



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**

**FACULDADE DE MEDICINA DA BAHIA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
EM MEDICINA E SAÚDE**



**DIANA CAVALCANTE MIRANDA**

**A FREQUÊNCIA E O PERÍODO DA ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA  
NERVOSA TRANSCUTÂNEA (TENS) É DETERMINANTE PARA O  
SEU EFEITO REGENERATIVO**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Salvador**

**2012**

**DIANA CAVALCANTE MIRANDA**

**A FREQUÊNCIA E O PERÍODO DA ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA  
NERVOSA TRANSCUTÂNEA (TENS) É DETERMINANTE PARA O  
SEU EFEITO REGENERATIVO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Medicina e Saúde, da Faculdade de Medicina da Bahia, Universidade Federal da Bahia, como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Medicina e Saúde.

Orientador: Prof. Dr<sup>o</sup>. Abrahão Fontes Baptista.

Co-orientador: Prof.Dra<sup>o</sup>. Ana Maria Blanco Martinez

Salvador  
2012

**TERMO DE APROVAÇÃO**

**DIANA CAVALCANTE MIRANDA**

**A FREQUÊNCIA E O PERÍODO DA ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA  
NERVOSA TRANSCUTÂNEA (TENS) É DETERMINANTE PARA O  
SEU EFEITO REGENERATIVO**

---

Ailton de Souza Melo - Doutor  
UFBA

---

Alena Ribeiro Alves Peixoto Medrado - Doutora  
UFBA

---

Cláudio Pereira Figueira - Doutor  
FIOCRUZ

Salvador/BA, 06 de novembro de 2012

Aos Meus pais, João Milton e Maria Isabel por me amarem de forma incondicional, aos meus avós, Milton Miranda e Carmem Guedes por toda dedicação e carinho, ao meu Irmão Davi pela compreensão e paciência e ao meu noivo Luiz Carlos pelo amor e lealdade.

## AGRADECIMENTOS

Ao Dr<sup>o</sup>.Abrahão Fontes Baptista, pela confiança em minhas atividades profissionais, exemplo pessoal e profissional durante toda orientação e formação profissional.

À minha amiga e companheira Êmyle Martins Lima, pelo auxílio inestimável durante todo desenvolvimento da dissertação e parceria durante toda a formação.

Aos fisioterapeutas Dr<sup>o</sup>.Bruno Goes, Dr<sup>o</sup>.João Zugaib e Dr<sup>o</sup>.Marcus Santana pela prontidão em auxiliar sempre.

À fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), em especial ao Dr<sup>o</sup>.Claúdio Pereira Figueira, Dra<sup>o</sup>.Maria Lúcia Vieira Moreno e Dra<sup>o</sup>.Adriana Lanfredi Rangel pelos ensinamentos e auxílio durante os procedimentos realizados na FIOCRUZ.

Ao Núcleo de Biotecnologia e Bioprospecção (NBBio), em especial ao Prof. Diego Menezes por ter colaborado no desenvolvimento do experimento.

À Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública (EBMSP) por propiciar condições adequadas para o desenvolvimento deste estudo

Ao Laboratório de Eletroestimulação Funcional (LEF- UFBA) por todas as críticas construtivas e sugestões metodológica.

Às alunas de iniciação científica, Alaí Paixão, Andréia Abreu, Paula Carreiro por toda disponibilidade durante o experimento.

“O importante da educação não é apenas formar um mercado de trabalho, mas também uma nação, com gente capaz de pensar”.

(Jose Arthur Giannati)

## SUMÁRIO

Lista de ilustração e tabelas.....	7
Lista de abreviaturas.....	8
1 Resumo em português.....	9
2 Resumo em inglês .....	10
3 Introdução.....	11
4 Objetivo.....	12
5 Resultado.....	13
5.1 Artigo de Revisão.....	14
5.2 Artigo Original.....	37
6 Carta do editor da revista (artigo original).....	58
7 Carta do editor da revista (artigo revisão).....	59
8 Conclusão.....	60
9 Considerações finais.....	61
10 Perspectivas do estudo.....	62
11 Anexos.....	63
11.1 Anexo A - Parecer do Comitê de Ética em pesquisa com animais.....	64
11.2 Anexo C – Resumos publicados em anais de congressos.....	65

**LISTA DE ILUSTRAÇÕES E TABELAS**

Figura 1- Índice Estático do Ciático para camundongos (IECc)-----	45
Figura 2 – Corte semifino-----	46
Figura 3 - Corte ultrafino-----	47
Tabela 1 - Densidade de fibras mielinizadas, não mielinizadas e núcleos das células de Schwann -----	48
Tabela 2 - Diâmetro das fibras -----	48
Tablea 3 – Diâmetro do axônio mielinizado -----	49
Tabela 4 – Área da mielina-----	49
Figura 4 – Coeficiente G-----	50



**LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS**

BDNF	Brain-derived neurotrophic factor
CL	Correntes de Lesão
DM	Diabetes Melitus
DW	Degeneração Waleriana
GAP-43	Growth Associated Protein 43
NGF	Nerve growth factor
NMDA	N-metil-D-aspartato
PL	Print length
PLF	Print length factor
POD	Postoperative Day
SC	Schwann cell
SNP	Sistema Nervoso Periférico
SSIm	Sciatic Static Index for Mice
TENS	Transcutaneous Electrical Nerve Stimulation
TrkB	Tyrosine kinase B
TS	Toe Spread
TSF	Toe Spread Factor

## RESUMO

### A FREQUÊNCIA E O PERÍODO DA ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA NERVOSA TRANSCUTÂNEA (TENS) É DETERMINANTE PARA O SEU EFEITO REGENERATIVO

**Resumo** Objetivo: investigar o efeito de diferentes frequências de estimulação elétrica nervosa transcutânea (TENS) na regeneração do nervo periférico aplicado apenas depois de uma lesão por esmagamento do nervo isquiático em camundongos. Métodos: Estudo experimental com 30 camundongos. Os animais foram anestesiados e submetidos ao esmagamento do nervo isquiático direito, e então separados em três grupos: controle (n = 10), Low-TENS (100 Hz, n = 10), e High-TENS (4 Hz, n = 10). Os animais dos grupos Low e High TENS foram estimuladas durante 2 horas, imediatamente após a cirurgia, enquanto que o grupo controle só foi posicionada durante o mesmo período. A avaliação funcional foi feita semanalmente desde antes da cirurgia, e durante o período experimental de cinco semanas através da aquisição de fotos, seguindo o modelo para obter o índice estático ciático para os camundongos (SSIm). Após a avaliação funcional final, os animais foram sacrificados, e os nervos dissecados bilateralmente para análise histológica e histomorfométrica por microscopia óptica e eletrônica. Resultados: Low-TENS acelerou a recuperação funcional em uma semana, em comparação com os outros grupos. O grupo de controle apresentou axoplasma frequentemente escura, um dos sinais de degeneração. O grupo Low-TENS tinham menos fibras mielinizadas, em comparação com o grupo de High-TENS. A densidade de fibras não mielinizadas foi maior que no grupo Low-TENS, embora não estatisticamente significativo. Conclusão: A Low-TENS acelera a regeneração do nervo periférico após uma lesão por esmagamento, e conduz a uma melhor aparência histológica. High-TENS é prejudicial na mesma condição patológica.

## ABSTRACT

### THE FREQUENCY AND DURATION OF TRANSCUTANEOUS ELECTRICAL NERVE STIMULATION (TENS) IS DETERMINANT TO ITS REGENERATIVE EFFECT

**Abstract** Objective: To investigate the effect of different frequencies of transcutaneous electrical nerve stimulation (TENS) in peripheral nerve regeneration applied just after a crush injury to the ischiatic nerve in mice. Methods: An experimental study with 30 mice. The animals were anesthetized and subjected to crushing of the right ischiatic nerve, and then separated into three groups: control (n=10), High TENS (100Hz, n=10), and Low TENS (4Hz, n=10). The animals of the groups High and Low TENS were stimulated for 2h immediately after the surgical procedure, while the control group was only positioned for the same period. Functional assessment was done weekly since before the surgery, and during the five week experimental period by acquiring photos following the model to obtain the Static Sciatic Index for the Mice (SSIm). After the final functional assessment, the animals were euthanized, and the nerves dissected bilaterally for histological and histomorphometric analysis by light and electron microscopy. Results: Low TENS accelerated functional recovery in a week as compared to the other groups. The control group showed frequently dark axoplasm, one of the signs of degeneration. The High TENS group had fewer myelinated fibers as compared to the Low TENS group. The density of unmyelinated fibers was higher in Low TENS, than High TENS group, although not statistically significant. Conclusion: Low TENS accelerates peripheral nerve regeneration after a crush lesion, and leads to a better histological appearance. High TENS is deleterious in the same pathological condition.

## 1 INTRODUÇÃO

Apesar da capacidade de se regenerar, a recuperação funcional do sistema nervoso periférico é muitas vezes deficiente. O retorno da atividade elétrica dos neurônios envolvidos na lesão é determinado por processos morfológicos e fisiológicos, e estes por sua vez, são necessários para a recuperação completa da função motora após a lesão do nervo. Traumas, bloqueando o transporte axonal ou toxicidade química são alguns dos insultos que podem levar ao comprometimento da função neuronal normal.

Existem várias estratégias experimentais utilizadas para superar as limitações secundárias à perda progressiva da capacidade de regeneração e apoio ao crescimento, incluindo a estimulação elétrica, o que pode modular a atividade celular e molecular envolvida no processo regenerativo. No entanto, os parâmetros de estimulação parecem ser críticos para o resultado. Numerosos estudos têm mostrado que a baixa frequência de estimulação elétrica, aplicada através de eletrodos em contato direto com o nervo após a lesão e reparação cirúrgica, pode melhorar a regeneração nervosa e acelerar a reinervação dos órgãos-alvo, aumentar a densidade e diâmetro de fibras nervosas, melhorar a mielinização, e à formação de vasos sanguíneos e levar a liberação do fator de crescimento nervoso (NGF) e expressão do fator de crescimento derivado do cérebro (BDNF).

A utilização de eletrodos de superfície pode também ser uma alternativa para a estimulação direta do nervo, considerando que envolve menos riscos e metodologia de aplicação mais simples, podendo ser utilizado por um período mais longo, especialmente quando combinado com correntes bifásicas. No entanto, os resultados anteriores demonstraram que a Estimulação Elétrica Nervosa Transcutânea (TENS) aplicada durante um longo período de cinco semanas, levou à inibição da regeneração do nervo periférico em camundongos. Entretanto, demonstrou-se que a melhoria da regeneração do nervo periférico está relacionada com a aplicação de estimulação elétrica de baixa frequência imediatamente após a lesão e que o número de sessões não é determinante quando a estimulação é efetuada precocemente.

## **2 OBJETIVOS**

Verificar a influência da aplicação precoce de Estimulação Elétrica Nervosa Transcutânea (TENS) de alta e baixa frequência na regeneração nervosa periférica após lesão por esmagamento do nervo isquiático de camundongos.

### **3 RESULTADOS**

Artigo nº 1

**The frequency and duration of Transcutaneous Electrical Nerve Stimulation (TENS) is determinant to its regenerative effect**

Journal of the Peripheral Nervous System

Submetido

## ARTIGO DE REVISÃO

# HÁ ESPAÇO PARA A ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA NERVOSA TRANSCUTÂNEA COM MEIO DE INCENTIVO A REGENERAÇÃO NERVOSA PERIFÉRICA? UM ENSAIO TEÓRICO

Cavalcante DM<sup>1,3</sup>, Martins EL<sup>1,3</sup>, Martinez AMB<sup>4</sup>, Vannier-Santos MA<sup>2</sup>, Baptista AF<sup>1,2,3</sup>

1. Programa de Pós-graduação em Medicina e Saúde, Faculdade de Medicina, Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA, Brazil
2. Laboratório de Biomorfologia Parasitária, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz – FIOCRUZ, Salvador, BA, Brazil
3. Laboratório de Eletroestimulação Funcional, Departamento de Biomorfologia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA, Brazil
4. Laboratório de Neuroregeneração e Reparo, Departamento de Histologia e Embriologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ, Brazil

Palavras Chave: Regeneração nervosa periférica, Eletroterapia, Campos elétricos, Estimulação Elétrica Nervosa Transcutânea

## 1. INTRODUÇÃO

O Sistema Nervoso Periférico (SNP) pode ser lesado por traumas, distúrbios metabólicos, inflamatórios e muitos outros. 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 (STOLL e MÜLLER, 1999).

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. 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).

O uso de eletrodos transcutâneos (de superfície) é uma opção não-invasiva e que pode ser utilizada por um período maior, especialmente quando associada à correntes bifásicas. 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 (TENS) 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 efeitos variados. Resultados anteriores do nosso laboratório mostraram que a TENS aplicada por um período de cinco semanas levou à inibição da regeneração nervosa periférica em camundongos (BAPTISTA et al., 2008).

Os efeitos analgésicos da TENS estão relacionados à liberação de opióides endógenos (SLUKA e WALSH, 2003) e a exposição crônica normalmente está associada com o desenvolvimento de tolerância farmacológica. Este fenômeno está associado à 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). Entretanto, a TENS pode aumentar o fluxo sanguíneo (de VRIES et al., 2007; SANDBERG et al., 2007) e síntese de colágeno (BURSSENS et al., 2005),



que poderiam incentivar a regeneração nervosa periférica se ela fosse aplicada de maneira a evitar o desenvolvimento de tolerância farmacológica

## **2 . LESÃO E REGENERAÇÃO NERVOSA PERIFÉRICA**

Seddon em 1943 e 1972 propôs uma classificação que descreve três estágios diferentes da lesão dos nervos. No primeiro grau de lesão há continuidade dos axônios, com bloqueio de condução local, e esta lesão corresponde às lesões por compressão, sendo a Neuropraxia o termo mais adequado para este tipo (RINALDO SIQUEIRA, 2007).

O próximo grau de lesão, conhecido por Axoniotme, implica na perda da continuidade axonal no nível da lesão, porém com preservação dos tubos endoneurais. Corresponde ao avanço da lesão por compressão ou tração, quando são suficientes para interromper a continuidade axonal, resultando em DW do coto distal do nervo, causando paralisia motora, sensitiva e autonômica. E por fim, a lesão por Neurotme que inclui a perda da continuidade de alguns ou todos os elementos do tronco nervoso, incluindo tubos endoneurais, perineuro e epineuro (RINALDO SIQUEIRA, 2007).

Sunderland reclassificou as lesões em cinco graus: lesão de primeiro grau, que se assemelha à lesão Neuropraxia de Seddon, assim como a de segundo grau, que corresponde a Axoniotme de Seddon. Na lesão de terceiro grau apenas o endoneuro é interrompido; na de quarto grau apenas o epineuro permanece intacto, nesse tipo de lesão a recuperação geralmente é espontânea. A lesão de quinto grau se assemelha à transecção de Seddon (MATTHEW D. WOOD, 2011). Um sexto grau de classificação foi proposto por MacKinnon e Dellon, referente às lesões nervosas complexas, baseadas na ocorrência de uma combinação de diferentes graus de lesão (STEFANIA RAIMONDO, 2011).

Após uma lesão tecidual, um 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). As correntes de lesão modulam o processo de reparo e sua existência justifica o uso de correntes elétricas exógenas, com o fim de incentivar este processo e assim a recuperação tecidual precoce.

A regeneração axonal pode ser influenciada 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 (GORDON et al., 2003). 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.

Para incentivar a regeneração no nervo periférico, pode-se recorrer a diversos recursos, com o uso de fatores neurotróficos, células-tronco (TOHILL e TERENCEHI, 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).

### **3. CAMPOS 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.

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. 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.

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.

### **3.1. 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 isquiático (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.

Dois estudos, realizados pelo mesmo grupo, utilizando como modelo a lesão do nervo fibular comum (McGINNIS e MURPHY, 1992) e do isquiático (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

consequentemente 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  $\mu\text{A}$ ), 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.

### **3.2. Eletroestimulação percutânea**

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 seja dos métodos estudados até o momento, o mais simples de se aplicar na prática clínica. Este tipo de estimulação foi estudado em modelos de lesão do nervo isquiático (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.

### **3.3. Eletroestimulação intra-operatória**

Nestes modelos, o nervo é estimulado logo após a lesão, por períodos variáveis. Os nervos mais utilizados nos estudos são o isquiático (SCOTT, 1991) e o femoral (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 frequências 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 T $\alpha$ 1-tubulina e GAP-43 e de genes associados à regeneração, além de redução na expressão de neurofilamentos (fenômeno também associado à regeneração). Este modelo foi o único até o momento a ser extrapolado para seres humanos. Gordon et al (2010) avaliaram o mesmo protocolo de estimulação elétrica em pacientes que possuíam denervação dos músculos da região tenar consequente a Síndrome do Túnel do Carpo e encontraram que o tratamento acelerou a regeneração axonal sem afetar a função manual. Foecking et al realizaram um estudo recente com estimulação intra-operatória e demonstraram que o fator mais importante para a regeneração nervosa periférica é o início precoce da estimulação e não o quanto ela é repetida através dos dias de regeneração (FOECKING et al., 2012). A eletroestimulação intra-operatória se diferencia das outras, além da forma de estimulação, pelo tempo breve que é empregado, em torno de uma a duas horas de estimulação após a lesão.

### **3.4. Eletrodos de superfície**

O uso de eletrodos de superfície (transcutâneos) 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 (TENS) 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. 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 1mA, que podem ser relacionadas à diminuição nas concentrações de adenosinatrifosfato (ATP) (CHENG et al., 1982) e consequentemente inibição na regeneração.

Os efeitos dos campos elétricos na circulação de sangue promovem 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 TENS de baixa frequência (2 a 10 Hz) é usualmente associada com contração muscular rítmica, que também pode ter efeitos circulatórios (DOBSÁK et al., 2006). Entretanto, evidências recentes indicam que a TENS de alta frequência, que é usada sem produção de contração muscular, também tem efeito de aumento na circulação. De Vries e colaboradores (2007) demonstraram um aumento na circulação coronária consequente a TENS de alta frequência. Por outro lado, deve ser considerado que a exposição a campos eletromagnéticos e consequente aumento na irrigação associado ou não a angiogênese não é sempre positiva, pois pode estar relacionada 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).

Os efeitos mais estudados da TENS são em relação ao controle da dor. A analgesia provocada pela TENS de alta frequência está ligada à ativação de receptores  $\delta$ -opioides, enquanto que a TENS de baixa frequência ativa receptores  $\mu$ -opioides (KALRA et al., 2001; SLUKA e WALSH, 2003). Sinatra e Ford (1979) 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  $\mu$ -opioides, aumentou a regeneração de fibras não mielinizadas, mas inibiu a de fibras mielinizadas após lesão por esmagamento do nervo isquiático. Isto está de acordo com resultados prévios de nosso laboratório (BAPTISTA et al., 2008), nos quais as fibras em regeneração não mielinizadas não foram afetadas pela TENS, mas as mielinizadas de grosso calibre estiveram presentes em menor quantidade e apresentando menos conteúdo mielínico.

A diferença fundamental entre os estudos que mostraram efeitos estimulantes ou inibitórios na regeneração do SNP com a ativação de receptores opioides 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 TENS de alta e baixa frequência, 20 minutos por dia, levou a tolerância a opióides 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 TENS pode levar ao desenvolvimento de tolerância a opióides e consequências neurotóxicas para as células envolvidas na regeneração. Entretanto um uso breve, que não levasse à tolerância opióide, poderia ser um importante fator de incentivo à regeneração.

Um trabalho recente do nosso laboratório (CAVALCANTE et al., submetido) demonstrou que a TENS aplicada por duas horas após uma lesão por esmagamento do nervo isquiático de camundongos foi capaz de antecipar a recuperação funcional dos animais em uma semana, além de levar a um melhor aspecto histológico dos nervos tratados com baixas frequências (10Hz). Estudo recente tem demonstrado que o período breve de aplicação da estimulação elétrica, realmente é determinante para a regeneração nervosa periférica, no entanto neste estudo a estimulação foi intraoperatória. (FOECKING et al., 2012).

## 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.

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.

BAPTISTA, A.F.; GOMES, J.R.S.; OLIVEIRA, J.T.; SANTOS, S.M.G.; VANNIER-SANTOS, M.A.; MARTINEZ, A.M.B. A new approach to assess sciatic function after sciatic lesion in the mouse – Adaptation of the sciatic static index. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 161, p. 259-264, 2007.

BAPTISTA, A.F.; GOMES, J.R.S.; OLIVEIRA, J.T.; SANTOS, S.M.G.; VANNIER-SANTOS, M.A.; MARTINEZ, A.M.B. High and low frequency transcutaneous electrical nerve stimulation delay sciatic nerve regeneration after crush lesion in the mouse. **Journal of the Peripheral Nervous System**, v. 13, p. 71-80, 2008 *em impressão*.



BEVERIDGE, J.A.; POLITIS, M.J. 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.

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.

BURSSSENS, 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.

BURSSSENS, 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.

CAVALCANTE, D; MARTINS, E; PAIXÃO A; VANNIER-SANTOS, M; MARTINEZ, A; BAPTISTA, A. The frequency of transcutaneous electrical nerve stimulation (TENS) applied just after a crush lesion to the ischiatic nerve in mice is determinant to its regenerative effect . **Journal of the Peripheral Nervous System**, submetido.

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.

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.

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- $\beta$ -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.

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.

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 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. 27, p. 7-18, 2007.

DOBSÁK P.; NOVÁKOVÁ, M.; SIEGLOVÁ, 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- $\beta$  1 regulates axon/Schwann cell interactions. **The Journal of Cell Biology**, v. 129, n. 2, p. 443-458, 1995.

FOECKING E, FARGO K, COUGHLIN L, KIM J, MARZO S, JONES K (2012). Single session of brief electrical stimulation immediately following crush injury enhances functional recovery of rat facial nerve. **JRRD**, **49**: 451-458.

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. **Jornal of Pharmacological Science**, v. 104, n. 2, p. 159-166, 2007.

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

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.

GUÉNARD, V.; GWYNN, L.A.; WOOD, P.M. Transforming growth factor- $\beta$  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.

GREWO LIM; SHUXING WANG; JEONG-Ae LIM; JIANREN MAO. Activity of adenylyl cyclase and protein Kinase A contributes to morphine-induced spinal apoptosis. **Neuroscience Letters** 389 (2005) 104-108

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.; FERNADEZ, M.; RONCERO, C.; BENITO, M.; FABREGART, I. Reactive oxygen species mediates the mitochondrial-dependent apoptosis induced by transforming growth factor- $\beta$  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- $\beta$  in

fetal rat hepatocytes requires radical oxygen production, but is dispensable for cell death. **FEBS Letters**, v. 499, n. 3, p. 225-229, 2001.

HONG, Y.H.; PENG, H.B.; LA FATA, V.; LIAO, J.K. Hydrogen peroxide-mediated transcriptional induction of macrophage colony-stimulator factor by TGF- $\beta$ 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.

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- $\beta$ 1-induced plasminogen activator inhibitor-1 upregulation in mesangial cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 309, v. 4, p. 961-966, 2003.

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- $\beta$ 1 signal transduction in human lung fibroblast cells: Involvement of hydrogen peroxide and Ca<sup>2+</sup> in TGF- $\beta$ 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.

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.

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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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- $\beta$  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.

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

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- $\beta$  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

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

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.

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.

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.

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.

RAIMONDO, STEFANIA; FORNARO, M; TOS, P; BATTISTON, B; GIACOBINI-ROBECCHI, M; GEUNA,S. Perspectives in regeneration and tissue engineering of peripheral nerves. **Annals of Anatomy**, 193, 334–340, 2011.

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- $\beta$ 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.

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.

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.; BEKHTE, 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.

SCHOBER, 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- $\beta$  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.

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 in47-154, 1993.

**ARTIGO ORIGINAL****The frequency and duration of Transcutaneous Electrical Nerve Stimulation (TENS) is determinant to its regenerative effect**

Cavalcante DM<sup>1,3</sup>, Martins EL<sup>1,3</sup>, Goes BT<sup>2</sup>, Zugaib JC<sup>5</sup>, Paixão AB<sup>3</sup>, Vannier-Santos MA<sup>2</sup>, Martinez AMB<sup>4</sup>, Baptista AF<sup>1,2,3</sup>

1. Programa de Pós-graduação em Medicina e Saúde, Faculdade de Medicina, Universidade Federal da Bahia, Rua Augusto Viana, Canela, 40110-060, Salvador, BA, Brazil
2. Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz – Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Rua Waldemar Falcão, Candeal, 40296-710, Salvador, BA; INCT-INPeTAm/MCT-CNPq, Brazil
3. Laboratório de Eletroestimulação Funcional, Departamento de Biomorfologia, Universidade Federal da Bahia, Av. Reitor Miguel Calmon , S/N , Vale do Canela , 40110-903, Salvador, BA, Brazil
4. Laboratório de Neuroregeneração e Reparo, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Av. Pedro Calmon, Cidade Universitária, 21941-901, Rio de Janeiro, RJ, Brazil
5. Laboratório de fisiologia e plasticidade sináptica, Departamento de fisiologia, Faculdade de Medicina e Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Avenida Bandeirantes, Ribeirão Preto, 14040-040, São Paulo, SP, Brazil

Running headline: TENS and ischiatic regeneration after crush lesion

**Abstract** Objective: To investigate the effect of different frequencies of transcutaneous electrical nerve stimulation (TENS) in peripheral nerve regeneration applied just after a crush injury to the ischiatic nerve in mice. Methods: An experimental study with 30 mice. The animals were anesthetized and subjected to crushing of the right ischiatic nerve, and then separated into three groups: control (n=10), High TENS (100Hz, n=10), and Low TENS (4Hz, n=10). The animals of the groups High and Low TENS were stimulated for 2h immediately after the surgical procedure, while the control group was only positioned for the same period. Functional assessment was done weekly since before the surgery, and during the five week experimental period by acquiring photos following the model to obtain the Static Sciatic Index for the Mice (SSIm). After the final functional assessment, the animals were euthanized, and the nerves dissected bilaterally for histological and histomorphometric analysis by light and electron microscopy. Results: Low TENS accelerated functional recovery in a week as compared to the other groups. The control group showed frequently dark axoplasm, one of the signs of degeneration. The High TENS group had fewer myelinated fibers as compared to the Low TENS group. The density of unmyelinated fibers was higher in Low TENS, than High TENS group, although not statistically significant. Conclusion: Low TENS accelerates peripheral nerve regeneration after a crush lesion, and leads to a better histological appearance. High TENS is deleterious in the same pathological condition.

Key words: transcutaneous electrical nerve electrostimulation, mice, ischiatic, nerve regeneration, functional recovery.

## Introduction

Despite the ability to regenerate, the peripheral nervous system functional recovery is often poor. The return of the electrical activity of neurons involved in the injury is determined by morphological and physiological processes, and these in turn are required for the complete recovery of motor function after nerve injury (Teodori *et al.*, 2011). Traumas, blocking axonal transport or chemical toxicity are some of the insults that may lead to impairment of normal neuronal function (Jack *et al.*, 2012).

There are several experimental strategies used to overcome the limitations secondary to progressive loss of regenerative capacity and support growth, including electrical stimulation, which can modulate the molecular and cellular activity involved in the regenerative process (Gordon *et al.*, 2003). However, the parameters of stimulation appear to be critical for the results. Numerous studies have shown that low-frequency electrical stimulation applied through electrodes in direct contact with the nerve after injury and surgical repair may improve nerve regeneration and accelerate reinnervation of the target organs (Gordon *et al.*, 2010), increase nerve fibers density and diameter (Haastert-Talini *et al.*, 2011), improve myelination and angiogenesis (Ming-Chin *et al.*, 2008), and lead to nerve growth factor (NGF) release (Huang *et al.*, 2010), and brain-derived growth factor (BDNF) expression (Geremia *et al.*, 2007).

The use of surface electrodes can also be an alternative to direct stimulation of the nerve, considering it involves lower risks and simpler methodology of application, and can be used for a longer period, especially when combined with biphasic electric currents. However, previous results have shown that Transcutaneous Electrical Nerve Stimulation (TENS) applied for an extended period



of five weeks after an experimental crush lesion to the ischiatic nerve, led to inhibition of regeneration in mice (Baptista *et al.*, 2008). Nevertheless, it has been demonstrated that the improvement in peripheral nerve regeneration is related to the application of low frequency electrical stimulation immediately after injury, and that the number of sessions is not determinant when stimulation is performed earlier (Foecking *et al.*, 2012).

As TENS may be a simple and useful method to apply electrical currents to influence peripheral nerve regeneration, it is mandatory to elucidate which are the most effective procedures for stimulation. Therefore, the objective of this study was to assess the influence of early application of High and Low-frequency TENS in peripheral nerve regeneration after crush injury to the murine ischiatic nerve.

## **Materials and Methods**

The study involved 30 Swiss mice (*Mus musculus*), weighing 35-48g. The sample size was defined based on the study of Baptista *et al.*, 2008, using the difference between the control group and the group of High-frequency electrical stimulation on the 7<sup>th</sup> day of functional testing. This difference was used due to the lower sensitivity of the test in differentiating between functional groups. All procedures were approved by the Committee for Animal Experimentation Ethics of the Bahian School of Medicine and Public Health, under the protocol 003/2009. The animals were housed in individual cages with food and water *ad libitum* and a 12:12h light/dark cycle.

## **Surgery**

The animals were anesthetized with ketamine (10 mg/kg) and xylazine (100 mg/kg), and then subjected to asepsis and trichotomy of the right side rear. After a longitudinal incision, the right ischiatic nerve was exposed, isolated from adjacent tissues, and crushed with a needle holder forceps maintained for 30 seconds. Muscle and skin were sutured using 4.0 absorbable suture and non-absorbable, respectively. During the period of experiments, signs of distress due to nerve injury were observed such as autotomy, weight loss and general hypomobility.

## **Electrical stimulation**

The animals were stimulated for two hours after the surgical procedure. During stimulation they were anesthetized by a mixture of halothane and oxygen (1 L/min), administered through a vaporizer (Takaoka, USA). Electrical stimulation was delivered through clinical biphasic pulse generator (TENS vif 962, QUARK Medical,

Brazil), previously calibrated for the study. Electrical current was transmitted by two silicon-carbon electrodes (1.5 cm<sup>2</sup> area), associated with carbopol gel. The electrodes were placed along the incision, and the distance between them was 2 cm. The electrical parameters were based on our previous study (Baptista *et al.*, 2008).

The animals were divided into three groups:

1. Control: animals subjected to the ischiatic injury, standard protocol for anesthesia and positioning, but no electrical stimulation (n=10);
2. High TENS: 100 Hz frequency, 80  $\mu$ s pulse width, with amplitude just below the motor threshold (n=10);
3. Low TENS: 4 Hz frequency, 100  $\mu$ s pulse width, modulated in 2 Hz bursts, with amplitude just in the motor threshold (n=10).

For histomorphometric analysis, the left nerves (uninjured and unstimulated) were considered as normal. The nerves on the right side (injured) were grouped into control, High and Low-TENS.

### **Functional assessment**

The parameters of the animals footprints were evaluated using images taken one day prior to surgery and on the 7<sup>th</sup>, 14<sup>th</sup>, 21<sup>st</sup>, 28<sup>th</sup>, and 35<sup>th</sup> post-operative days, following the methodology to obtain the Sciatic Static Index for the mice (SSIm) (Baptista *et al.*, 2007). Briefly, the animals were positioned on a transparent platform, and parameters of the footprint photographed using a video camera (Sony Camcorder HDR-CX350 Full HD). The parameters analyzed were: the distance between the tip of the 1<sup>st</sup> and 5<sup>th</sup> finger, or toe spread (TS), and the distance between the tip of the 3<sup>rd</sup> finger and the most posterior portion of the footprint in contact with the surface, or print length (PL). The TS and PL generated the TS factor (TSF) and

the PL factor (PLF) (factor = experimental value - normal / normal), and were used in the formula to estimate the SSIm:

$$\text{SSIm} = 101.3 \times \text{TSF} - 54.03 \times \text{PFL} - 9.5.$$

In the SSIm, zero corresponds to normal function, and -100 to a complete unilateral functional loss. The amount of the SSIM was added 100 then done log 10. The averages of the parameters from three images for each condition/animal were evaluated by means of an image analysis program (Image J, NIH, USA).

### **Histological and histomorphometric assessment**

One day after the last functional analysis, on the 35<sup>th</sup> day post-lesion, 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, 50 mL/animal). The ischiatic 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 post-fixed, osmicated, dehydrated in increasing concentrations of acetone (30–100%), infiltrated, and plastic embedded. Transverse sections 0.5  $\mu\text{m}$ - (semithin) and 70 nm-thick (ultrathin) were obtained using an ultramicrotome (Reichert Jung, USA). The semithin sections were stained with a mix of toluidine blue and azur 2 in a 1:1 ratio. Images were acquired on a light microscope (Olympus BX 51) connected to a digital camera (Olympus Q color 5). A 1,000x magnification was used to assess the general morphological condition of the nerves.

For the ultrastructural analysis, 70-nm sections were contrasted with 1% uranyl acetate and lead citrate Pb and observed through a transmission electron

microscope (Zeiss EM 109) equipped with an image acquisition system (MegaView II, Analysis-Imaging-System). For qualitative assessment of the overall condition of the nerve we used 1,000x (light microscopy), and 7,000x (electron microscopy) magnification images of the four groups of nerves.

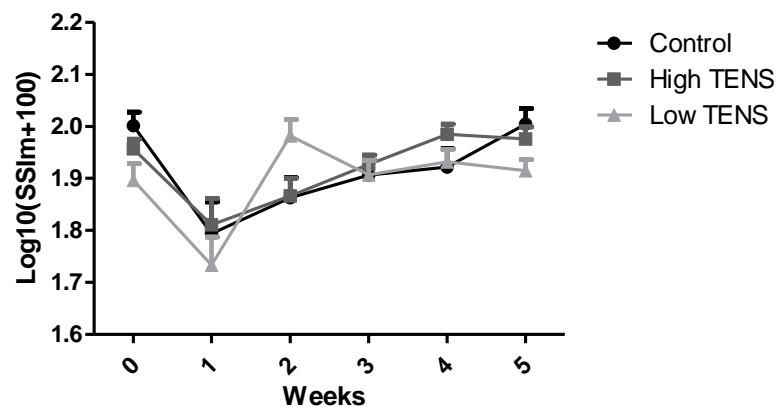
The 3,000x magnification was used to measure the density and diameter of myelinated fibers, myelinated axon diameter, area of myelin and G ratio. A magnification of 7,000x was used for morphological assessment and measurement of the densities and diameters of non-myelinated fibers, and the number of Schwann cell (SC) 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.

The independent variable for all groups was the use of TENS. The dependent variables were derived from functional analysis, and histomorphometry. Descriptive analysis was performed using the median and 25-75 quartiles. For functional analysis using the SSIm we performed paired (intra group) comparisons, analyzed through the Repeated Measures ANOVA (parametric) or Friedman test (nonparametric). The non-paired inferences were performed by ANOVA One-way test (parametric) or Kruskal-Wallis test (nonparametric) associated with the Student-Newman-Keuls *Post-hoc* analysis. Both measures of the variables of each study and the statistical analysis were performed blindly. We considered as significant an alpha value of 1% ( $p < 0.01$ ). The analyses were carried out using the statistical package Graph Pad Prism 5.0.

## Results

### Functional assessment

In the first week after lesion, the locomotor function was compromised, followed by a gradual recovery in the three groups. However the animals in groups High-TENS and control only returned to normal values in the third week after injury, whereas animals from the Low-TENS group had an early recovery in the second week (Fig. 1). Since the values of locomotor function were not comparable at baseline, there were no unpaired comparisons.



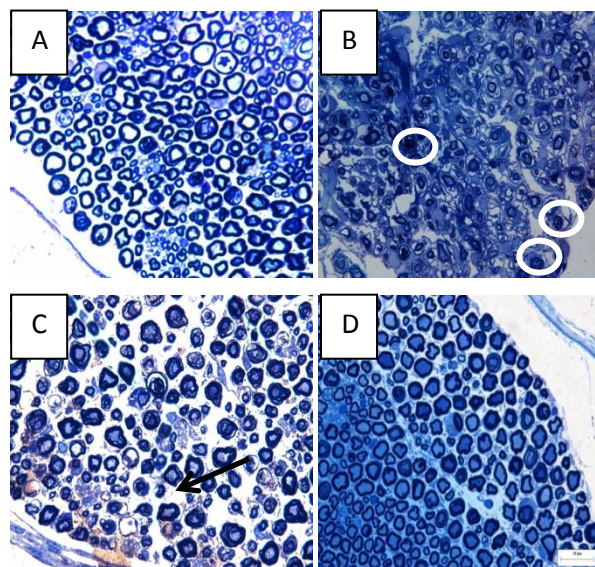
**Figure 1:** Static Sciatic Index for mouse (SSIm). Graph shows a decrease in locomotor function after the first week of a crush lesion to the right ischiatic nerve in the three groups (Control, High and Low-TENS). Low-TENS animals recovered to normal values on the second week after lesion, while High-TENS and control animals only did on the third week. Data expressed as Log10 of the mean  $\pm$  SD.

### Histological assessment

Morphological changes were observed in images acquired by light and electron microscopy. In light microscopy, the histological appearance of the nerves of the High and Low-TENS groups were generally better than the nerves of the control group (Fig 2B, 2C, 2D). The control group showed more frequently axons with dark axoplasm, one of the signs of degeneration. The nerves of the High-TENS and Low-TENS groups showed similar myelinated fibers with diameters similar to the normal

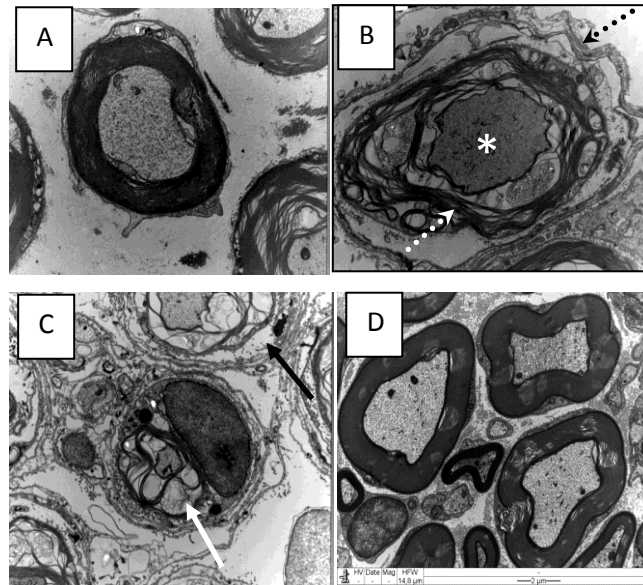
nerves (Fig 2A, 2C, 2D). When comparing the High and Low-TENS groups, the first presented a worst aspect, with more frequent dark axoplasm axons and fewer myelinated fibers (Fig 2C).

Regarding nerve morphology at 7,000x magnification electromicrographs, it was observed that the nerves in the control group showed signs of axonopathy, characterized by the presence of non-specific laminar membrane structure, many macrophages, intra-axonal compaction, axoplasm dissolution, degeneration of regenerative clusters, and denervated Schwann cell bands. Myelin sheaths showed characteristic fragmentation (Fig 3B). In High TENS nerves it was possible to observe signs of extensive hypomyelination with complete lack of myelination, and many unmyelinated/remyelinated fibers (Fig 3C). The Low-TENS nerves showed a better aspect, with continuity of the basal lamina, a higher density of myelinated fibers, and several grouped bands of unmyelinated fibers. In both groups we were able to find denervated SC (Fig 3C, 3D).



**Figure 2:** Semithin transverse ischiatic nerve section (1,000x magnification). (A) normal group (without stimulation or nerve injury) showing little space and endoneural distribution with compact fibers; (B) control group (unstimulated injured nerve) showing lower fiber density than normal group, and many axons with dark axoplasm (circles); (C) High-TENS group (damaged nerve with high frequency stimulation) showing markedly increased endoneurial space (black arrow), which may represent

edema; (D) Low-TENS group (damaged nerve with low frequency electrical stimulation) with fiber diameter, density and distribution similar to the normal group. Calibration bar: 10 $\mu$ m.



**Figure 3:** Ultrathin transverse ischiatic nerve section (7,000x magnification). (A) normal group (without stimulation or nerve injury) showing larger myelinated fibers; (B) control group (unstimulated injured nerve) showing dissolution of the axoplasm (asterisk), nonspecific membranous structure (dashed, black arrow) and myelin fragmentation (dashed, white arrow). (C) High TENS group (damaged nerve with high frequency stimulation), with complete lack of myelination (black arrow) or weakly myelinated fibers; (D) Low TENS group (damaged nerve with low frequency electrical stimulation), where myelinated fibers were well preserved, showing a normal aspect. Calibration bar: 2 $\mu$ m.

### Morphometric assessment

The morphometric analysis was performed using the images obtained by an electron microscope. All groups had the highest density of myelinated fibers in the range of 2-6 mm diameter. The density of unmyelinated fibers was higher in Low-TENS, then High-TENS group (Table 1), although not statistically significant. The density of Schwann cells was higher in normal and Low, then High-TENS group, followed by the control group. There was no difference between the median fiber



diameters (myelinated and unmyelinated) of the groups compared in the three different ranges studied (0-2, 2-6 and 6-12  $\mu\text{m}$  diameter) (Table 2). No differences were found when analyzing the diameter myelinated axon and myelin area (Table 3, Table 4)

**Table 1:** Density of myelinated fibers, non-myelinated fibers and Schwann cell nuclei

GROUP	n	Density (cells / $\text{mm}^2$ )				
		NMF	MF(0-2 $\mu\text{m}$ )	MF(2-6 $\mu\text{m}$ )	MF(6-12 $\mu\text{m}$ )	SCN
Normal	5	2.057 (2.000-2.685)	40,1 (40,1-44,5)	828,8 (788,7-1086,2) a*b*	360,9 (267,3-374,3)	53,4 (0-74,2)
Control	5	1.942 (1.771-4.380)	13,3 (13,3-66,8)	387,7 (245,0-1189,8)	80,2 (66,8-106,9)	26,7 (22,2-187,1)
High TENS	5	2.857 (2.285-4.342)	26,7 (13,3-240,6)	200,5 (133,6-855,6)	44,5 (26,7-187,1)	50,1 (22,2-53,4)
Low TENS	5	2.914 (1.942-3.200)	133,6 (106,9-47,0)	1443,8 (1002,6-1483,9)	120,3 (66,8-307,4)	53,4 (26,7-120,3)

Data expressed as median and 25-75 quartiles.

Normal x control (a) normal x High-TENS (b)

\*  $P < 0.05$  (Kruskal-Wallis + Student-Newman-Keuls).

NMF, non-myelinated fibers; MF, myelinated fibers; SCN, Schwann cell nuclei

**Table 2:** Measurements of fiber diameter

GROUP	n	Diameter of fiber			
		NMF	MF (0-2 $\mu\text{m}$ )	MF (2-6 $\mu\text{m}$ )	MF (6-12 $\mu\text{m}$ )
Normal	5	0,57 (0,41-0,75)	1,73 (1,40-1,82)	4,70 (3,28-4,96)	7,21 (6,64-8,14)
Control	5	0,57 (0,41-0,83)	1,64 (1,37-1,83)	3,85 (3,02-4,58)	7,10 (6,36-9,09)
High TENS	5	0,47 (0,32-0,70)	0,96 (0,72-1,18)	3,68 (2,73-4,45)	7,09 (6,48-7,74)
Low TENS	5	0,49 (0,37-0,69)	1,62 (0,00-1,80)	4,11 (3,03-4,73)	6,98 (6,44-7,52)

Data expressed as median and 25-75 quartiles.

NMF, non-myelinated fibers; MF, myelinated fibers

**Table 3:** Measurements of myelinated axon diameters

GROUP	N	Diameter myelinated axon		
		MF (0-2 $\mu$ m)	MF (2-6 $\mu$ m)	MF (6-12 $\mu$ m)
Normal	5	1,53 (1,22-1,73)	3,15 (2,51-3,91)	6,63 (6,24-7,05)
Control	5	1,50 (1,13-1,77)	2,81 (2,35-3,36)	6,81 (6,81-6,81)
High TENS	5	1,53 (0,74-1,59)	2,81 (2,37-3,39)	6,68 (6,68-6,68)
Low TENS	5	1,42 (1,14-1,73)	3,07 (2,50-3,88)	7,20 (6,97-7,42)

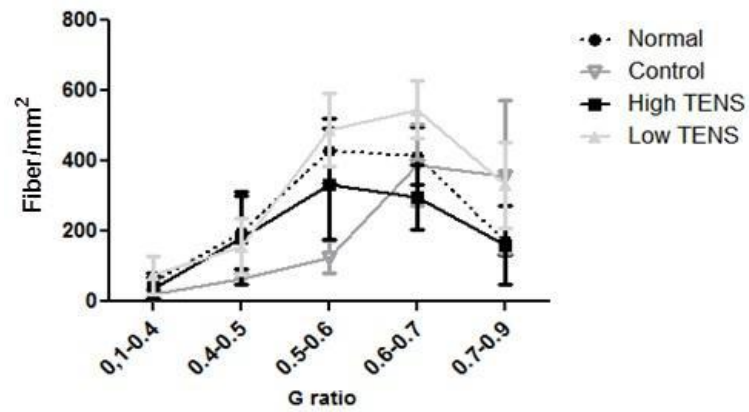
Data expressed as median and 25-75 quartiles.  
MF, myelinated fibers

**Table 4:** Determination of myelin areas

GROUP	N	Area of myelin		
		MF (0-2 $\mu$ m)	MF (2-6 $\mu$ m)	MF (6-12 $\mu$ m)
Normal	5	1,38(1,03-1,74)	2,58(2,27-3,06)	O (0-0)
Control	5	1,13(0,93-1,37)	2,54(2,14-3,62)	7,53(7,53-7,53)
High TENS	5	1,02(0,39-1,51)	2,49(2,21-3,15)	O (0-0)
Low TENS	5	1,25(0,95-1,57)	2,49(2,22-3,01)	O (0-0)

Data expressed as median and 25-75 quartiles.  
MF, myelinated fibers

The G ratio was evaluated in the following stratifications: 0.1 to 0.4, 0.4 to 0.5, 0.5 to 0.6, 0.6 to 0.7, from 0.7 to 0.9  $\mu$ m. There were no differences between the groups compared in each stratum, although it was possible to observe that the control group had a very small amount of fibers in the range of 0.5-0.6, with a higher concentration in the 0.6-0.7 range. Although Low-TENS fibers also had a peak of concentration in this last range, this group showed the greater amount of fibers, when compared to the others. Normal and High-TENS groups showed the same behavior, with more fibers in the range of 0.5-0.6 (Fig 4).



**Figure 4:** G ratio stratified by ranges. G coefficient was obtained by dividing the axon by fiber diameter. Note that the nerves in the control and Low-TENS groups showed a peak fiber density in the range of 0.6-0.7. The other nerves showed a peak in the range of 0.5-0.6. Data are presented as median and 25-75 quartiles.

## Discussion

The present study showed that Low-TENS applied early in an axonotmesis lesion accelerated functional recovery, and lead to a better histological appearance in the nerve ultrastructural analysis. Although High-TENS and control animals showed a similar pattern of locomotor recovery, High-TENS nerves showed extensive signs of degeneration, suggesting that this modality may be harmful just after peripheral nerve lesions.

The early recovery of locomotor function is consistent with other studies that evaluated the effect of electrical stimulation on peripheral nerve regeneration (Gordon *et al.*, 2003). It is possible that the low-frequency electrical stimulation applied early can anticipate muscle reinnervation (Al-Majed *et al.*, 2000). In the present study the morphological aspect of the nerves showed a direct relationship to locomotor function, since its return depends on the orientation of the stumps towards the target organ, axonal regeneration, and also the interaction between the central nervous system and spinal circuits (Vivó *et al.*, 2011).

We observed that on the 35<sup>th</sup> day after lesion, all injured nerves showed signs of axonal regeneration, and the nerves of the group treated with Low-TENS nearly reached the appearance of the nerves on the normal group. Our findings are in agreement with other studies showing that electrical stimulation applied just after an experimental lesion can lead to increased fiber density and diameter, resulting in increased functionality (Haastert-Talini *et al.*, 2011), higher speed and accuracy of motor regeneration (Al-Majed *et al.*, 2000), and increased expression of regeneration-associated genes (Sharma *et al.*, 2010), BDNF and its receptor Tyrosine Kinase B (TrKB) (Geremia *et al.*, 2007).

The use of electrical currents for a short period immediately after injury appears to be a critical factor, since previous results using the same characteristics of electrical stimulation with different temporal patterns (five times/week for five consecutive weeks) led to inhibition of nerve regeneration (Baptista *et al.*, 2008). Although it is possible that this has happened due to the number of sessions of electrical stimulation, a recent study has shown that the early onset of stimulation is the most important factor, and not how it is repeated through the days of regeneration (Foecking *et al.*, 2012).

Frequency may also be another key factor to improve peripheral nerve regeneration. In our study, the High-TENS nerves (100 Hz) showed histological signs of decreased regeneration in the electromicrographs. Ming-Chin *et al* (2008) found that the higher the frequency of electrical stimulation, the greater the suppression of regeneration. This behavior was also found by Huang *et al* (2010), who observed an inverse correlation between electric frequency and NGF release by SC in culture. Another important finding of their study was that electrical stimulation of 1 Hz, 5 V/cm led to a rapid increase in calcium, which seems to play a positive role in the regulation of NGF production in SC in culture.

Unlike what happens with high frequencies, many studies have previously shown that low frequencies applied for 1h after lesion may be the best option to improve nerve regeneration (Al-Majed *et al.*, 2000; Gordon *et al.*, 2003; Haastert-Talini *et al.*, 2011), and this may be potentially translated to the clinical practice, as TENS has been used for years to treat many conditions associated with peripheral nerve lesions, as diabetic neuropathy and carpal tunnel syndrome. However, more experimental studies and clinical trials are needed to investigate the influence of low and high frequency TENS, as well as the optimal period for use on peripheral nerve

regeneration, elucidating the different mechanisms caused by these frequencies, leading to different responses in nerve.

In summary, our study showed that Low-TENS accelerates peripheral nerve regeneration, expressed by a functional improvement and a better histological nerve appearance than the control or High-TENS nerves. High-TENS may be harmful for this condition. The findings of this study guide the application of this therapeutic modality in clinical practice since its implementation is simple and affordable.

**Acknowledgments**

This work was funded by FAPESB, PROCAD-NF/Capes, PP-SUS, CNPq and part of the experiments developed at the NBBio of the Bahian School of Medicine and Public Health, and at the Electron Microscopy Unit from the CPqGM-Fiocruz - BA.

## References

Al-Majed A, Neumann C, Brushart T, Gordon T (2000). Brief electrical stimulation promotes the speed and accuracy of motor axonal regeneration. *J Neurosci*, 20: 2602–2608.

Baptista A, Gomes J, Oliveira J, Garzedim 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*, 116: 259-264.

Baptista A, Gomes J, Oliveira J, Garzedim S, Vannier-Santos M, Martinez A (2008). High- and low-frequency transcutaneous electrical nerve stimulation delay sciatic nerve regeneration after crush lesion in the mouse. *J Peripher Nerv Syst* 13: 71–80.

Foecking E, Fargo K, Coughlin L, Kim J, Marzo S, Jones K (2012). Single session of brief electrical stimulation immediately following crush injury enhances functional recovery of rat facial nerve. *J Rehabil Res Dev*, 49: 451-458.

Gantus M, Nasciutti L, Cruz C, Persechini P, Martinez A (2006). Modulation of extracellular matrix components by metalloproteinases and their tissue inhibitors during degeneration and regeneration of rat sural nerve. *Brain Res* 122: 36–46.

Geremia N, Gordon T, Brushart T, Al-Majed A, Valerie M (2007). Verge Electrical stimulation promotes sensory neuron regeneration and growth-associated gene expression. *This Issue*, 205: 347–359.



Gordon T, Sulaiman O, Gordon J (2003). Experimental strategies to promote functional recovery after peripheral nerve injuries. *J Peripher Nerv Syst*, 8: 236–250.

Gordon T, Amirjani N, Edwards D, Chan K (2010). Brief post-surgical electrical stimulation accelerates axon regeneration and muscle reinnervation without affecting the functional measures in carpal tunnel syndrome patients. *This Issue*, 223: 192-202.

Huang J, Ye Z, Hu X, Lu L, Luo Z (2010). Electrical stimulation induces calcium-dependent release of NGF from cultured schwann cells. *Glia*, 58 : 622-63.

Talini K, Schmitte R, Korte N, Klode D, Ratzka A, Grothe C (2011). Electrical stimulation accelerates axonal and functional peripheral nerve regeneration across long gaps. *J Neurotrauma* 4: 661-674.

Lu M, Ho C, Hsu S, Lee H, Lin J, Yao C, Chen Y (2008). Effects of electrical stimulation at different frequencies on regeneration of transected peripheral nerve. *Neurorehab Neural Re*, 22: 367–373.

Sharma N, Marzo S, Jones K, Foecking E (2010). Electrical stimulation and testosterone differentially enhance expression of regeneration-associated genes. *This Issue*, 223:183-191

Teodori R, Silva A, Silva M, Oliveira L, Polacow M, Guirro E (2011). High-voltage electrical stimulation improves nerve regeneration after sciatic crush injury. *Rev Bras Fisioterapia*, 15: 325-31.

Vivó M, Puigdemasa A, Casals L, Asensio E, Udina E, Navarro X (2011). Immediate electrical stimulation enhances regeneration and reinnervation and modulates spinal plastic changes after sciatic nerve injury and repair. *This Issue*, 211: 180–193.

Wang J, Medress Z, Barres B (2012). Axon degeneration: Molecular mechanisms of a self-destruction pathway. *Cell Biol*, 196: 1-7.





## 4 CONCLUSÃO

Low TENS acelera a regeneração do nervo periférico, expressa por uma melhora funcional e uma melhor aparência histológica quando comparado com os grupos controle e High TENS. A High TENS pode ser prejudicial para as lesões nervosas periféricas.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo possibilitou uma compreensão dos pontos de vista funcional e histomorfométrico da influência da TENS na regeneração nervosa periférica após uma lesão compressiva experimental em camundongos. Seus resultados sugerem que este recurso pode ser útil para incentivar a regeneração nervosa periférica.

Entretanto, não foram avaliadas a influência da circulação local de forma dinâmica, nem a expressão de marcadores bioquímicos ou moleculares da regeneração nervosa periférica; a avaliação qualitativa foi realizada por apenas uma avaliadora cega e o poder do estudo não possibilitou a observação das diferenças estatísticas ali presentes.

## 6 PERSPECTIVAS DE ESTUDOS

Os achados deste estudo nos orientam à aplicação desta modalidade terapêutica na prática clínica, uma vez que sua aplicação é mais simples e acessível. Porém, mais estudos experimentais e ensaios clínicos são necessários para investigar a influência da baixa e alta frequência, assim como o período ideal para a sua utilização sobre a regeneração nervosa periférica, elucidando os diferentes mecanismos associados a tais frequências, que levam a diferentes respostas no nervo.

## **7 ANEXOS**

Anexo A - Parecer do Comitê de Ética

Anexo C - Resumos publicados em anais de congressos