), with an aspect similar to high-TENS nerves, also presenting regenerative clusters and some lipidic inclusions (arrow head). (C) Control nerve (crush lesion, without stimulation) where larger and more myelinated fiber than stimulated nerves could be observed. (D) Normal nerve (no lesion or stimulation) presenting larger and more myelinated fibers. Magnification $\times 7,000$.

Transcutaneous electrical stimulation has to overcome the high cutaneous electrical impedance, frequently using amplitudes exceeding by $\times 10$ to $\times 10,000$ those used with percutaneous or implanted electrodes. In our study, the combination of pulse amplitude of 5 mA or above and pulse width higher than 80 μ s may be an important factor causing delay in regeneration. Cheng *et al.* (1982) found that at lower levels (1 mA), electric current inhibited ATP synthesis in cell cultures. Thus, low ATP concentrations may have led to impairment of the normal regeneration process. Aydin *et al.* (2006) submitted rats with a peroneal crush lesion to a whole-body exposure of a 50-Hz biphasic electrical field with an estimated induced electrical field of 10 mV/m and found a weak

inhibition of regeneration expressed by morphological defects that did not interfere with gait function. It is difficult to estimate the strength of the electrical field when using the mouse model because the dielectric constant of mice is not yet known. However, considering that a field magnitude of 10 mV/m would be the minimal induced field necessary to overcome the basic endogenous noise in cellular membranes and produce physical and biological effects (Astumian *et al.*, 1995; Aydin *et al.*, 2006), even very low electrical field intensities could cause negative biological effects on regeneration. Chen *et al.* (2001) also found adverse detrimental consequences of electrical fields on peripheral nerve regeneration using percutaneous electrodes and a 1-mA monophasic current. In their

Table 1. Fiber and Schwann cell nuclei density.

Group	n	Density (mm ²)				
		NMF	MF (0–2 μ m)	MF (2–6 μ m)	MF (6–12 μ m)	SCN
Normal	15	2,590 (1,192–3,372)	1,176 (588–1,474)	15,294 (12,353–17,353)	5,294 (4,412–5,882)	0 (0–0)
Control	5	1,564 (1,205–1,615)	588 (588–1,176)	14,118 (12,353–14,706)	3,529 (2,941–5,882)	588 (0–588)
High TENS	5	1,513 (1,282–2,538)	1,176 (1,176–1,176)	17,059 (14,706–18,235)	1,176 (588–1,765) † † † † †	588 (588–588) † † †
Low TENS	5	1,179 (1,103–1,205)	1,176 (0–2,353)	16,471 (15,294–18,824)	588 (588–1,765) § * ****	588 (294–588) § *

† High TENS \times control.

‡ High TENS \times normal.

§ Low TENS \times control.

|| Low TENS \times normal.

§ * p < 0.05; ** p < 0.01; **** p < 0.001 (Kruskal-Wallis + Student-Newmann-Keuls)

Table 2. Fiber diameter.

Group	n	Fiber diameter			
		NMF	MF (0–2 μ m)	MF (2–6 μ m)	MF (6–12 μ m)
Normal	15	0.59 (0.56–0.61)	1.71 (1.48–1.83)	3.84 (3.63–3.97)	7.43 (7.08–7.72)
Control	5	0.61 (0.54–0.63)	1.80 (1.63–1.84)	4.12 (3.24–4.16)	6.50 (6.31–7.01) ^{†*}
High TENS	5	0.58 (0.54–0.62)	1.58 (1.42–1.63)	3.66 (3.62–3.72)	6.57 (6.35–6.78) ^{†*}
Low TENS	5	0.63 (0.53–0.66)	1.86 (1.69–1.91)	3.59 (3.46–3.82)	6.88 (6.24–7.60)

[†]Control \times normal.

[‡]High TENS \times normal.

* $p < 0.05$ (Kruskal-Wallis + Student-Newmann-Keuls).

experiment, electrical stimulation inhibited the number of regenerating fibers crossing an experimental 10-mm gap, although the fibers that successfully crossed this barrier were morphologically more normal. These results suggest that electrical currents above 1 mA can have weak, but significant, effects on peripheral nerve regeneration, generally leading to inhibition of axon number and area or myelin fiber content, but insufficient to affect the function.

The effects of electrical fields on blood flow were reported to be associated with improvement in axon sprouting and nerve regeneration (McCaig et al., 2005). Low frequency can selectively stimulate sensory C fibers and enhance the expression of neuropeptides such as substance-P (SP), which in turn generates vasodilatation (Kjartansson et al., 1988; Kashiba and Ueda, 1991; Burssens et al., 2005). Low TENS is usually associated to rhythmic muscle contraction, which may also have positive circulatory effects (Dobsák et al., 2006). However, there is a recent evidence supporting effects of high-frequency TENS on blood flow as well. de Vries et al. (2007) demonstrated an improvement in the coronary circulation, attributed to an enhancement in coronary perfusion. In contrast, in our study, it was not possible to observe effects on intraneural blood flow, assessed by number and area of blood vessels, indicating perhaps a different behavior concerning to peripheral nerves. Although this method is not very sensitive, if one accepts the common statement that improvement in blood circulation is associated to enhancement of regeneration, TENS should have had positive and not negative effects, as shown. In addition, it

should be considered that the exposure to electric fields and consequent angiogenesis are not always positive, as they have also been associated with increased concentrations of reactive oxygen species (ROS) (Rosenspire et al., 2001; Sauer and Wartenberg, 2005) and DNA damage (Delimaris et al., 2006). These mechanisms may also explain the delay of regeneration observed in TENS-stimulated nerves.

The majority of TENS effects studied are related to pain control, with high-TENS analgesia been mediated by the activation of δ -opioid receptors and low TENS by μ -opioid receptors (Kalra et al., 2001; Sluka and Walsh, 2003). Sinatra and Ford (1979) demonstrated that chronic morphine use for 14 days led to delay of peripheral nerve regeneration, expressed by fewer axon profiles, decreased myelin debris removal, Schwann cell hypertrophy, and proliferation. Zeng et al. (2007) also showed that chronic morphine exposure, acting via μ -opioid receptors, improves regeneration of nonmyelinated fibers but inhibits regeneration of myelinated fibers after a sciatic crush lesion. This is in accordance with our results, given that nonmyelinated fibers were not affected by TENS (Table 1), but large diameter fibers were fewer and myelinated, especially in the high-TENS group. The poorer progress of high-TENS nerves, however, may not be explained by δ -opioid activation because it is associated with neurogenesis and neuroprotection in the mouse central nervous system (Zhang et al., 2002; Narita et al., 2006) and probably could have the same function on the peripheral nervous system. The key difference between our study and those showing that opioid receptor activation was successful in

Table 3. Myelinated axon diameter.

Group	n	Axon diameter		
		MA (0–2 μ m)	MA (2–6 μ m)	MA (6–12 μ m)
Normal	15	0.96 (0.77–1)	2.03 (1.91–2.14)	4.12 (3.98–4.45)
Control	5	1.07 (0.95–1.14)	1.94 (1.94–2.19)	4.48 (4.36–4.61)
High TENS	5	0.97 (0.87–1)	2.27 (2.19–2.33)	4.67 (4.31–4.85)
Low TENS	5	0.73 (0.70–0.91)	2.1 (2.01–2.18)	4.0 (3.82–4.46)

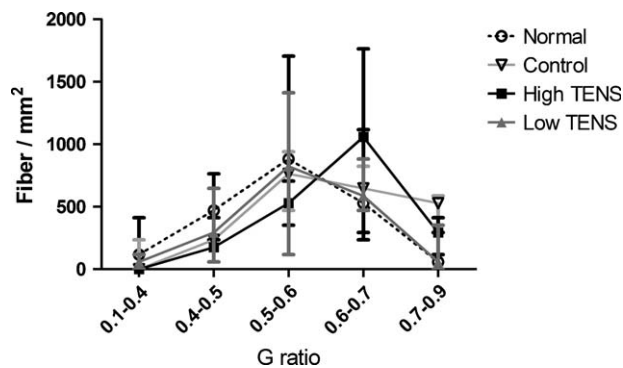


Figure 4. G ratio stratified by ranges. G ratio was obtained dividing axon diameter by fiber diameter. Higher portions of the G ratio ranges are include and lower portions excluded. Note that only high-TENS nerves (crush lesion and stimulation with 100 Hz) presented a peak of fiber density on the 0.6–0.7 range. The other nerves presented the peak on the 0.5–0.6 range. Data are presented as median and 25–75 quartiles.

improving nerve tissue regeneration was the prolonged time of use, which can lead to opioid tolerance. Chandran and Sluka (2003) showed that after repeated administration of high- and low TENS, 20 min a day, rats developed opioid tolerance on the fourth day of stimulation. Mao *et al.* (2002) demonstrated that morphine tolerance is mediated by the N-methyl-D-aspartate-caspase pathway and leads to spinal neural apoptosis. Therefore, prolonged use of TENS may have led to morphine tolerance and neurotoxic consequences for the cells involved in regeneration.

Curiously, drugs commonly used to inhibit opioid tolerance include SP, calcitonin gene-related peptide (CGRP), cholecystokinin (CCK), and NMDA selective antagonists (King *et al.*, 2005). After a peripheral nerve lesion, α and β CGRP and CCK are overexpressed (Saika *et al.*, 1991). CCK is upregulated with sustained administration of morphine (Zhou *et al.*, 1993; Stanfa *et al.*, 1994) or electroacupuncture (Fukazawa *et al.*, 2007), antagonizing morphine effects. It is also related to nerve regeneration through the improvement of nerve growth factor synthesis and CGRP concentrations (Manni *et al.*, 2000; 2001; Sanchez *et al.*, 2001). Consequently, overexpression of CCK, possibly associated with 35 days of TENS, could have had beneficial effects on nerve regeneration, balancing opioid tolerance neurotoxic effects. It remains to be demonstrated if TENS can really enhance these peptide concentrations and what parameters should be used to evoke its potential neuroprotection against opioid tolerance.

The present study was the first to assess the influence of TENS on peripheral nerve regeneration. The indication that TENS can be associated with

a delay in this process, although not sufficient to influence function, is very important in the clinical setting because this modality of electrical stimulation is widely used and often associated to no harmful or side effects. Future research should assess the influence of TENS on ATP concentrations, peripheral nerve blood circulation, and expression of ROS, as these factors may directly influence peripheral nerve regeneration. Also, the possibility that opioid tolerance developed by TENS can lead to delayed peripheral nerve regeneration can open a broad field of research on its appropriate use. TENS may have very different effects if used briefly or with frequency and amplitude variations, preventing opioid tolerance effects. Also, further studies can be performed on animal models to assess the consequences of opioid or colestykinine pharmacological blockade on regeneration. Case-control studies can be performed including patients where nerve conduction tests are available and addressing the influence of different TENS modalities on peripheral nerve regeneration. Meanwhile, the use of TENS in patients with these characteristics should be reevaluated.

Acknowledgements

This study was supported by FBDC, FIOCRUZ, CNPq, FAPESB, and FAPERJ. We thank Eridã Almeida for special support with animal care, and Quark Produtos Médicos for supplying electrostimulation equipment.

References

- Al-Majed A, Neumann C, Brushart T, Gordon T (2000a). Brief electrical stimulation promotes the speed and accuracy of motor axonal regeneration. *J Neurosci* 20:2602–2608.
- Al-Majed A, Brushart T, Gordon T (2000b). Electrical stimulation accelerates and increases expression of BDNF and trkB mRNA in regenerating rat femoral motoneurons. *Eur J Neurosci* 12:4381–4390.
- Al-Majed A, Tam S, Gordon T (2004). Electrical stimulation accelerates and enhances expression of regeneration-associated genes in regenerating rat femoral motoneurons. *Cell Mol Neurobiol* 24:379–402.
- Astumian RD, Weaver JC, Adari RK (1995). Rectification and signal averaging of weak electric fields by biological cell. *PNAS* 92:3740–3743.
- Aydin MA, Comlekci S, Ozguner M, Cesur G, Nasir S, Aydin ZD (2006). The influence of continuous exposure to 50 Hz electric field on nerve regeneration in a rat peroneal nerve crush injury model. *Bioelectromagnetics* 27:401–413.
- Baptista A, Gomes J, Oliveira J, Santos S, Vannier-Santos M, Martinez A (2007). A new approach to assess function after sciatic nerve lesion in the mouse – adaptation of the sciatic static index. *J Neurosci Methods* 161:259–264.

- Beveridge J, Politis M (1988). Use of exogenous electric current in the treatment of delayed lesions in peripheral nerves. *Plast Reconstr Surg* 82:573–579.
- Brushart T, Hoffman P, Royall R, Murinson B, Witzel C, Gordon T (2002). Electrical stimulation promotes motoneuron regeneration without increasing its speed or conditioning the neuron. *J Neurosci* 22:6631–6638.
- Burssens P, Forsyth R, Steyaert A, Van Ovost E, Praet M, Verdonk R (2003). Influence of burst TENS stimulation on the healing of Achilles Tendon in man. *Acta Orthop Belg* 69:528–532.
- Burssens P, Forsyth R, Steyaert A, Van Ovost E, Praet M, Verdonk R (2005). Influence of burst TENS stimulation on collagen formation after Achilles tendon suture in man. A histological evaluation with Movat's pentachrome stain. *Acta Orthop Belg* 71:342–346.
- Chandran P, Sluka KA (2003). Development of opioid tolerance with repeated transcutaneous electrical nerve stimulation administration. *Pain* 102:195–201.
- Chen Y, Hu C, Hsieh C, Lin J, Tsai C, Chen T, Yao C (2001). Effects of percutaneous electrical stimulation on peripheral nerve regeneration using silicone rubber chambers. *J Biomed Mater Res* 57:541–549.
- Cheing GL, Luk ML (2005). Transcutaneous electrical nerve stimulation for neuropathic pain. *J Hand Surg [Br]* 30:50–55.
- Cheng N, Van Hoof H, Bockx E, Hoogmartens MJ, Mulier JC, De Dijcker FJ, Sansen WM, De Loecker W (1982). The effects of electric currents on ATP generation, protein synthesis, and membrane transport of rat skin. *Clin Orthop Relat Res* 171:264–272.
- de Medinaceli L (1995). Interpreting nerve morphometry after experimental traumatic lesions. *J Neurosci Meth* 58:29–37.
- de Medinaceli L, Freed WJ, Wyatt RJ (1983). Peripheral nerve reconnection: improvement of long term functional effects under stimulated clinical conditions in the rat. *Exp Neurol* 81:488–496.
- de Vries J, Anthonio, RL, DeJongste, MJL, Jessurun GA, Tan ES, de Smet BJGL, van den Heuvel, AFM, Staal MJ, Zijlstra F (2007). The effect of electrical neurostimulation on collateral perfusion during acute coronary occlusion. *BMC Cardiovasc Disord* 27:7–18.
- Delimaris J, Tsilimigaki S, Mesini-Nicolaki N, Ziros E, Piperakis SM (2006). Effects of pulsed electric fields on DNA of human lymphocytes. *Cell Biol Toxicol* 22:409–415.
- Dobsák P, Nováková M, Siegelová J, Fiser B, Vítovec J, Nagasaka M, Kohzuki M, Yambe T, Nitta S, Eicher JC, Wolf JE, Imachi K (2006). Low-frequency electrical stimulation increases muscle strength and improves blood supply in patients with chronic heart failure. *Circ J* 70:75–82.
- Fukazawa Y, Maeda T, Kiguchi N, Tohya K, Kimura M, Kishioka S (2007). Activation of spinal cholecystokinin and neurokinin-1 receptors is associated with the attenuation of intrathecal morphine analgesia following electroacupuncture stimulation in rats. *J Pharm Sci* 104:159–166.
- Goldberg NH, Deshpande SS, May CS, Toy FK, Smoot RT, Meshul CK, Albuquerque EX (1984). Disparity between neurophysiologic measurements and clinical reality following peripheral nerve transection and microneurography. *Surg Forum* 35:608–610.
- Gordon T, Sulaiman O, Boyd J (2003). Experimental strategies to promote functional recovery after peripheral nerve injuries. *J Peripher Nerv Syst* 8:236–250.
- Griffin, J, George E, Hsieh S, Glass J (1995). Axonal Degeneration and Disorders of the Axonal Cytoskeleton. In: *The Axon*. Waxman S, Kocsis J, Stys P (Eds). Oxford University Press, New York, pp 375–390.
- Hanai F (2000). Effect of electrical stimulation of peripheral nerves on neuropathic pain. *Spine* 25:1886–1892.
- Ide C (1996). Peripheral nerve regeneration. *Neurosci Res* 25:101–121.
- Inoue M, Hojo T, Yano T, Katisumi Y (2003). The effects of electroacupuncture on peripheral nerve regeneration in rats. *Acupunct Med* 21:9–17.
- Kaada B, Emru M (1988). Promoted healing of leprosy ulcers by transcutaneous nerve stimulation. *Acupunct Electrother Res* 13:165–176.
- Kahn, J (1982). Transcutaneous electrical nerve stimulation for nonunited fractures; a clinical report. *Phys Ther* 62:840–844.
- Kalra A, Urban MO, Sluka KA (2001). Blockade of opioid receptors in rostral ventral medulla prevents antihyperalgesia produced by transcutaneous electrical stimulation (TENS). *J Pharmacol Exp Ther* 298:257–263.
- Kashiba H, Ueda Y (1991). Acupuncture to the skin induces release of Substance P and calcitonin gene-related peptide from peripheral nerve terminals of primary sensory neurons in the rat. *Am J Chin Med* 19:189–197.
- Kerns J, Fakhouri A, Weinrib H, Freeman J (1991). Electrical stimulation of nerve regeneration in the rat: the early effects evaluated by a vibrating probe and electron microscopy. *Neuroscience* 40:93–107.
- Khalil Z, Merhi M (2000). Effects of aging on neurogenic vasodilator responses evoked by transcutaneous electrical nerve stimulation: relevance to wound healing. *J Gerontol Series A* 55:257–263.
- King T, Ossipov MH, Vanderah TW, Porreca F, Lai J (2005). Is paradoxical pain induced by sustained opioid exposure an underlying mechanism of opioid antinociceptive tolerance? *Neurosignals* 14:194.
- Kjartansson J, Lundeberg T, Samuelson EU, Dalsgaard J (1988). Transcutaneous electrical nerve stimulation (TENS) increases survival of ischemic musculocutaneous flaps. *Acta Physiol Scand* 134:95–99.
- Latinovic R, Gulliford M, Hughes R (2006). Incidence of common compressive neuropathies in primary care. *J Neurol Neurosurg Psychiatr* 77:263–265.
- Leem J, Park E, Paik K (1995). Electrophysiological evidence for the antinociceptive effect of transcutaneous electrical stimulation on mechanically evoked responsiveness of dorsal horn neurons in neuropathic rats. *Neurosci Lett* 192:197–200.
- Liebano RC, Ferreira LM, Neto MS (2003). Experimental model for transcutaneous electrical nerve stimulation on ischemic random skin flap in rats. *Acta Cir Bras* 18:54–59.
- Low J, Reed A (2001). Eletrofisiologia clínica – eletroterapia e teste eletrofisiológico. Manole, São Paulo, pp 256–258.
- Manni L, Lundeberg T, Tirassa P, Aloe L (2000). Cholecystokinin-8 enhances nerve growth factor synthesis and promotes recovery of capsaicin-induced sensory deficit. *Br J Pharmacol* 129:744–750.
- Manni L, Aloe L, Tirassa P, Finn A, Lundeberg T (2001). Cholecystokinin-8 promotes recovery of sympathectomy induced by 6-hydroxydopamine in adult mice. *Neuroreport* 12:1621–1627.

- Mao J, Sung B, Ji RR, Lim G (2002). Neuronal apoptosis associated with morphine tolerance: Evidence for an opioid-induced neurotoxic mechanism. *J Neurosci* 22:7650–7661.
- McCaig CD, Allan DX, Erskine L, Rajnicek AM, Stewart R (1994). Growing nerves in an electric field. *Neuroprotocols* 4:134–141.
- McCaig CD, Rajnicek AM, Song B, Zhao M (2005). Controlling cell behavior electrically: current views and future potential. *Physiol Rev* 85:943–978.
- McDevitt L, Fortner P, Pomeranz B (1987). Application of weak electric field to the hindpaw enhances sciatic motor nerve regeneration in the adult rat. *Brain Res* 416:308–314.
- Mendonça C, Barbieri C, Mazzer N (2003). Directly applied low intensity direct current enhances peripheral nerve regeneration in rats. *J Neurosci Meth* 129:183–190.
- Nam T, Choi Y, Yeon D, Leem J, Paik K (2001). Differential antinociceptive effect of transcutaneous electrical stimulation on pain behavior sensitive or insensitive to phentolamine in neuropathic rats. *Neurosci Lett* 301:17–20.
- Narita M, Kuzumaki N, Miyatake M, Sato F, Wachi H, Seyama Y, Suzuki T (2006). Role of delta-opioid receptor function in neurogenesis and neuroprotection. *J Neurochem Jun* 97:1494–1505.
- Nelson RM, Hayes KW, Currier DP (2003). *Eletroterapia Clínica*. Manole, São Paulo, pp 307–310.
- Nix W, Hopf H (1983). Electrical stimulation of regenerating nerve and its effect on motor recovery. *Brain Res* 272:21–25.
- Politis M, Zanakis M, Albala B (1988). Facilitated regeneration in rat peripheral nervous system using applied electric fields. *J Trauma* 28:1375–1381.
- Pomeranz B, Campbell J (1993). Weak electric current accelerates motoneuron regeneration in the sciatic nerve of ten-month-old rats. *Brain Res* 603:271–278.
- Pomeranz B, Mullen M, Markus H (1984). Effect of applied electrical fields on sprouting of intact saphenous nerve in adult rat. *Brain Res* 303:331–336.
- Rosenspire AJ, Kindzelskii AL, Petty HR (2001). Pulsed DC electric fields couple to natural NAD(P)H oscillations in HT-1080 fibrosarcoma cells. *J Cell Sci Apr* 114:1515–1520.
- Saika T, Senba E, Noguchi K, Sato M, Kubo T, Matsunaga T, Tohyama M (1991). Changes in expression of peptides in rat facial motoneurons after facial nerve crushing and resection. *Brain Res Mol Brain Res Oct* 11:187–196.
- Sandberg ML, Sandberg MK, Dahl J (2007). Blood flow changes in the trapezius and overlying skin following transcutaneous electrical nerve stimulation. *Phys Ther* 87:1047–1055.
- Sauer H, Wartenberg M (2005). Reactive oxygen species as signaling molecules in cardiovascular differentiation of embryonic stem cells and tumor-induced angiogenesis. *Antioxid Redox Signal* 7:1423–1434.
- Sanchez A, Bilinski M, Villar MJ, Tramezzaini JH (2001). Coexistence of neuropeptides and their possible relation to neuritic regeneration in primary cultures of magnocellular neurons isolated from adult rat supraoptic nuclei. *Histochem J* 33:121–128.
- Sinatra RS, Ford DH, Rhines RK (1979). The effects of acute morphine treatment on the incorporation of [3H]L-lysine by normal and regenerating facial nucleus neurons. *Brain Res* 171:307–317.
- Sinatra RS, Ford DH (1979). The effects of acute and chronic morphine treatment on the process of facial nerve regeneration. *Brain Res* 175:315–325.
- Sluka K, Walsh D (2003). Transcutaneous electrical nerve stimulation: basic science mechanisms and clinical effectiveness. *J Pain* 4:109–121.
- Smith AA, Hui F (1973). Inhibition of neurotrophic activity in salamanders treated with opioids. *Exp Neurol* 39:36–43.
- Somers DL, Clemente FR (1998). High-frequency transcutaneous electrical nerve stimulation alters thermal but not mechanical allodynia following chronic constriction injury of the rat sciatic nerve. *Arch Phys Med Rehabil* 79:1370–1376. 5
- Somers DL, Clemente FR (2003). The relationship between dorsal horn neurotransmitter content and allodynia in neuropathic rats treated with high-frequency transcutaneous electric nerve stimulation. *Arch Phys Med Rehabil* 84:1575–1583. 6
- Somers DL, Clemente FR (2006). Transcutaneous electrical nerve stimulation for the management of neuropathic pain: the effects of frequency and electrode position on prevention of allodynia in a rat model of complex regional pain syndrome type II. *Phys Ther* 86:698–709.
- Stanfa L, Dickenson A, Xu, XJ, Wiesenfeld-Hallin Z (1994). Cholecystokinin and morphine analgesia: variations on a theme. *Trends Pharmacol Sci* 15:65–66.
- Stoll G, Müller H (1999). Nerve injury, axonal degeneration and neural regeneration: basic insights. *Brain Pathol* 9:313–325.
- Zeng YS, Nie JH, Zhang W, Chen SJ, Wu W (2007). Morphine acts via μ -opioid receptors to enhance spinal regeneration and synaptic reconstruction of primary afferent fibers injured by sciatic nerve crush. *Brain Res* 1130:108–113.
- Zhang J, Gibney GT, Zhao P, Xia Y (2002). Neuroprotective role of delta-opioid receptors in cortical neurons. *Am J Physiol Cell Physiol* 282:1225–1234.
- Zhou Y, Sun YH, Zhang ZW, Han JS (1993). Increased release of immunoreactive cholecystokinin octapeptide by morphine and potentiation of μ -opioid analgesia by CCKB receptor antagonist L-365, 260 in rat spinal cord. *Eur J Pharmacol* 234:147–154.

Author Query Form

Journal: Journal of the Peripheral Nervous System

Article : jns_160

Dear Author,

During the copy-editing of your paper, the following queries arose. Please respond to these by marking up your proofs with the necessary changes/additions. Please write your answers on the query sheet if there is insufficient space on the page proofs. Please write clearly and follow the conventions shown on the attached corrections sheet. If returning the proof by fax do not write too close to the paper's edge. Please remember that illegible mark-ups may delay publication.

Many thanks for your assistance.

Query No.	Query	Remark
1	Please provide the academic degrees of the corresponding author.	
2	Please spell out "TSF" and "PLF" (in equation) in the sentence "The TS and PL were"	
3	Note that the citation "Sauer et al. (2005)" has been changed to "Sauer and Wartenberg (2005)" as per the list. Please check.	
4	Note that the year "1979b" in Sinatra and Ford (1979b) has been changed to "1979" as per the list. Please check.	
5	Note that Somers and Clemente (1998) is not cited in the text. Please provide in-text citation or delete from the list.	
6	Note that Somers and Clemente (2003) is not cited in the text. Please provide in-text citation or delete from the list.	
7	Please spell out "NMF," "MF," and "SCN" in the footnote of Table 1.	
8	Please clarify whether the footnote designator "*****" can be changed to "****" in the footnote and body of Table 1.	
9	Please spell out "MA" in the footnote of Table 3.	
10	Please clarify what "de" refers to in the caption of Figure 2.	

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)