



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE MEDICINA**

**Fábio Oliveira Maciel**

**EFEITO DA ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA E DO LASER  
TERAPÊUTICO NA RECUPERAÇÃO MUSCULAR E  
NERVOSA APÓS NEURORRAFIA LÁTERO-TERMINAL DO  
NERVO FIBULAR EM RATOS**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Doutor em Bases Gerais da Cirurgia.

Orientador (a): Prof. Dr. Fausto Viterbo de Oliveira Neto

**Botucatu  
2019**

Fábio Oliveira Maciel

EFEITO DA ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA E DO LASER  
TERAPÊUTICO NA RECUPERAÇÃO MUSCULAR E  
NERVOSA APÓS NEURORRAFIA LÁTERO-TERMINAL  
DO NERVO FIBULAR EM RATOS

Tese apresentada à Faculdade de  
Medicina, Universidade Estadual Paulista  
“Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de  
Botucatu, para obtenção do título de Doutor  
em Bases Gerais da Cirurgia.

Orientador: Prof. Dr. Fausto Viterbo de Oliveira Neto

Botucatu  
2019

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: LUCIANA PIZZANI-CRB 8/6772

Maciel, Fábio Oliveira.

Efeito da estimulação elétrica e do laser  
terapêutico na recuperação muscular e nervosa após  
neurorrafia

lâtero-terminal do nervo fibular em ratos / Fábio  
Oliveira Maciel. - Botucatu, 2019

Tese (doutorado) - Universidade Estadual  
Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de  
Medicina de Botucatu

Orientador: Fausto Viterbo de Oliveira  
Neto Capes: 40102149

1. Estimulação elétrica. 2. Lasers. 3. Microcirurgia.  
4. Músculos - Regeneração.

Palavras-chave: Estimulação elétrica; Laser;

## *Dedicatória*

*À minha esposa Suzane e aos meus filhos  
Artur e Alice*

## *Agradecimentos*

*Gostaria de agradecer...*

*A Deus por tudo!!!*

*Aos meus pais Sérgio e Fátima pela formação como pessoa!!!*

*Ao meu orientador Professor Fausto Viterbo por ter acreditado em mim e por todo o ensinamento!!!*

*Às alunas Fernanda de Sanctis, Kerully Caetano Soares Santos e Karine Silveira Machado por doarem seu tempo me ajudando no laboratório!!!*

*À Professora Selma Maria Michelin Matheus pelo suporte!!!*

*À Professora Lídia Raquel de Carvalho por sempre me ajudar nas análises estatísticas!!!*

*Aos membros da UNIPEX, principalmente do Bloco 2 e especialmente ao Luiz Carlos Edivalter Bardella!!!*

*Ao Escritório de Apoio a Pesquisa EAP por todo o apoio!!!*

*À UFAM por permitir que isso fosse possível!!!*

*À FAPESP por financiar a pesquisa!!!*

*À UNESP por investir na minha formação!!!*

*A todos que de alguma maneira me ajudaram nessa caminhada, pois não construímos um trabalho dessa importância sozinhos!!!*

## SUMÁRIO

DEDICATÓRIA.....	03
AGRADECIMENTOS.....	04
RESUMO.....	06
ABSTRACT.....	07
1 INTRODUÇÃO.....	08
2 OBJETIVO.....	20
3 MÉTODO.....	21
4 RESULTADOS.....	39
5 DISCUSSÃO.....	61
6 CONCLUSÃO.....	73
REFERÊNCIAS.....	74
ANEXO 1.....	90

## RESUMO

**INTRODUÇÃO:** Os nervos periféricos, assim como os demais tecidos do organismo, estão sujeitos a doenças inflamatórias, traumáticas, metabólicas, tóxicas, genéticas e neoplásicas. Estas doenças levam a diferentes tipos e graus de lesões. As lesões nervosas são bem conhecidas pela redução da capacidade funcional e diminuição da qualidade de vida dos pacientes, essas lesões induzem altos gastos socioeconômicos devido à reabilitação prolongada e absenteísmo dos jovens vítimas de trauma. Questiona-se se a Estimulação Elétrica (EE) e a terapia por Laser de Baixa Potência (LBP) teriam capacidade de melhorar a recuperação muscular e nervosa pós - neurorrafia látero - terminal (NLT). **OBJETIVO:** Analisar a eficiência da EE e da terapia por LBP na manutenção do músculo tibial cranial (MTC) e regeneração do nervo fibular comum pós NLT. **MÉTODO:** Trabalho aprovado pelo CEUA FMB - UNESP Nº 1154/2015. Foram utilizados 100 ratos da linhagem Wistar, machos, com massa média de 384,33 g e aproximadamente 9 semanas de vida. Os animais foram divididos em seis grupos experimentais. Grupo Controle, Grupo Desnervado, Grupo com Neurorrafia Látero -Terminal (NLT), Grupo com NLT e Estimulação Elétrica (EE), Grupo com NLT e LASER de baixa potência (LBP) e Grupo com NLT e combinação de EE e LBP (LBP+EE). O tratamento foi realizado durante 180 dias. Foram realizados testes funcionais e histológicos. **Análise Estatística:** Quando comparados os grupos, foi utilizado predominantemente teste Kruskal Wallis e método de Dunn, ANOVA, seguido pelo teste de TUKEY e o teste de Friedman para avaliar a evolução funcional ao longo do tempo. Em toda a análise, foi utilizado nível de significância  $p < 0,05$ . **RESULTADOS:** O Índice Funcional do Fibular (IFF) não mostrou diferença estatisticamente significativa entre os grupos EE, LBP e LBP+EE e o grupo controle. A morfometria muscular mostrou superioridade dos grupos EE e LBP em relação aos grupos NLT e LBP+EE. A morfometria das fibras nervosas mostrou superioridade dos grupos NLT e EE em relação aos grupos LBP e LBP+EE. A razão G mostrou o grupo EE superior aos demais. **CONCLUSÃO:** Com base em nosso modelo experimental, concluímos que todos os tratamentos puderam promover um grau de recuperação muscular, nervosa e funcional porém o grupo EE se destacou em relação aos demais.

**Palavras chave:** Estimulação Elétrica, LASER, Microcirurgia, Nervo Fibular Comum, Regeneração Nervosa

## ABSTRACT

**INTRODUCTION:** Peripheral nerves, as well as other tissues of the body, are subject to inflammatory, traumatic, metabolic, toxic, genetic and neoplastic diseases. These diseases lead to different types and degrees of injury. Nerve injuries are well known for reducing functional capacity and decreasing patients' quality of life. These injuries induce high socioeconomic costs due to prolonged rehabilitation and absenteeism of young trauma victims. It is questioned whether Electric Stimulation (ES) and Low Power Laser Therapy (LPLT) would have the capacity to improve muscle and nerve recovery after end to side neurorrhaphy (SEN). **OBJECTIVE:** To analyze the efficiency of ES and LPLT in the maintenance of cranial tibial muscle (CTM) and regeneration of the common fibular nerve post SEN. **METHOD:** Work approved by certificate No. 1154/2015 CEUA FMB - UNESP. One hundred Wistar rats, male, with a mean mass of 384.33 g and approximately 9 weeks of life, were used. The animals were divided into six experimental groups. Control group, denervated group, group with neurorrhaphy. Grupo Controle, Grupo Desnervado, Group with SEN, Group with SEN and Electrical Stimulation (ES), Group with SEN and low power LASER (LPL) and Group with SEN and combination of ES and LPL (LPL + ES). The treatment was performed for 180 days. Functional and histological tests were performed. Statistical analysis: When comparing the groups, were used predominantly, the Kruskal Wallis test followed by Dunn's method and ANOVA, followed by the TUKEY test and the Friedman test to evaluate the functional evolution over time. Throughout the analysis, significance level was used  $p < 0.05$ . **RESULTS:** The Fibular Functional Index (FFI) showed that there was no statistically significant difference between the EE, LBP and LBP+EE groups and the control group. The muscular morphometry showed superiority of the EE and LBP groups over NLT and LBP+EE groups. The nerve fibers morphometry showed superiority of the NLT and EE groups in relation to the LBP and LBP+EE groups. The G ratio showed the EE group higher than the others. **CONCLUSION:** Based on our experimental model, we conclude that all treatments could promote a goal of muscular recovery, nervous and functional, but the EE group stood out in relation to the others.

**Key words:** Electrical Stimulation, LASER, Microsurgery, Common Fibular Nerve, Nervous Regeneration

## 1 INTRODUÇÃO

Os nervos periféricos, assim como os demais tecidos do organismo, estão sujeitos a doenças inflamatórias, traumáticas, metabólicas, tóxicas, genéticas e neoplásicas (Girolami *et al.*, 2000). Estas doenças levam a diferentes tipos e graus de lesões (Politis *et al.*, 1982; Lundborg *et al.*, 1986).

As lesões em nervos periféricos usualmente provocam alterações na estrutura, metabolismo e atividade fisiológica do corpo celular neuronal, podendo interromper a inervação dos órgãos distais à lesão e, tratando-se de neurônio motor, o órgão comprometido é o músculo (Chem, 1978; Da-Silva, 1995; Valent *et al.*, 2018).

Os nervos periféricos compõem-se de tecido nervoso e de tecidos conectivos, os quais são auxiliares na manutenção da continuidade, nutrição e proteção aos neurônios. As fibras nervosas apresentam-se envolvidas por tecido conjuntivo, organizados em três níveis: epineuro, perineuro e endoneuro (Junqueira & Carneiro, 1999; Millesi *et al.*, 2007).

Em um corte transversal, o nervo é revestido por uma camada externa de tecido conjuntivo com boa vascularização, o epineuro. No epineuro, encontram-se fibroblastos organizados em camadas concêntricas e separados por fibras colágenas dispostas longitudinalmente (Junqueira & Carneiro, 1999).

Mais internamente, as fibras nervosas são organizadas em fascículos e, ao redor dos fascículos, encontra-se uma camada de tecido conjuntivo formada por fibroblastos e fibras colágenas dos tipos I e III. Esta camada é denominada de perineuro. O perineuro constitui uma barreira químico-mecânica às substâncias difusíveis e às lesões externas, mantendo o microambiente intrafascicular e conferindo resistência aos nervos (Junqueira & Carneiro, 1999).

No interior dos fascículos, encontram-se os feixes de fibras nervosas, as quais são formadas por um axônio envolvido por uma fina camada de tecido conjuntivo chamado endoneuro (Millesi *et al.*, 1995; Junqueira & Carneiro, 1999).

Ao redor das fibras nervosas, encontra-se uma camada de células de Schwann, as quais podem apresentar-se como mielínicas, que são formadoras de bainha de mielina, ou amielínicas, que não formam esta bainha (Burt, 1995).

Os nervos periféricos podem apresentar três padrões básicos de arquitetura intraneural de acordo com o número de fascículos: os monofasciculares, os oligofasciculares e os polifasciculares (Junqueira & Carneiro, 1999).

As fibras que compõem um nervo podem ser motores, sensitivos ou autonômicos, porém, em geral, os nervos apresentam mais de um tipo de axônio, sendo denominados de nervos mistos (Burt, 1995).

Após uma lesão do nervo periférico, ocorrem alterações morfológicas, fisiológicas, moleculares e metabólicas no segmento distal à lesão, em alguns nodos terminais do coto proximal e no corpo celular do neurônio. Esta série de alterações, relatadas inicialmente por Waller, em 1851, foram denominadas de degeneração “Walleriana” e propiciam o meio adequado à regeneração dos axônios (Fu & Gordon, 1997).

De acordo com o envolvimento anatômico do nervo e os achados clínicos após as injúrias, as lesões no nervo periférico foram, inicialmente, classificadas por Seddon (1943) em três níveis: neuropraxia (lesão tipo I), caracterizada por bloqueio localizado da condução elétrica, sem interrupção da continuidade axonal ou degeneração; axoniotmese (lesão tipo II), em que ocorre ruptura na continuidade do axônio, porém os tubos endoneurais permanecem intactos; e neurotmese (lesão tipo III), na qual ocorre ruptura de uma ou mais camadas de tecido conectivo do nervo periférico.

Sunderland (1968) subdividiu esta classificação em cinco níveis de lesões.

Na lesão Tipo I (correspondente à neuropraxia de Seddon), ocorre um bloqueio da condução do impulso nervoso devido a uma alteração exclusivamente na bainha de mielina do nervo. A continuidade dos axônios, excitabilidade da fibra nervosa e a integridade dos órgãos distais à lesão são preservadas.

Na lesão Tipo II (correspondente à axoniotmese de Seddon), ocorre perda da condução do impulso nervoso no sítio da injúria e no segmento distal do nervo devido à lesão do axônio do nervo, sendo preservado apenas o tubo endoneural.

As lesões do Tipo III, IV e V de Sunderland correspondem à neurotmese de Seddon. Sunderland subdividiu a neurotmese de acordo com o envolvimento anatômico do nervo, ou seja, lesão ao nível do endoneuro, perineuro e/ou epineuro.

Na lesão Tipo III, o endoneuro é comprometido estando preservados o perineuro e a bainha de mielina. Deste modo, a lesão fica limitada ao fascículo.

Na lesão do Tipo IV, ocorre a interrupção dos fascículos, devido ao comprometimento do endoneuro e do perineuro. Apenas o epineuro permanece preservado.

Nas lesões do Tipo V, ocorre a transecção total do tronco nervoso, envolvendo tubos endoneurais, perineuro e epineuro. Neste caso, é necessário reparo cirúrgico onde conseguimos boa recuperação, porém ainda abaixo dos resultados funcionais ideais.

As lesões nervosas são bem conhecidas pela redução da capacidade funcional e diminuição da qualidade de vida dos pacientes, essas lesões induzem altos gastos socioeconômicos devido à reabilitação prolongada e absenteísmo dos jovens vítimas de trauma (Huckhagel, 2018).

Nesse contexto, a microcirurgia vem apresentando papel fundamental no prognóstico dos pacientes vítimas desse mal. Dessa forma, estudos para o aprimoramento das técnicas microcirúrgicas de reparação nervosa são de vital importância e têm surtido grande interesse no meio científico a fim de reduzir o número de pessoas inválidas (Sato, 2005; Huckhagel, 2018).

O primeiro relato de regeneração nervosa foi feito por Galeno (131-201 d.C.) que estudou lesões de nervos periféricos mesmo estando limitado pela tecnologia da época, a observar apenas o que era visível a olho nu, no entanto, a primeira referência cirúrgica de reparo de lesões nervosas data de alguns séculos mais tarde, com Rhazes (850-932) e Avicenna (980-1037) (Majno, 1975; Brushart & Seiler, 1987; Sunderland, 1991; Zhao *et al.*, 1992). Porém, foi atribuído a William de Saliceto (1210-1277) o primeiro registro de uma neurorrafia (Terzis *et al.*, 1997).

Em 1873, Hueter (apud Murray *et al.*, 1994) descreveu a neurorrafia epineural como meio de restaurar a função moto-sensitiva após lesões nervosas. A neurorrafia perineural foi descrita por Langley & Hashimoto em 1917. Sunderland (1945) propagou o reparo de nervos periféricos. Kurze (1964) e Smith (1964) propuseram, simultaneamente, o uso do microscópio cirúrgico para melhorar a visualização e auxiliar nas técnicas cirúrgicas e, com isso, possibilitaram a obtenção de melhores resultados funcionais (Terzis *et al.*, 1997).

No reparo de lesões de nervos periféricos, quando se dispõem dos cotos proximais e distais, a neurorrafia término-terminal (NTT) é frequentemente, utilizada para fazer a união dos cotos do nervo lesado através de uma sutura (Rovak *et al.*, 2001).

Neste procedimento, realiza-se a aproximação dos condutos do epineuro, possibilitando a regeneração das fibras nervosas através da lesão. Essa técnica é conhecida como sutura epineural (Coleman, 1944; Bora, 1967; Bora Jr. *et al.*, 1976;

Bora Jr., 1978; Rouleau *et al.*, 1981; Millesi, 1985). Para se obter melhor orientação fascicular, pode-se utilizar a sutura perineural, também chamada de interfascicular ou funicular (Bora, 1967; Grabb *et al.*, 1970; Millesi *et al.*, 1972; Kleinert & Griffin, 1973; Ito *et al.*, 1976; Orgel & Terzis, 1977; Van Dulken & Thomeer, 1978; Millesi, 1982; McQuarrie, 1985). Normalmente é utilizada, com maior frequência, a sutura epineural, por ser mais rápida e igualmente eficiente (Bratton *et al.*, 1981; Braun, 1982).

Porém, uma das limitações da NTT é a necessidade de não haver perda de tecido nervoso (Seddon, 1963; Lundborg, 1987). Quando existe perda de tecido nervoso impedindo a junção da extremidade proximal e distal para realizar-se a sutura, pode-se usar enxerto de nervo autólogo (Millesi, 1972, 1986; Narakas, 1989; Wong & Scott, 1991; Millesi, 2007). Também existem os implantes com tubos de materiais aloplásticos ou enxertos de tubos de tecido autólogo (Colin & Donoff, 1984; Evans *et al.*, 1991; Hentz, 1991; Rodrigues & Silva, 2001; Colomé *et al.*, 2008; Patel, Lyon e Huang, 2018).

Enquanto os auto-enxertos de nervo são o padrão ouro atual para a reconstrução de danos extensivos aos nervos, o suprimento limitado de nervos autólogos e complicações associadas à retirada de nervos a partir de um segundo local cirúrgico conduziu grupos de várias disciplinas a desenvolver uma alternativa adequada ao auto enxerto (Patel, Lyon e Huang, 2018).

Quando há perda da extremidade distal do nervo pode-se utilizar a neurotização muscular direta (NMD), método descrito por Heineke, em 1914 (apud Papalia *et al.*, 2001), e por Elsberg (1917).

Porém, existem situações em que ocorre a perda do coto proximal. Nestes casos, sacrifica-se um nervo vizinho, menos importante, e o mesmo é seccionado, sendo seu coto proximal suturado ao coto distal do nervo a ser reconstruído. Pode-se usar enxerto de nervo entre estes dois cotos se for necessário. No entanto, esse procedimento determina déficit motor ao nervo doador e às estruturas por ele inervadas (Harris & Tindal, 1991; Lohman *et al.*, 1997). Além disso, a qualidade da recuperação funcional é menor quando a distância entre os cotos dos nervos forem maiores que seis centímetros (Ögün *et al.*, 2003).

Em 1903, Ballance *et al.* propuseram uma nova técnica como opção para evitar o sacrifício do nervo doador. Tratava-se da neurorrafia látero-terminal (NLT), na qual o coto distal do nervo a ser reconstruído era suturado à face lateral do nervo

doador. Porém, os movimentos dos músculos reinervados eram acompanhados de movimentos dos músculos inervados pelo nervo doador. Outros autores desta época (Ballance, 1923; Stookey, 1923; Gatta, 1938) também empregaram esta técnica, mas todos faziam incisão parcial no nervo doador. Esta lesão no nervo doador determinava união tipo término-terminal dos tubos endoneurais e prejuízo no nervo doador e às estruturas por ele inervadas. Isto levou Babcock (1927) a sugerir o abandono desta técnica.

Em 1992, Viterbo e Viterbo *et al.* propuseram a neurorrafia látero-terminal sem lesão no nervo doador e, até mesmo, sem a remoção do epineuro (Viterbo *et al.*, 1994a e b). Em trabalho experimental em ratos, Viterbo *et al.* (1992) realizaram a secção do nervo fibular comum, que inerva o músculo tibial cranial (MTC), e seu coto distal foi suturado à face lateral do nervo tibial intacto, sem a remoção do epineuro. Obtiveram, pela primeira vez, reinervação muscular sem prejuízo ao nervo doador. Essa técnica trouxe grande contribuição, pois, a partir daí, qualquer nervo pode ser utilizado como nervo doador sem prejuízos para este ou para as estruturas por ele inervadas. Diversos trabalhos comprovaram os achados de Viterbo, tanto experimental como clinicamente (Lundborg *et al.*, 1994; Viterbo *et al.*, 1994; Al-Qattan & Al-Thunyan, 1998; Liu *et al.*, 1999; Müller, 2001; Rovak *et al.*, 2001; Jaber *et al.*, 2003; Ögün *et al.*, 2003; Pardini *et al.*, 2005; Haninec *et al.*, 2007; Maciel *et al.*, 2013; Viterbo *et al.*, 2017).

Com relação à denominação de neurorrafia término-lateral (NTL) ou látero-terminal, há controvérsias na literatura. Ballance *et al.* (1903) descreveram o procedimento realizado como sendo anastomose término-lateral. Viterbo *et al.* (1992, 1994a, 1994b) utilizam os dois termos, neurorrafia látero-terminal ou término-lateral, conforme o nervo doador. Se o doador é suturado na lateral do receptor empregam o termo término-lateral. Quando o receptor é suturado na lateral do doador, denominam o procedimento de NLT. Embora existam diferenças básicas, o termo término-lateral é usado num sentido geral, podendo significar ambas as situações. Dellon *et al.* (2010) chama a atenção para a correta nomenclatura proposta por Viterbo *et al.* (1992).

Pelo seu ineditismo, a neurorrafia látero-terminal despertou grande interesse na comunidade científica. Por apresentar potencial considerável (Viterbo *et al.*, 1994a), diversos estudos experimentais de NLT vêm sendo realizados e muitos mostrando resultados bem sucedidos com esse tipo de neurorrafia (Viterbo, 1993;

Yoleri *et al.*, 2000; Galli *et al.*, 2002; Koh *et al.*, 2002; Kumar & Hassan, 2002; Yamamoto *et al.*, 2003; Hayashi *et al.*, 2004; Maciel *et al.*, 2013; Viterbo *et al.*, 2017).

A neurorrafia látero-terminal de nervo periférico tem sido sugerida em situações clínicas em que o segmento proximal do nervo lesionado não esteja disponível (Lundborg *et al.*, 1994, 2000).

No entanto, com todo o avanço técnico obtido com a microcirurgia, ainda não se obtém total recuperação motora, por melhor que tenha sido realizada a reparação do nervo (Sundeland, 1985), pois a recuperação completa da função motora depende da regeneração dos axônios e, durante o tempo de regeneração dos axônios, ocorre o processo de hipotrofia ou mesmo atrofia da musculatura inervada por este nervo, fato que promove prejuízo funcional para o músculo (Low & Reed 2001; Robinson & Snyder-Mackler, 2001; Starkey, 2001; Romão *et al.*, 2007; Maciel *et al.*, 2013).

Para tentar melhorar a recuperação funcional pós NLT, foram realizados estudos para avaliar o LASER como terapia regenerativa em casos de lesões de nervos periféricos (Camargo *et al.*, 2006; Câmara *et al.*, 2011; Wang CZ *et al.*, 2014; Andraus *et al.*, 2017; Andreo *et al.*, 2017; Rochkind, 2017).

A denominação LASER (Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation), é uma sigla oriunda da língua inglesa que significa “amplificação da luz por emissão estimulada de radiação (Low & Reed 2001).

O primeiro aparelho foi construído em 1960 por Theodore Maiman, cientista norte americano, em Malibu nos Estados Unidos da América. Ele utilizou o rubi como ativador e a luz produzida apresentou um comprimento de onda de 694, 3 nm (Andraus, 2009).

Atualmente os Lasers mais utilizados na prática da reabilitação englobam Hélio-Neônio (HeNe), Arsenieto de Gálio (GaAs), Arsenieto de Gálio e Alumínio (AsGaAl) e Arsenieto de Gálio e Índio (AsGaIn), que apresentam efeitos biomodeladores não térmicos, os chamados “Laser de Baixa Potência” (LBP) ou Low-level laser therapy (LLLT) (Low & Reed 2001).

A aplicação de laser de baixa potência tem sido utilizada para uso terapêutico no controle de mediadores envolvidos nos processos inflamatórios e para promover a maturação neural e regeneração após o nervo lesado (Camargo, 2006 Chen Y-J *et al.*, 2014). Os efeitos não térmicos produzidos pela radiação da baixa potência são amplamente discutidos, pois de certo modo não são conhecidos todos os

mecanismos nem todos os elementos que participam da conversão da energia luminosa em energia bioquímica, capaz de gerar processos tão discutidos como o analgésico ou o regenerativo (Abreu et al, 2011; Chen Y-J et al, 2014; Wang CZ et al, 2014; Takhtfooladi et al. 2015).

A terapia com LBP é uma técnica capaz de acelerar o processo de reparação de tecidos biológicos traumatizados (Abreu et al, 2011; Chen Y-J et al, 2014). Os mecanismos que envolvem o processo de bioestimulação estão em nível molecular (Abreu et al, 2011; Wang CZ et al, 2014). Neste caso, a luz penetra o interior do tecido onde é absorvido por determinados cromóforos, resultando no aumento do metabolismo celular através do aumento da síntese de ATP pelas mitocôndrias (Abreu et al, 2011). Pesquisas demonstram que a aplicação do LBP em determinadas patologias cutâneas possui a capacidade de estimular a proliferação de fibroblastos, além de diminuir o edema local, favorecendo a neovascularização e a regeneração neural (Abreu et al, 2011; Câmara et al, 2011; Chen Y-J et al, 2014; Takhtfooladi et al. 2015).

Os efeitos benéficos da terapia por raios laser de baixa potência sobre o tecido cutâneo já são conhecidos há longa data. De fato, a irradiação laser, principalmente do laser derivado dos gases Hélio e Neônio (HeNe), foi usada em diferentes disciplinas médicas para promover a regeneração epitelial (Nissan *et al*, 1986; Reddy *et al*, 2001), em cultura de células visuais de ratos (Rochkind *et al.*, 1987), em regeneração óssea (Saito & Shimizu, 1997).

Mais recentemente, avanços tecnológicos em microeletrônica têm possibilitado a construção de diodos geradores de laser que paulatinamente estão substituindo as antigas ampolas de HeNe, barateando, sobremaneira, os custos de produção e de aquisição. As publicações que demonstram os efeitos benéficos do LBP ainda são poucas, principalmente quando falamos de regeneração nervosa periférica, além disso, da mesma maneira que ocorre com a estimulação elétrica, não existe um consenso que defina qual o melhor comprimento de onda, dosagem e os demais parâmetros a serem usados para cada tipo de efeito desejado.

Para Karu (1987), entre os efeitos fisiológicos da terapia laser de baixa potência em longo prazo está o aumento da mitose e conseqüente divisão celular. A irradiação de fibroblastos humanos com um laser de HeNe aumentou significativamente o número de células em comparação com seus respectivos controles não irradiados. Um possível mecanismo é que a irradiação cause uma

recolocação no metabolismo celular, com a luz tendo o papel de controlador de disparo. Mudanças no nível de AMPc (Adenosina monofosfato cíclico) sugerem que os “quanta” de luz podem atuar como um estímulo proliferativo porque o AMPc está programado para estimular eventos de transcrição numa ampla variedade de células e possivelmente estes eventos poderiam gerar aumento da mitose.

Akgul et al. em 2014, encontraram efetividade no tratamento de lesões de nervos periféricos utilizando o LBP com 650 nm de comprimento de onda em modelo animal. As análises morfológicas desse estudo indicaram que o LBP tem a capacidade de reduzir a migração de células mononucleares ao nervo danificado, levando a uma diminuição das áreas de edema e regeneração mais rápida.

Em 2016, Mandelbaum-Livnat et al. encontraram, em modelo animal com o uso do LASER para preservação e recuperação do músculo conectado a um nervo periférico lesionado, que o LBP aumentou a atividade bioquímica e melhorou a recuperação morfológica muscular e por este motivo indicaram o uso com aplicações terapêuticas ao músculo especialmente na progressão da hipotrofia resultante de lesão nervosa periférica.

Andraus et al. em 2017, realizaram um estudo com ratos e lesão por esmagamento do nervo isquiático tratados com LBP de 830 nm nas densidades energéticas de (35, 70, 140 e 280 J/cm<sup>2</sup>) durante 21 dias. Os resultados funcionais, com o Índice Funcional do Isquiático e teste de força, mostraram que os grupos irradiados foram superiores ao grupo lesionado sem tratamento demonstrando recuperação da função neuromuscular.

Andreo et al., 2017, em uma revisão sistemática, além de mostrarem os efeitos positivos no processo de reparo neuromuscular usando tanto LBP vermelho quanto o infravermelho, com melhora funcional e morfológica, ainda chamam a atenção para a importância dos parâmetros que devem ser aplicados para alcançar regeneração em lesões de nervos periféricos. A maioria dos estudos com resultados positivos utilizam LASER com potência superior a 50 mW e energia total superior a 15 J aplicada em múltiplos pontos.

Andreo et al. (2017) ainda chamam a atenção para a descrição inadequada dos parâmetros de radiância que impedem entendimento de muitos estudos que relatam resultados promissores. A falta da descrição do modo de aplicação, frequência (modo pulsado), área do feixe, energia e também início e a frequência do tratamento, torna a reprodutibilidade de experimentos impossíveis, já que diferenças

nessas parâmetros têm efeitos diferentes. Esta falha em descrever o protocolo constitui um obstáculo à interpretação das descobertas.

Outro agente que poderia apresentar algum resultado positivo neste tratamento seria a estimulação elétrica com finalidade regenerativa, que embora controvertida, (Nemeth, 1982; Kanaya & Tajima, 1992; Williams, 1996; Iñigo, 1998; Kotwal & Schmidt, 2001; Souza *et al.*, 2001; Carvalho *et al.*, 2002), tornou-se objeto de estudo na recuperação funcional muscular, pois a mesma pode ser aplicada como método de prevenção da atrofia muscular que retardaria e, em alguns casos, evitaria a perda de tecido muscular resultante de um período de inatividade ou por desnervação (Guyton, 1986; Low & Reed 2001; Robinson & Snyder-Mackler, 2001; Maciel *et al.*, 2013).

No final do século XVIII, Galvani foi quem primeiro publicou experiências com preparados neuromusculares e eletricidade em animais. Por mais de dois séculos, os biólogos trabalharam com a revelação de que o músculo esquelético se contrai ao ser estimulado com eletricidade e que, ao contrair-se por qualquer motivo, gera uma corrente ou tensão perceptível. As descobertas de Galvani marcaram o início da neurofisiologia e do estudo da dinâmica da contração muscular (Basmajian, 1976).

As investigações sobre o uso da eletroestimulação com finalidade regenerativa são extensas, porém os procedimentos utilizados ainda são controvertidos. Portanto, não há consenso quanto à intensidade, à frequência, à duração e aos métodos de avaliação utilizados. Vários autores, como Tagami *et al.* (2009) e Maciel *et al.* (2013), que observaram regeneração axonal durante a aplicação de eletroestimulação em ratos referem ser benéfica e sem prejuízos funcionais (Nemeth, 1982; Kanaya & Tajima, 1992; Williams, 1996; Iñigo, 1998), ao contrário de outros, que afirmam ser nociva, provocando contraturas e espasmos (Kotwal & Schmidt, 2001; Souza *et al.*, 2001; Carvalho *et al.*, 2002).

Alguns pesquisadores afirmam que a EE provoca fadiga muscular mais rapidamente que a contração voluntária (Ruffin & Kinningham, 1993; Ward & Shkuratova, 2002; Kisner & Colby, 2005). Porém, o real mecanismo que provoca este efeito ainda está sendo estudado.

Acredita-se que este mecanismo envolve o tipo de fibra muscular estimulada. Segundo Tessitore *et al.* (2008) as fibras musculares fásicas apresentam pequena concentração de mioglobina, têm grande potência e velocidade de contração porém

entram em fadiga rapidamente. Já as fibras tônicas têm grande quantidade de mioglobina e são resistentes à fadiga.

Conforme Henneman *et al.* (1965), a ativação das unidades motoras nas contrações voluntárias ocorre das menores para as maiores unidades. Isto é conhecido como “princípio do tamanho das fibras de Henneman” e serve como uma proteção contra a fadiga, uma vez que as menores unidades motoras são formadas por fibras musculares tônicas e, por isso, menos susceptíveis à fadiga. A fadiga muscular precoce provocada por EE ocorre devido a uma reversão deste princípio ocorrendo ativação das fibras fásicas antes das fibras tônicas levando a uma fadiga muscular precoce (Neto, 2007).

Gregory (2005) e Bickel *et al.* (2003) discordam do reversão do princípio de Henneman e sustentam que a eletroestimulação realiza um recrutamento não seletivo das fibras musculares e, por este motivo, as fibras fásicas entram em funcionamento antes do necessário provocando fadiga precoce.

As duas explicações só reforçam que o uso da EE deve ser muito bem controlado, devendo-se buscar o protocolo ideal para cada situação, pois existe grande variedade de parâmetros para serem ajustados, do contrário, corremos o risco de não alcançarmos os resultados esperados (Maciel, 2010; Maciel *et al.*, 2013).

Atualmente, a estimulação elétrica para aumentar o desempenho do músculo esquelético já é aceita e, constantemente, demonstrada em estudos experimentais e clínicos (Ruffin & Kinningham, 1993; Snyder-Mackler *et al.*, 1994; Gordon, 2016).

Diversos estudos disponíveis investigam o papel da estimulação elétrica como forma de induzir fortalecimento muscular em humanos (McIntyre & Robertson, 1992; Fonseca *et al.*, 2001; Wilk & Reinold, 2001; Stiene *et al.*, 1996; Cabral & Monteiro-Pedro, 2003; Maciel 2010). A força muscular é uma propriedade que pode ser alterada por fatores externos, como a atividade física voluntária, e, segundo alguns autores, pela estimulação elétrica (Fox, 1975; Ruffin & Kinningham, 1993; Thomeé *et al.*, 1995; Baker & Juhn, 2000; Cowan *et al.*, 2001; MacGregor *et al.*, 2004; Doucette & Child, 1996; Sperandei, 2005).

Rutherford & Jones (1986) sugerem que parte do efeito do treinamento realizado por estimulação elétrica pode estar na facilitação neural em função de um número maior de unidades motoras ativas e aumento na taxa de impulsos ou em um padrão mais eficiente de recrutamento. Muitos trabalhos sugerem que a estimulação

elétrica sozinha ou combinada com exercícios voluntários pode ser mais eficiente no aumento de força muscular do que apenas os exercícios voluntários (Fox, 1975; McIntyre & Robertson, 1992; Ruffin & Kinningham, 1993).

O estudo da regeneração nervosa e da recuperação de um músculo após neurorrafia pode ser realizado pela observação das alterações histológicas, pela medida da velocidade de condução elétrica, pela análise eletromiográfica ou pela resposta isométrica do músculo submetido à contração tetânica, ou em situações especiais, como no caso do nervo isquiático em ratos, em que o animal é submetido à análise da marcha (De Medinacelli *et al.*, 1982; Bain *et al.*, 1989; Sato, 2005).

Através da observação destes atributos, diversos autores confirmaram a ocorrência tanto de brotamento colateral motor quanto sensorial, após a neurorrafia látero-terminal, com subsequente recuperação fisiológica do músculo previamente desnervado e recuperação funcional significativa (McCallister *et al.*, 1999; Lutz *et al.*, 2000a; Goheen-Robillard *et al.*, 2002; Hayashi *et al.*, 2004; Beris *et al.*, 2007; Brenner *et al.*, 2007; Matsuda *et al.*, 2008; Beris & Lykissas, 2009; Maciel *et al.*, 2013; Viterbo *et al.*, 2017).

Goheen-Robillard *et al.* (2002) mostraram que a regeneração sensorial ocorre, predominantemente, em uma neurorrafia látero-terminal quatro a seis meses após a cirurgia enquanto Yamamoto *et al.* (2007) observaram regeneração motora com 21 meses de pós-operatório.

A EE é capaz de aumentar a atividade de enzimas oxidativas em fibras musculares, realçar a regeneração muscular e prevenir a atrofia muscular esquelética (Pette & Staron, 1997). Além dos efeitos metabólicos, a EE está relacionada à redução dos danos da imobilização, minimizando a redução da área de secção transversal, fibrose intersticial e deficiência de suprimento sanguíneo (Qin *et al.*, 1997). A EE também promove o aumento da efetividade contrátil das fibras musculares, viabilizando, desse modo, a dinâmica de captação via GLUT-4, metabolismo da glicose e a atividade das vias metabólicas celulares (Guirro *et al.*, 2004). O transportador de glicose expressado, predominantemente, no músculo esquelético é o GLUT-4 (James *et al.*, 1989) e sua expressão, além de ser dependente da ação da insulina, também é relacionada à contratilidade do músculo, existindo, assim, clara associação entre o transporte de glicose nas fibras musculares e o grau de contração muscular basal (Gaster *et al.*, 2000).

Por esses motivos, parte das pesquisas tem ocorrido com objetivo de avaliar a funcionalidade de um músculo reinervado por neurografia látero-terminal e também se preocupa em propor intervenções pós NLT visando aperfeiçoar a recuperação funcional na região reinervada (Tang, 1995; Fansa *et al.*, 1999; Durigan *et al.*, 2006). Uma dessas possibilidades é a estimulação elétrica neuromuscular que, durante anos, tem sido objeto de estudo em eletrofisiologia (Dow *et al.*, 2004; Durigan *et al.*, 2006; Romão *et al.*, 2007; Russo *et al.*, 2008; Carvalho *et al.*, 2009; Polônio *et al.*, 2010; Maciel *et al.*, 2013; Wang CZ *et al.*, 2014; Elzing *et al.*, 2015; Willand *et al.*, 2015; Gordon, 2016).

Ainda não se conhece todas as possibilidades de recuperação de uma musculatura reinervada por neurografia látero-terminal, porém, alguns trabalhos confirmam a passagem de estímulo elétrico através da mesma e registro de atividade no músculo reinervado (Giovanoli *et al.*, 2000; Isaacs *et al.*, 2005; Maciel *et al.*, 2013; Viterbo *et al.*, 2017).

No entanto, a necessidade funcional de um paciente vai além da passagem do estímulo pela junção entre o nervo doador e o nervo receptor. O músculo reinervado deve apresentar características fisiológicas que permitam boa função. Uma das características mais importantes que um músculo hígido deve apresentar é a capacidade de produzir tensão durante a contração objetivando promover movimento (Enoka, 2000).

Dentro desse vasto universo de possibilidades terapêuticas, questiona-se se a EE e o LBP teriam capacidade de melhorar a recuperação muscular e nervosa pós NLT. Acreditamos que os resultados encontrados neste estudo também se aplicarão na NTT, porém como a NLT é mais recente e o fato de não lesar o nervo doador aumentar seu potencial e, por isso, certamente foi cada vez mais utilizada, nós resolvemos estudar na NLT. A expectativa de responder a esse questionamento justificou a realização desta pesquisa.

**2 OBJETIVO**

Analisar a eficiência da EE e da terapia por LBP na manutenção do músculo tibial cranial e regeneração do nervo fibular comum pós NLT em ratos.

### 3 MÉTODO

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Cirurgia Experimental do Departamento de Cirurgia e Ortopedia da Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP.

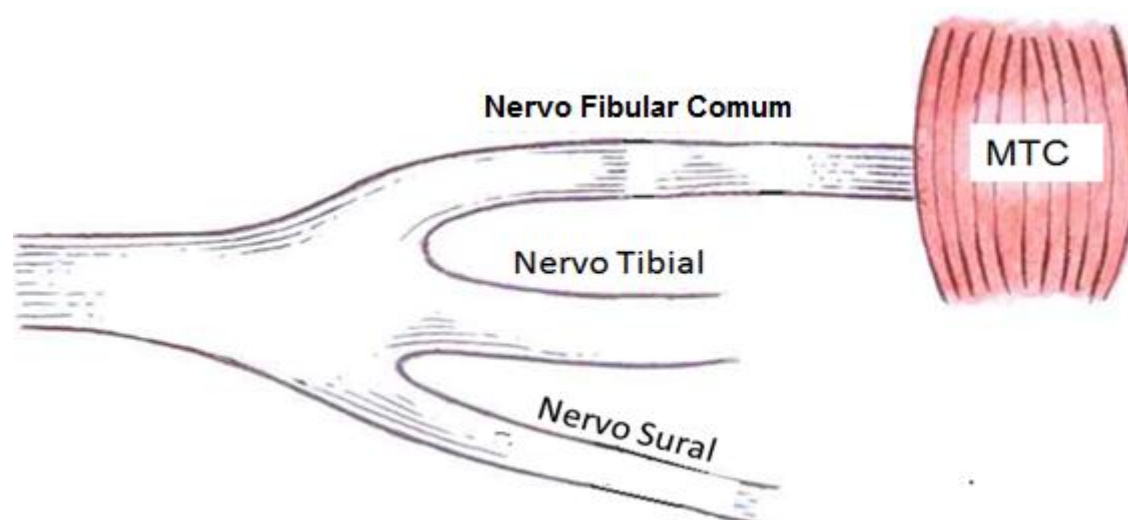
#### Animais

Todo o procedimento foi realizado de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e passou por análise da Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina da UNESP – Campus de Botucatu, sendo aprovado sob o Protocolo nº. **SIPE-70/2015 -- CEUA-1154 (Anexo 1)**.

Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central da UNESP – Campus de Botucatu. Foram utilizados 100 ratos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Wistar, machos, com massa média de 385,3 ( $\pm 48.04$ ) g. Os animais foram divididos, através de sorteio, em seis grupos experimentais. Os animais foram sacrificados após 180 dias de tratamento.

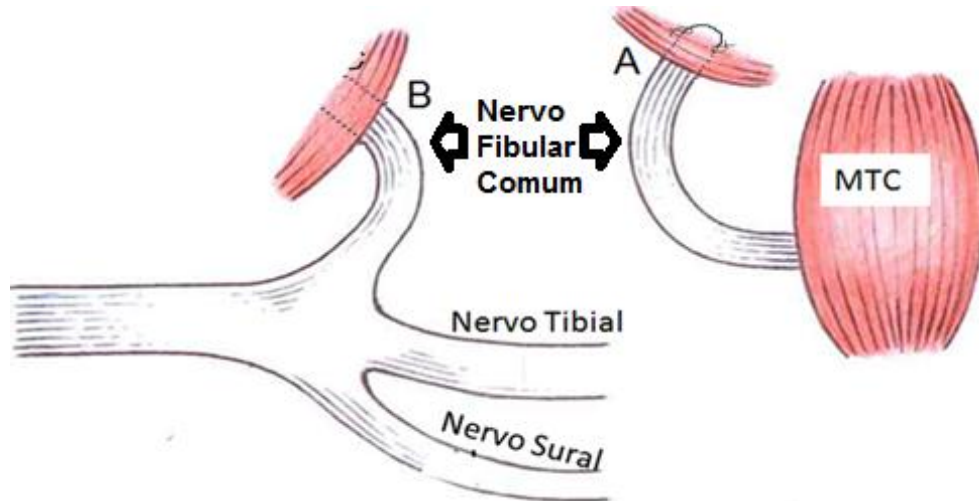
#### Grupos experimentais

No Grupo Controle (Controle), com 10 animais, foi dissecado o nervo fibular comum, contudo, este não sofreu secção ou neurorafia (Fig. 1).



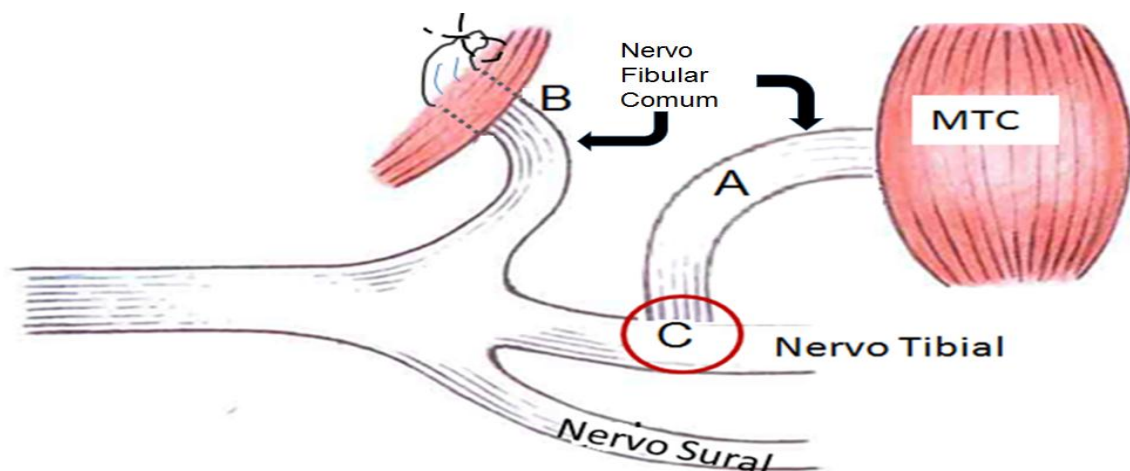
**Figura 1** – Indica o procedimento cirúrgico do grupo Controle. **MTC**: Músculo Tibial Cranial.

No Grupo Desnervado (Desnervado), com 10 animais, o nervo fibular comum foi seccionado e seus cotos foram invertidos 180 graus. O coto distal foi fixado à musculatura subjacente. O coto proximal foi transpassado por uma incisão na musculatura glútea e suturado no plano subcutâneo a fim de impedir contaminação motora (Fig. 2).



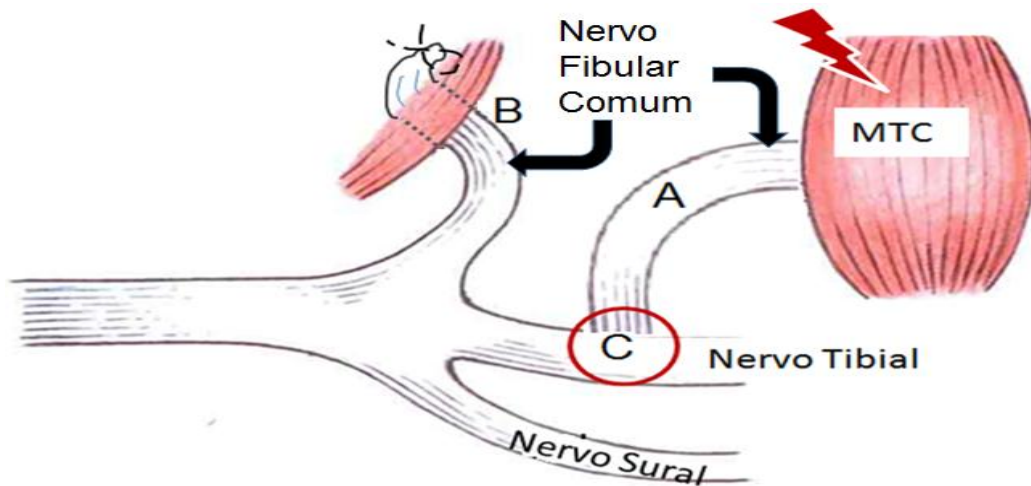
**Figura 2** – Indica o procedimento cirúrgico do grupo Desnervado. **A:** Coto distal do nervo fibular comum. **B:** Coto proximal do nervo fibular comum. **MTC:** Músculo Tibial Cranial.

No Grupo Neurorrafia Látero-terminal (NLT) com 20 animais, o nervo fibular comum foi seccionado e seu coto proximal encurvado medialmente 100°, transfixado à musculatura adjacente e foi suturado na face superficial dessa musculatura, impedindo a regeneração espontânea. O coto distal do nervo fibular comum foi encurvado, aproximadamente 80°, e suturado lateralmente ao nervo tibial (Fig. 3)



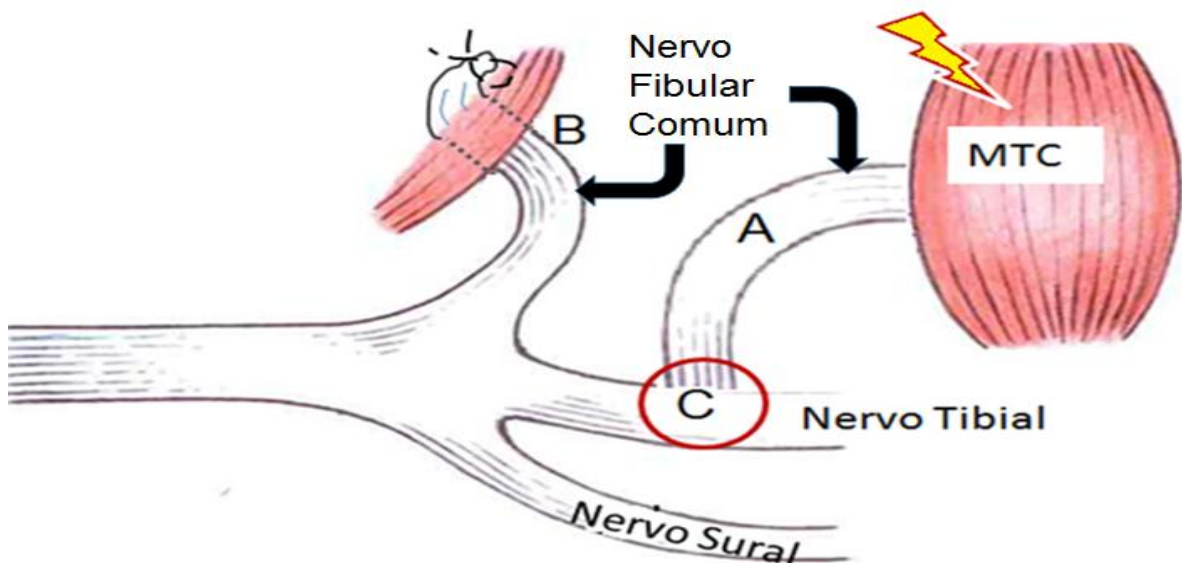
**Figura 3** – Indica o procedimento cirúrgico do grupo NLT. **A:** Coto distal do nervo fibular comum. **B:** Coto proximal do nervo fibular comum. **C:** Neurorrafia Látero-terminal. **MTC:** Músculo Tibial Cranial.

No Grupo Neurorrafia Látero-terminal e Estimulação elétrica (EE), com 20 animais, o procedimento realizado foi o mesmo que no grupo NLT, porém, após a cirurgia, os animais receberam estimulação elétrica no músculo tibial cranial como tratamento (Fig. 4).



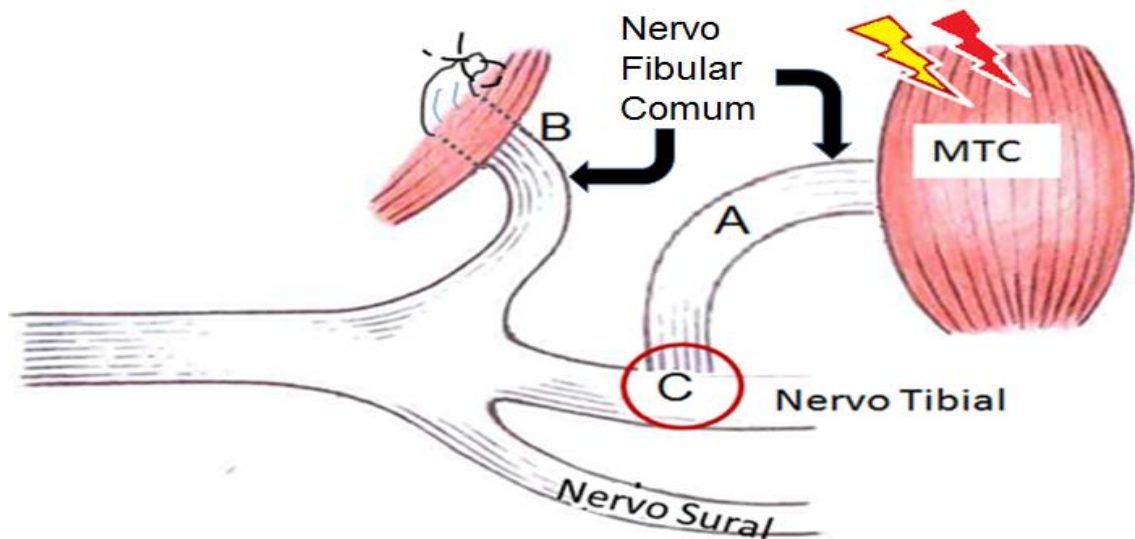
**Figura 4** – Indica o procedimento cirúrgico do grupo NLTE. **A:** Coto distal do nervo fibular comum. **B:** Coto proximal do nervo fibular comum. **C:** Neurorrafia Látero-terminal. **MTC:** Músculo Tibial Cranial. **Raio Vermelho:** Indica tratamento com EE do MTC.

No Grupo Neurorrafia Látero-terminal e LASER de Baixa Potência (LBP), com 20 animais, o procedimento realizado foi o mesmo que no grupo NLT, porém, após a cirurgia, os animais receberam tratamento por LASER (Fig. 5).



**Figura 5** – Indica o procedimento cirúrgico do grupo NLTE. **A:** Coto distal do nervo fibular comum. **B:** Coto proximal do nervo fibular comum. **C:** Neurorrafia Látero-terminal. **MTC:** Músculo Tibial Cranial. **Raio Amarelo:** Indica tratamento com LASER.

No Grupo Neurorrafia Látero-terminal com EE e LASER (LBP+EE), com 20 animais, o procedimento realizado foi o mesmo que no grupo NLT, porém, após a cirurgia, os animais receberam tratamento por LASER e Estimulação Elétrica (Fig. 6).



**Figura 6** – Indica o procedimento cirúrgico do grupo LBP+EE. **A:** Coto distal do nervo fibular comum. **B:** Coto proximal do nervo fibular comum. **C:** Neurorrafia Látero-terminal. **MTC:** Músculo Tibial Cranial. **Raio Amarelo:** Indica tratamento com LASER. **Raio vermelho:** Indica tratamento com Estimulação Elétrica.

### Cirurgia

Todos os procedimentos cirúrgicos e de coleta foram realizados pelo pesquisador, padronizando-se o método.

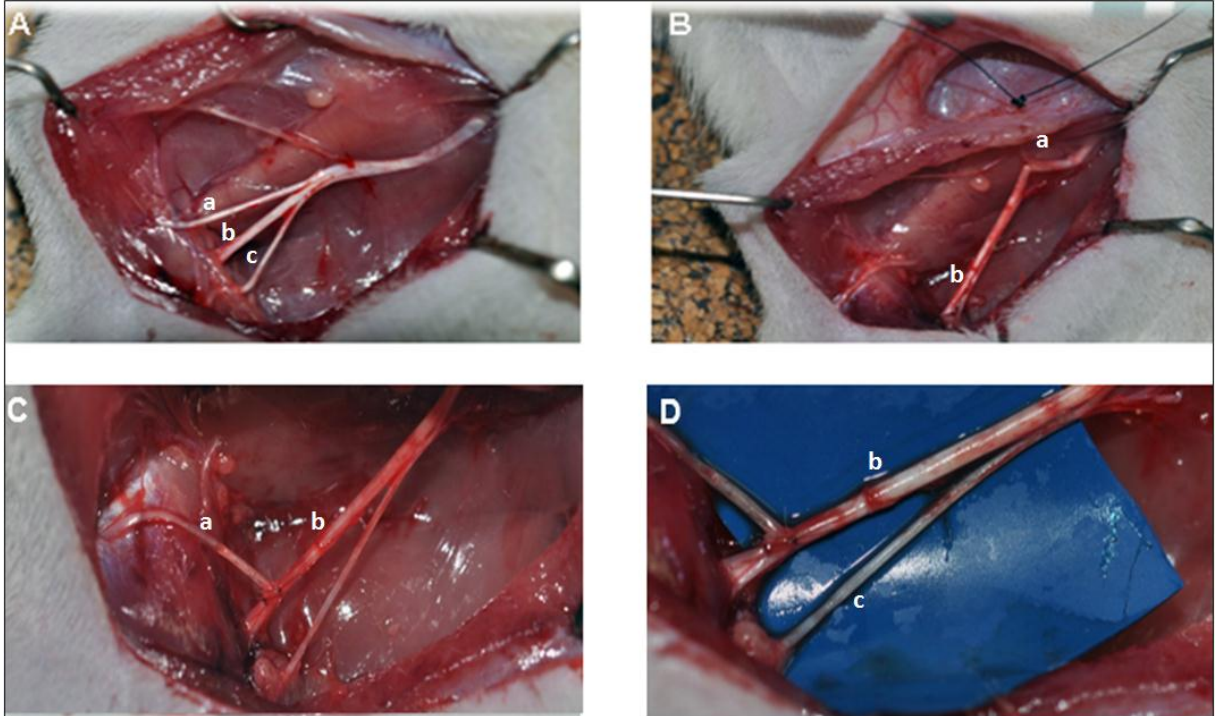
Precedendo cada procedimento cirúrgico, os animais foram anestesiados com ketamina (70 mg/Kg) e xilasina (30 mg/Kg) intramuscular e tricotomizados.

A face dorsolateral de um dos membros pélvicos, direito ou esquerdo, escolhidos por sorteio e marcados adequadamente, sofreu incisão de 2 a 3 cm longitudinalmente ao maior eixo do membro, comprometendo pele e subcutâneo com posterior divulsão da musculatura. Os nervos isquiático, fibular comum, tibial e sural foram dissecados.

Após, foi realizado o procedimento, de acordo com o grupo experimental.

As cirurgias foram realizadas com o auxílio de microscópio cirúrgico DF Vasconcelos com aumentos de 10 e 16 vezes.

Todo o procedimento foi realizado no mesmo ato cirúrgico. As neurorrafias foram realizadas com fio monofilamentar de nylon 10-0 com agulha cilíndrica e circular, sem retirada de janela de epineuro e com dois pontos simples (Fig. 7).



**Figura 7** – Indica o procedimento cirúrgico em membro pélvico esquerdo do animal. **a:** Nervo Fibular Comum. **b:** Nervo Tibial. **c:** Nervo Sural. **A:** Exposição do nervo isquiático e seus ramos, nervo fibular comum, nervo tibial e nervo sural. **B:** Coto proximal do nervo fibular comum transfixando a musculatura adjacente e sendo suturado na face superficial dessa. **C:** Neurorrafia Látero-terminal do nervo fibular comum na lateral do nervo tibial. **D:** Outra visão da NLT.

Após o procedimento, a incisão foi suturada por planos com pontos simples utilizando-se fio monofilamentar de náilon 4-0 na musculatura e pele.

Os animais foram mantidos em caixas apropriadas, contendo três animais cada, em temperatura controlada ( $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ), ciclo claro-escuro de 12 horas, com ração e água *ad libitum*, até o momento do sacrifício.

### Estimulação Elétrica

A estimulação elétrica foi iniciada com cinco dias de pós-operatório. Os animais dos grupos EE e LBP+EE passaram por três sessões semanais durante os 180 dias. Receberam aplicações de estimulação elétrica para o músculo tibial cranial com Corrente Alternada Sincronizada, com frequência de base de 1Khz, modulação em 10 Hz, com duração de 2 ms (da modulação), tempo de contração de 10

segundos por 20 segundos de relaxamento, durante 10 minutos. A corrente inicial foi de 8 mA sendo aumentada para 12 mA após cinco minutos para evitar o efeito de acomodação do tecido muscular. Foi utilizado estimulador elétrico Neurodyn 10 Canais da empresa Ibramed (Fig. 8).

O protocolo utilizado foi determinado após dois estudos pilotos, um para determinar a intensidade de corrente necessária para provocar contração muscular no rato sem anestesia e outro para determinar a frequência de estimulação e número de tratamentos semanais. O protocolo foi o mesmo utilizado em Maciel et al. (2013).



**Figura 8** – Estimulador Elétrico Neurodyn 10 Canais (IBRAMED)  
(Auxílio FAPESP 2010/09866-2).

Os animais foram estimulados acordados e sem anestesia. Para isto foi utilizado uma cápsula metálica com abertura posterior para a cauda e duas aberturas laterais para fixação dos membros posteriores. Após esta imobilização, os eletrodos de um centímetro quadrado de área foram fixados sobre o ventre do MTC com fita crepe. Foram utilizadas 10 cápsulas, ao mesmo tempo, para otimizar o tempo de estimulação (Figs. 9 e 10).



**Figura 9** – Animais recebendo estimulação elétrica.



**Figura 10** – Posicionamento dos animais na cápsula de estimulação.

### **Laserterapia**

Foi utilizado o aparelho de LASER infra vermelho (IV) de Arsenieto de Galio (GaAs) denominado Endophoton da empresa (Amparo – SP) (Fig. 11), com comprimento de onda de 904 nm, potência de 50 mW, área do feixe de 0,067 cm<sup>2</sup>, penetração aproximada de 1,5 cm, da forma contínua. A forma de aplicação foi pelo

método transcutâneo pontual e em contato (para reduzir a reflexão), com energia de 4J (80 s por ponto), em cada ponto, com o total de 3 pontos ao longo da cicatriz cirúrgica com os ratos tricotomizados. A laserterapia foi iniciada no quinto dia de pós-operatório, com aplicações três vezes por semana durante os 180 dias (Fig. 12).



**Figura 11** – Aparelho de Laserterapia Endophoton da KLD (Amparo – SP)



**Figura 12** – Pontos de aplicação do LASER ao longo da cicatriz cirúrgica do animal.

## Testes realizados

Todos os testes foram realizados e os resultados analisados pelo pesquisador.

### Teste de avaliação da marcha

A cada 30 dias os animais foram submetidos ao teste de avaliação da marcha.

Os animais previamente treinados andaram em uma canaleta de 9 cm de largura por 78 cm de comprimento tendo seu assoalho coberto com uma tira de papel branco de tamanho apropriado, após terem seus pés posteriores pintadas com tinta nanquim preta para marcar a pegada no papel (Fig. 13).



**Figura 13** – Teste de avaliação da marcha.

As pegadas deixadas na folha de papel foram analisadas através das medidas descritas a seguir:

CPN (Comprimento da pegada do pé normal);

CPE (Comprimento da pegada do pé experimental);

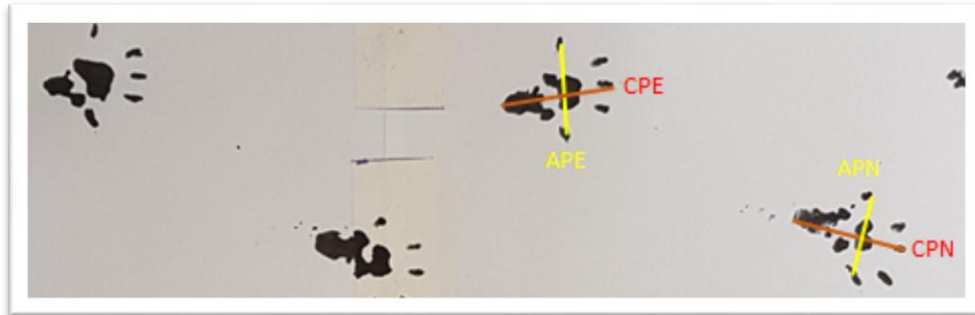
APN (Abertura total do pé normal);

APE (Abertura total do pé experimental).

A partir destas medidas foram realizados os cálculos do índice funcional do nervo fibular comum (IFF), segundo Bain *et al.* (1989) (Fig. 14).

$$\text{IFF} = 174,9 \times \frac{\text{CPE} - \text{CPN} + \text{APE} - \text{APN}}{\text{CPN} + \text{APN}}$$

CPE + 80,3    APN -13,4



**Figura 14** – Medidas realizadas para cálculo do índice funcional do nervo fibular (IFF).

### Teste eletrofisiológico

Para a realização do teste eletrofisiológico a temperatura ambiente ficou mantida em torno de 25°C.

O teste eletrofisiológico foi realizado antes do sacrifício dos animais.

Após anestesia com ketamina (70 mg/Kg) e xilasina (30 mg/Kg) intramuscular, os animais foram imobilizados em decúbito ventral. Foram realizadas tricotomia e ampla incisão no membro posterior previamente operado, permitindo acesso aos nervos isquiático, fibular comum, tibial e músculo tibial cranial. O potencial de ação composto foi registrado por eletrodos de agulha ativo e de referência.

O eletrodo vermelho (referência) foi colocado no tendão do músculo tibial cranial do rato; o eletrodo preto (ativo), no ventre do músculo tibial cranial do rato, e o eletrodo cinza (dispersivo), introduzido em local distante da região estudada.

Os eletrodos registraram a área, a duração, a amplitude e a latência do potencial de ação muscular. Foram realizados três conjuntos de medidas para cada animal com o nervo tibial seccionado distalmente à NLT, sendo escolhido um conjunto, aquele que apresentava a maior amplitude registrada.

A avaliação das propriedades funcionais do músculo foi feita através de estímulos elétricos deflagrados por um eletrodo bipolar, especialmente desenvolvido para este propósito, cujo cátodo e ânodo estavam a 2 mm um do outro. O eletrodo de estimulação bipolar foi posicionado diretamente sobre o nervo isquiático ou tibial, proximalmente à neurorrafia, possibilitando a propagação dos impulsos elétricos através dela. A frequência do estímulo foi fixada em 1 pps e a duração em 100 µs. A

intensidade de estímulo que foi utilizada, constante em todos os animais, foi de 5,1 volts. Foi utilizado eletromiógrafo da marca Sapphire II 4ME (Fig. 15).



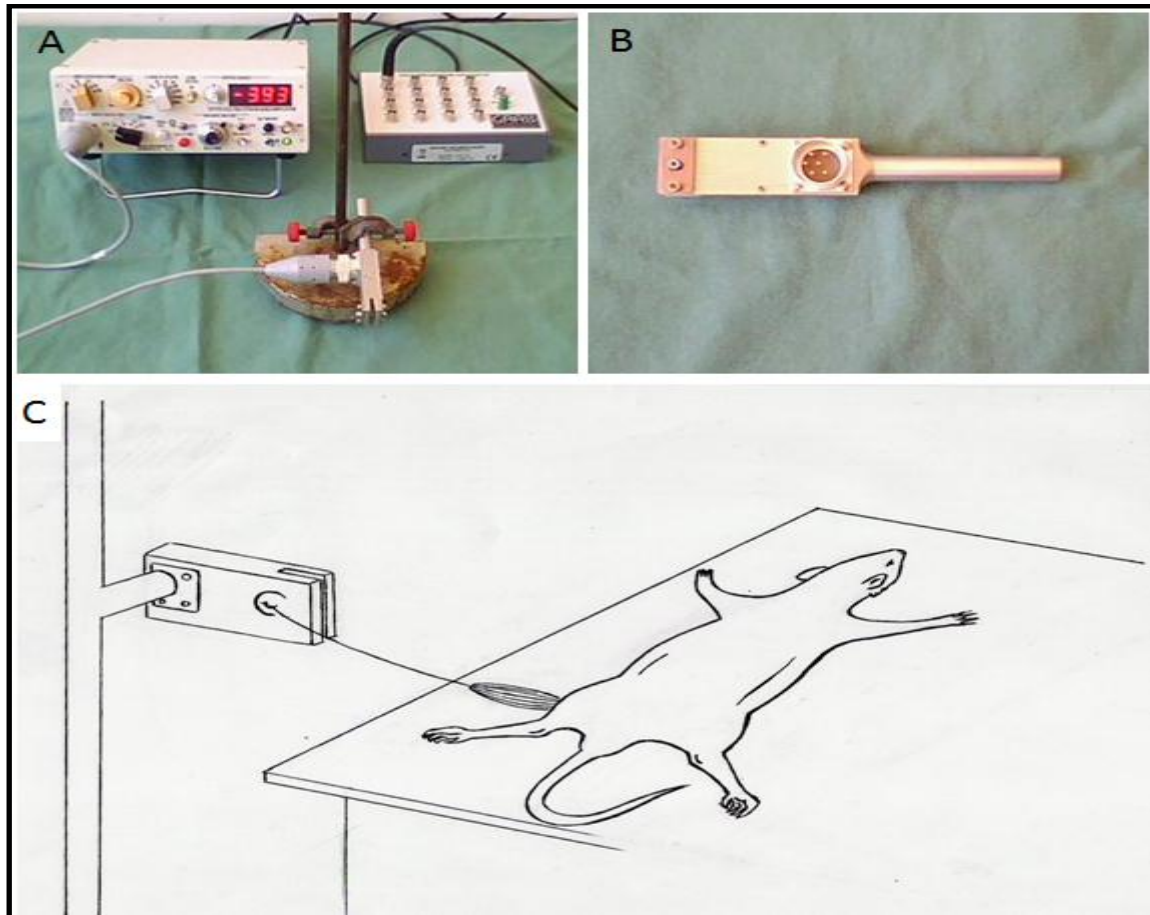
**Figura 15** – Teste eletrofisiológico. **A:** Estimulação bipolar proximalmente à neurorrafia e os eletrodos de captação em agulha localizados no MTC. **B:** Eletromiógrafo. **C:** Traçado eletrofisiológico.

### Força de contração do MTC

Após a realização do teste eletrofisiológico, o tendão distal do músculo tibial cranial foi seccionado e acoplado a um transdutor de força FT03 da empresa Grass Technologies, usando sutura com fio de náilon 4-0. O músculo foi tracionado pelo fio de náilon aumentando seu comprimento até que esta tração determinasse uma tensão com carga de 0,18 N. Este valor de pré-tensionamento foi determinado durante a calibração do dispositivo e foi reajustado entre os testes.

Os eletrodos do estimulador elétrico Neurodyn 10 foram posicionados diretamente no MTC exposto. O ensaio de contração muscular consistiu em três aplicações sequenciais de 1s com corrente nas mesmas especificações da corrente utilizada para o tratamento dos animais do grupo EE. Um computador registrou os

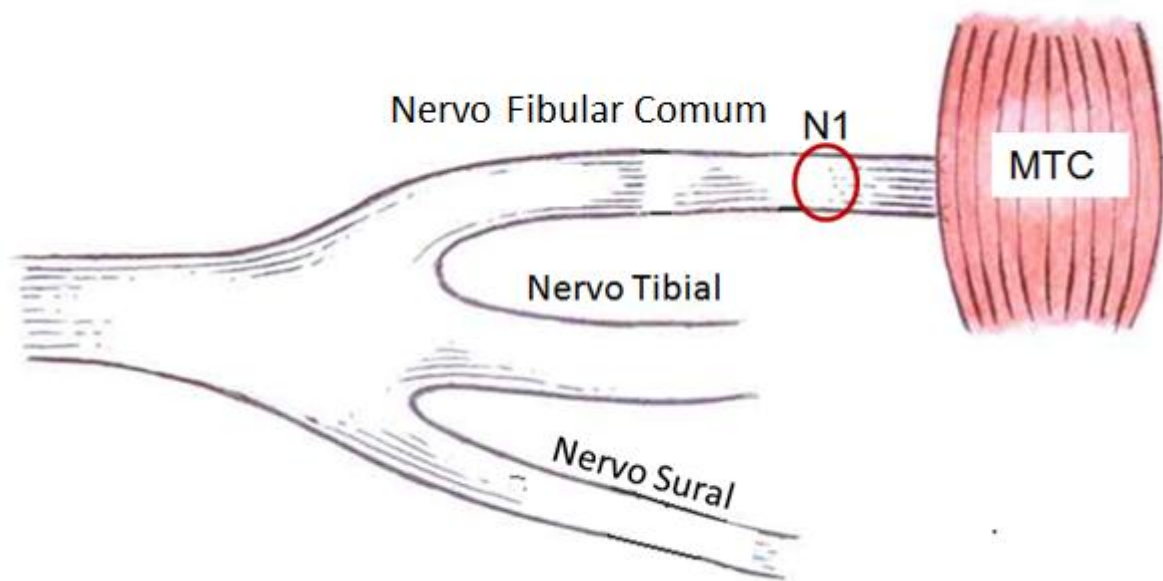
picos de força. A tensão muscular foi reajustada entre as medições. O teste de contração tetânica foi realizado com 100 mA com frequência de 100 Hz (Fig. 16).



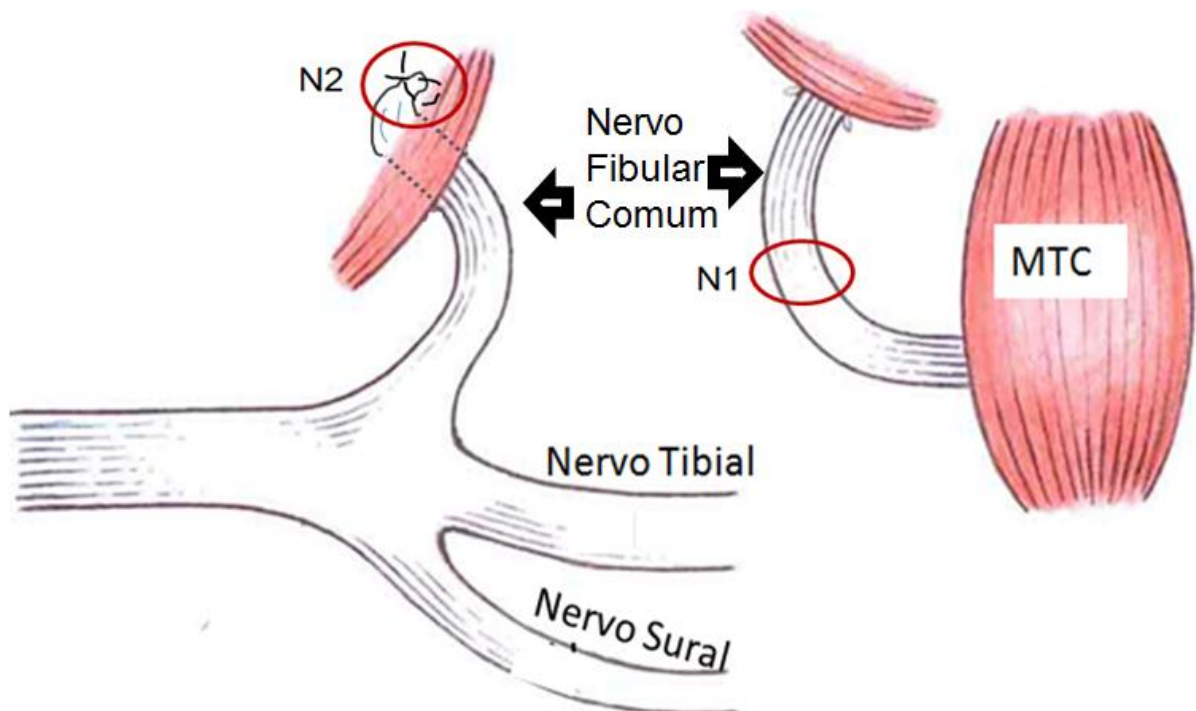
**Figura 16** – Teste de força de contração muscular. **A:** Componentes do transdutor de força. **B:** Transdutor de força FT03 (Auxílio FAPESP 2010/09866-2). **C:** Esquema de conexão do MTC com o transdutor de força.

### Coleta das peças histológicas e sacrifício

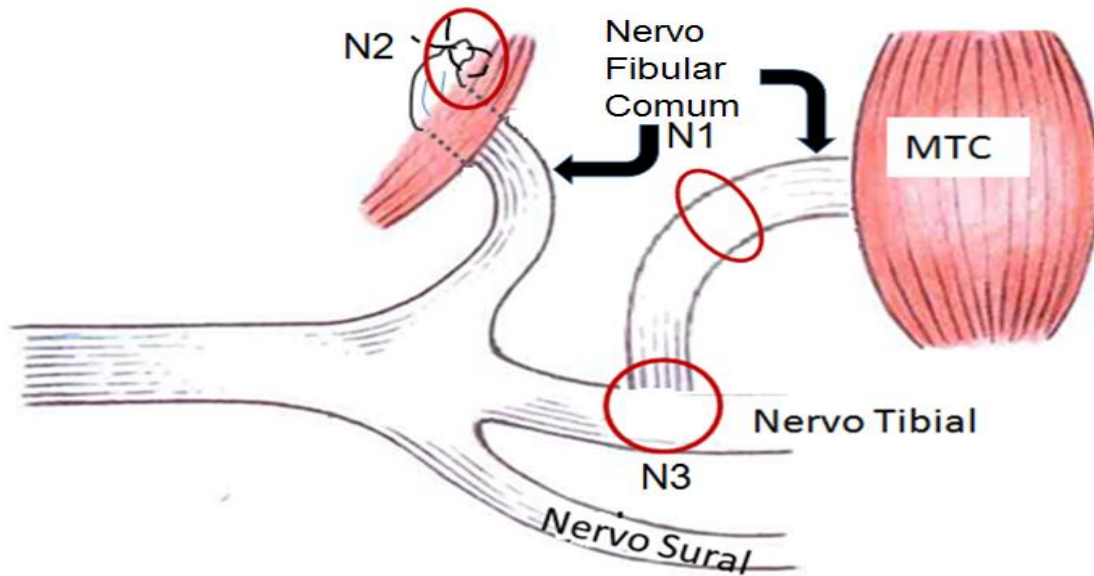
Após a realização do teste de força muscular os animais receberam dose letal de pentobarbital sódico, administrado intraperitonealmente, e procedeu-se à coleta de segmentos do nervo fibular comum, das neurorrafias, assim como à coleta do músculo tibial cranial direito e esquerdo (Figs. 17-19).



**Figura 17** – Estão indicados nessa figura os fragmentos que foram coletados para realização da histologia no grupo Controle. **N1**: Corte transversal do coto distal do nervo fibular comum. **MTC**: Músculo tibial cranial.



**Figura 18** – Estão indicados nessa figura os fragmentos que foram coletados para realização da histologia no grupo Desnervado. **N1**: Corte transversal do coto distal do nervo fibular comum. **N2**: Corte longitudinal da extremidade do coto proximal do nervo fibular comum. **MTC**: Músculo tibial cranial.



**Figura 19** – Estão indicados nessa figura os fragmentos que foram coletados para realização da histologia nos grupos NLT, LBP, EE e LBP+EE. **N1**: Corte transversal do coto distal do nervo fibular comum. **N2**: Corte longitudinal da extremidade do coto proximal do nervo fibular comum. **N3**: Corte longitudinal da extremidade do coto distal do nervo fibular comum e NLT. **MTC**: Músculo tibial cranial.

Os músculos tibiais craniais foram retirados, tiveram suas massas aferidas e foram mantidos imersos em nitrogênio líquido ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) até o momento do processamento histológico.

Os segmentos de nervo coletados foram fixados e mantidos em solução de Karnovisk e refrigerados a  $4^{\circ}\text{C}$  até o momento do processamento histológico.

### Processamento histológico do músculo tibial cranial

Os músculos tibiais craniais, congelados em nitrogênio líquido, foram submetidos a secções transversais de  $7\ \mu\text{m}$  em criostato *Leica* CM1850. As secções foram realizadas na região central, transversalmente ao maior eixo do músculo. Foram realizados de 4 a 6 cortes de um mesmo músculo possibilitando a escolha, durante a análise, de um corte com menos artefatos histológicos. Os cortes histológicos foram corados pela técnica de Hematoxilina – Eosina (HE).

As lâminas foram identificadas com o número de registro no laboratório para que o pesquisador não soubesse a que animal ou grupo pertencia. A numeração real foi revelada apenas no momento da análise estatística.

## **Digitalização das imagens da lâmina histológica do músculo tibial cranial.**

As imagens foram capturadas por uma *Scanner de Imagens Panoramic Viewer* e salvas em um computador.

Foram selecionadas, aleatoriamente, 5 imagens de diferentes campos de um mesmo corte histológico (uma de cada quadrante mais o centro) de cada lâmina.

Foi utilizado aumento de 100 vezes para a análise das fibras musculares.

## **Medidas de área, diâmetro menor e perímetro das fibras musculares.**

As imagens digitalizadas e salvas foram analisadas através de medidas de área, diâmetro mínimo e perímetro das fibras musculares.

As medidas foram feitas de modo semi-automático, utilizando-se *software Sigma Pro Image Analysis*, versão 5, da Jandel Scientific Corporation.

As fibras foram medidas, tomando-se o mínimo de 20 fibras por imagem salva (quatro por quadrante e mais quatro ao centro da imagem), ou seja, 100 fibras por lâmina, o que representará 100 fibras por músculo.

## **Processamento histológico dos segmentos de nervo**

Após fixação por período superior a 24 horas em solução de Karnovisk (100 ml de Paraformaldeído a 8%, 168 ml de Gluteraldeído a 25%, 83,2 ml de Tampão Fosfato 0,2 M) e lavagem em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,3), por três vezes, com duração de cinco minutos cada vez, os segmentos de nervo sofreram pré-coloração com tetróxido de ósmio a 1% por duas horas. Após nova lavagem com tampão fosfato, foi realizada desidratação por uma bateria de concentrações crescentes de acetona (50%, 70%, 90% e 100%). A inclusão em resina Araldite<sup>®</sup> foi realizada em duas etapas: em solução de resina e acetona (1:1), permanecendo por 24 horas em dessecador; e em resina, após 10 minutos em dessecador, permanecendo em estufa a 37°C por uma hora. O emblocamento foi realizado posicionando-se o

segmento de nervo em resina Araldite<sup>®</sup> e mantido em estufa a 60°C por 48 horas para polimerização.

Antes do corte histológico os blocos foram preparados para o corte através da eliminação do excesso de resina ao redor do segmento de nervo com auxílio de uma lupa Carl Zeiss Jema adaptada, em aumento de 1,6 x, e lâmina Gillette<sup>®</sup>.

Com os blocos de N1 preparados, foram realizados cortes transversais semifinos (0,5 µm) em micrótomo *Leica* MZ6. Após o corte, a lâmina foi aquecida sobre uma chapa a 45°C para secagem e pré-aderência. A seguir, a lâmina permanecerá em estufa a 60°C por 12 horas para aderência do corte à lâmina de vidro.

A coloração foi realizada manualmente, lâmina por lâmina, com azul de toluidina 1% durante 5 minutos. Após a secagem, a lamínula foi colada e a lâmina identificada com o número de registro no laboratório.

Os fragmentos nervosos submetidos a cortes longitudinais (N2 e N3) foram incluídos em parafina e corados com prata de Bielschowsky, com o objetivo de comprovar o neuroma de amputação ou contaminação motora e brotamento na neurorrafia látero-terminal.

### **Digitalização das imagens das lâminas histológicas de nervos**

As imagens foram capturadas por um *Scanner de Imagens* Panoramic Viewer e salvas em um computador.

Foi utilizado aumento de 200 vezes para a análise das fibras nervosas.

Foram salvas duas imagens de cada corte histológico para que fosse obtida, com isso, a totalidade do nervo.

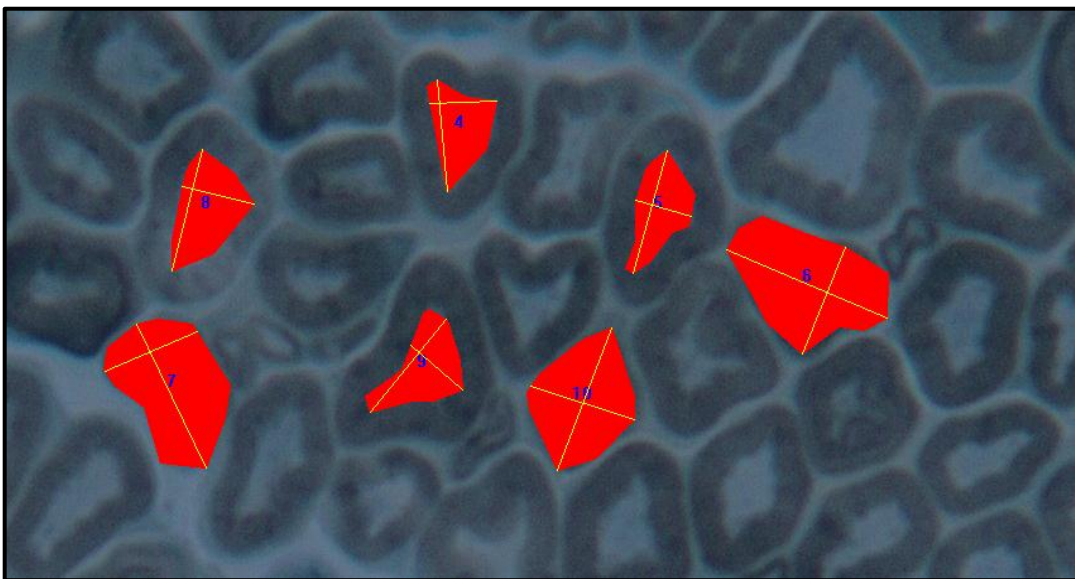
### **Medidas de área, diâmetro mínimo e contagem total das fibras nervosas**

As imagens digitalizadas e salvas foram analisadas através de medidas de área, diâmetro mínimo, número de fibras e dos axônios além da espessura e área da bainha de mielina.

As medidas foram feitas de modo semiautomático utilizando-se *software* Sigma Pro Image Analysis, versão 5, da Jandel Scientific Corporation.

Foram realizadas as medidas da área e diâmetro mínimo da fibra nervosa e do axônio. A medida da área da bainha de mielina foi obtida subtraindo-se a área axonal da área da fibra nervosa, e a espessura da bainha de mielina foi obtida subtraindo-se o diâmetro mínimo do axônio do diâmetro mínimo da fibra e dividindo-se por dois. Foi realizada contagem do número total de fibras nos segmentos N1.

Os resultados obtidos de área e diâmetro mínimo axonal foram organizados em uma tabela e, então, calculada a média das medidas obtidas para cada animal. A partir destas médias, foi realizada a análise estatística para comparação entre os grupos (Fig. 20).



**Figura 20** – Seleção das fibras nervosas para medidas de área, diâmetro mínimo e área, e espessura da bainha de mielina. Os números 4, 5, 8 e 9 marcam axônios e os números 6, 7 e 10 marcam Fibras nervosas.

### **Razão G**

Também foi medido, no seguimento N1, a razão G que representa a relação entre o diâmetro do axônio e o diâmetro da fibra nervosa. A razão G está relacionada à velocidade de condução do impulso nervoso. Segundo Anselin et al. (1997), os axônios mielínicos devem apresentar razão G entre 0,6 e 0,7. Os valores abaixo de 0,6 indicam bainha de mielina espessa, enquanto valores acima de 0,7 indicam bainha de mielina delgada.

### **Análise Estatística**

Quando comparados os grupos que passaram no teste de normalidade e igualdade de variâncias, foi utilizado o teste de análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste de TUKEY, quando detectada diferença significativa. Quando a distribuição dos dados apresentava-se fora da normalidade, foi utilizada análise de variância em ranques de Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn, quando detectada diferença. Para o IFF utilizamos o teste de Friedman para medir a evolução dos grupos ao longo do tempo. Em todas as análises, foi utilizado nível de significância  $p < 0,05$ .

## 4 RESULTADOS

### Massa corporal

A tabela 1 representam a massa corporal dos ratos no início e no final do experimento, respectivamente. As massas foram comparadas entre os grupos. No início do experimento, os grupos eram homogêneos em massa corporal, porém, ao final, houve uma diferença estatística entre os grupos.

**Tabela 1.** Mediana, 1° e 3° intervalos interquartílicos da massa inicial e massa final dos animais em gramas (g).

<i>Grupo</i>	<i>*Massa Inicial</i>	<i>#Massa Final</i>
<b>Controle</b>	375,5 (358 / 385)	547,5 (528 / 599)ab
<b>Desnervado</b>	376 (365 / 403)	582,5 (563 / 643)a
<b>NLT</b>	383 (344,5 / 427)	580 (528,25 / 648)a
<b>EE</b>	377 (345 / 418)	493 (466 / 534,5)b
<b>LBP</b>	383 (363 / 415,5)	523 (481,75 / 573)ab
<b>LBP+EE</b>	380 (343 / 408,5)	490 (445 / 542)b

\*Kruskal – Wallis ( $p = 0,934$ ) Controle = Desnervado = NLT = EE = LBP = LBP+EE;

#Kruskal – Wallis seguido pelo Método de Dunn ( $P = <0,001$ ) Controle = Desnervado = NLT = LBP; Controle = EE = LBP = LBP+EE; (Desnervado = NLT) > (EE = LBP+EE)

### Índice da Massa do Músculo Tibial Cranial (IMM) e Preservação do MTCE

A tabela 2 representa o índice da massa do músculo tibial cranial experimental (MTCE) e músculo tibial cranial normal (MTCN). O cálculo foi realizado dividindo-se a massa do MTCE e do MTCN pela massa corporal final dos animais e multiplicando por 1000. Os resultados demonstraram que o lado normal foi equivalente entre os grupos e no lado experimental os grupos NLT, EE, LBP e LBP+EE foram equivalentes entre si, porém, o grupo NLT não foi equivalente ao Controle como os demais. Também está representado a preservação do MTCE em relação ao MTCN em porcentagem. Os grupos NLT, EE, LBP, LBP+EE foram equivalentes.

**Tabela 2.** Mediana, 1° e 3° intervalos interquartílicos do Índice de massa do MTCN, do MTCE. Média e DP da Preservação do MTCE (%) comparado com o MTCN.

<i>Grupo</i>	<i>*Índice Massa MTCN</i>	<i>#Índice Massa MTCE</i>	<i>&amp;Preservação do MTCE (%)</i>
Controle	1,6 (1,4/1,74)	1,71 (1,47/2,0)a	107,33±12,28a
Desnervado	1,55 (1,5/1,7)	0,31 (0,28/0,33)c	19,212±3,02b
NLT	1,61 (1,46/1,77)	1,33 (1,19/1,45)b	85,362±10,18b
EE	1,69 (1,64/1,75)	1,4 (1,29/1,47)ab	81,471±10,58b
LBP	1,67 (1,6/1,75)	1,37 (1,24/1,5)ab	80,739±14,06b
LBP+EE	1,72 (1,64/1,87)	1,4 (1,22/1,49)ab	79,695±11,25c

\*Kruskal – Wallis ( $p = 0,091$ ) Controle = Desnervado = NLT = EE = LBP = LBP+EE;

#Kruskal – Wallis seguido pelo Método de Dunn ( $P = <0,001$ ) Controle > NLT;

Desnervado < (Controle = EE = LBP = LBP+EE); Desnervado < (NLT = EE = LBP = LBP+EE)

&ANOVA seguido pelo teste de Tukey ( $P = <0,001$ ) Controle > (NLT = EE = LBP = LBP+EE) > Desnervado.

### Teste Eletrofisiológico

A tabela 3 representa os testes eletrofisiológicos para latência e amplitude. O Grupo LBP obteve a pior latência entre os grupos testados. Para amplitude os grupos foram equivalentes.

**Tabela 3.** Média e desvio padrão da latência (ms) e amplitude (mV) do teste eletrofisiológico.

<i>Grupo</i>	<i>*Latência</i>	<i>#Amplitude</i>
Controle	1,749 ( $\pm 0,192$ )b	15,907 ( $\pm 7,628$ )
NLT	1,835 ( $\pm 0,314$ )b	10,688 ( $\pm 6,037$ )
EE	1,758 ( $\pm 0,339$ )b	11,468 ( $\pm 6,190$ )
LBP	2,440 ( $\pm 0,576$ )a	8,734 ( $\pm 4,865$ )
LBP+EE	1,877 ( $\pm 0,495$ )ab	9,005 ( $\pm 3,784$ )

\*ANOVA seguido pelo Teste de Tukey ( $P = 0,023$ )

LBP = LBP+EE; LBP > (Controle = NLT = EE); Controle = NLT = EE = LBP+EE

# ANOVA ( $P = 0,126$ ) Controle = NLT = EE = LBP = LBP+EE

A tabela 4 representa os testes eletrofisiológicos para área e duração. Os grupos foram equivalentes para as duas medidas.

**Tabela 4.** Mediana, 1° e 3° intervalos interquartílicos da área e duração do teste eletrofisiológico.

<i>Grupo</i>	<i>*Área</i>	<i>#Duração</i>
Controle	29,9 (13,975 / 38,1)	3,08 (2,78 / 3,215)
NLT	14,0 (7,995 / 20,325)	2,88 (2,56 / 3,375)
EE	15,3 (6,67 / 22,175)	2,62 (1,83 / 3,065)
LBP	18,6 (6,855 / 29,0)	3,44 (2,03 / 8,42)
LBP+EE	15,7 (10,3 / 18,9)	3,38 (2,97 / 3,62)

\*Kruskal – Wallis ( $p = 0,343$ ) Controle = NLT = EE = LBP = LBP+EE;

#( $p = 0,131$ ) Controle = NLT = EE = LBP = LBP+EE

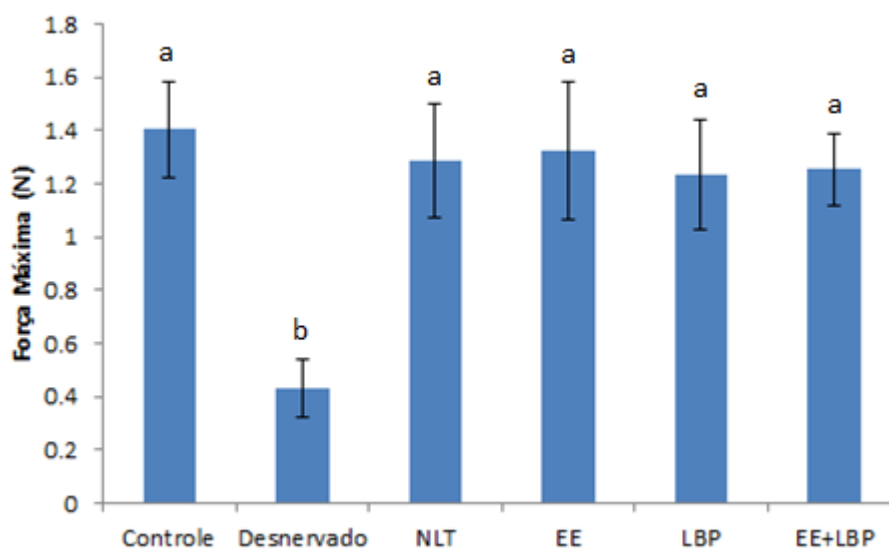
## Teste de Força Máxima

A tabela 5 e a figura 21 representam a força máxima do MTC experimental entre os grupos quando estimulado eletricamente. O grupo Desnervado foi inferior aos demais, que se equivaleram.

**Tabela 5.** Média e desvio padrão da força de contração do MTC (N).

<i>Grupo</i>	<i>*Força de contração</i>
Controle	1,403 ( $\pm 0,182$ )a
Desnervado	0,433 ( $\pm 0,107$ )b
NLT	1,288 ( $\pm 0,213$ )a
EE	1,322 ( $\pm 0,258$ )a
LBP	1,233 ( $\pm 0,209$ )a
LBP+EE	1,253 ( $\pm 0,137$ )a

\*ANOVA seguido pelo Teste de Tukey ( $P < 0,001$ )  
(Controle = NLT = EE = LBP = LBP+EE) > Desnervado



**Figura 21.** Média e desvio padrão da força de contração do MTC (N).

ANOVA seguido pelo Teste de Tukey ( $P < 0,001$ )  
Desnervado < (Controle = NLT = EE = LBP = LBP+EE)

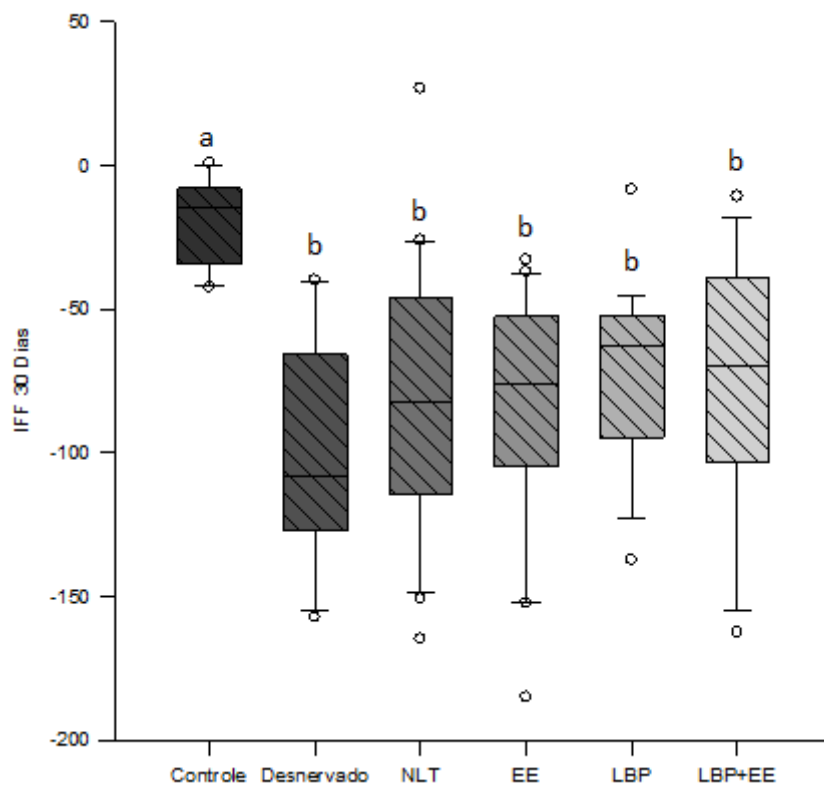
## Teste de Avaliação da Marcha com Índice Funcional do Fibular (IFF)

A tabelas 6 e a figura 22 representam o índice funcional do fibular para 30 dias. Com 30 dias de pós-operatório o grupo controle foi superior aos demais grupos, que se igualaram entre eles.

**Tabela 6.** Mediana, 1º e 3º intervalos interquartílicos do IFF com 30 dias.

<i>Grupo</i>	<i>*IFF 30 dias</i>
<b>Controle</b>	-14,897 (-33,193 / -8,403)a
<b>Desnervado</b>	-108,134 (-125,222 / -73,074)b
<b>NLT</b>	-82,254 (-112,178 / -46,664)b
<b>EE</b>	-75,835 (-98,647 / -52,819)b
<b>LBP</b>	-62,628 (-94,274 / -52,331)b
<b>LBP+EE</b>	-69,812 (-99,672 / -42,27)b

\*Kruskal – Wallis seguido pelo Método de Dunn ( $P = <0,001$ )  
 Controle > (Desnervado = NLT = EE = LBP = LBP+EE)



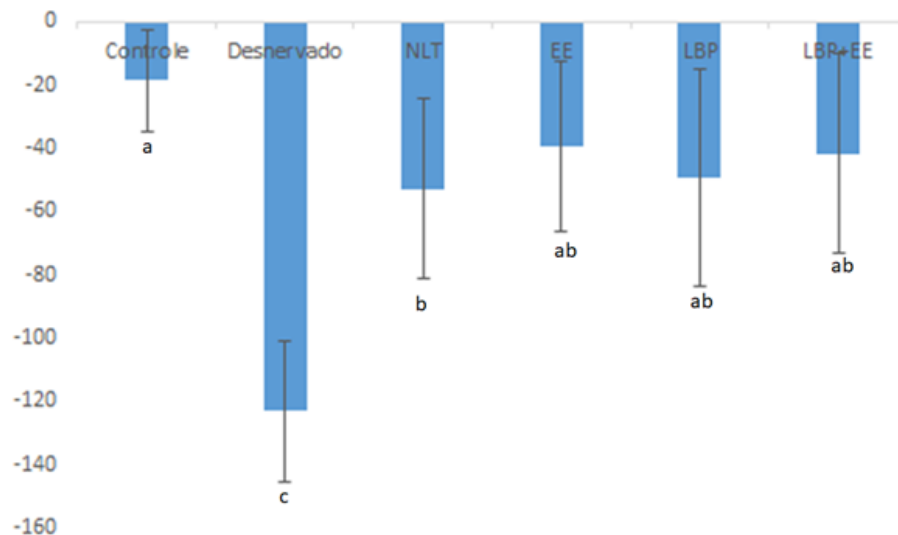
**Figura 22.** Mediana, 1º e 3º intervalos interquartílicos do IFF com 30 dias.  
 Kruskal – Wallis seguido pelo Método de Dunn ( $P = <0,001$ )  
 Controle > (Desnervado = NLT = EE = LBP = LBP+EE)

A tabelas 7 e a figura 23 representam o índice funcional do fibular para 180 dias. Com 180 dias de pós-operatório os grupos EE, LBP e LBP+EE foram equivalentes ao Controle.

**Tabela 7.** Média e DP do IFF com 180 dias.

<b>Grupo</b>	<b>IFF 180 dias</b>
<b>Controle</b>	-18,720 ± 16,24a
<b>Desnervado</b>	-123,23 ± 22,23c
<b>NLT</b>	-52,88 ± 28,51b
<b>EE</b>	-39,34 ± 26,75ab
<b>LBP</b>	-49,15 ± 34,37ab
<b>LBP+EE</b>	-41,77 ± 31,55ab

**Anova seguido do teste de Tukey (P = <0,001)**  
**Desnervado > (Controle = EE = LBP = LBP+EE)**  
**Controle > (Desnervado = NLT)**  
**NLT = EE = LBP = LBP+EE**



**Figura 23.** Média e DP do IFF com 180 dias.  
**ANOVA seguido pelo teste de Tukey (P = <0,001)**  
**Controle = EE = LBP = LBP+EE; Controle > NLT > Desnervado;**  
**(NLT = EE = LBP = LBP+EE) > Desnervado**

A figura 24 e a tabela 8 mostram comparativamente a evolução de todos os grupos ao longo do seu desempenho funcional nos períodos de 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias. Os grupos Controle e NLT não apresentaram evolução significativa ao longo do tempo. O grupo desnervado apesar de apresentar evolução manteve



## Análise Morfométrica

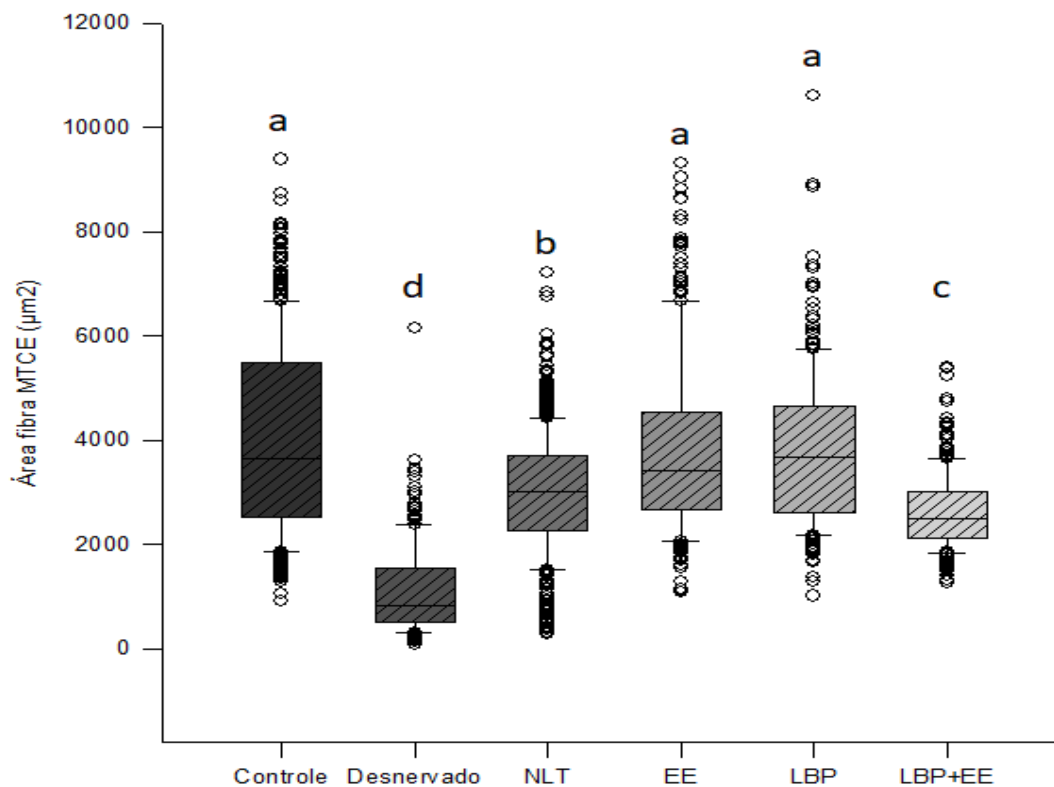
### Análise morfométrica do músculo tibial cranial experimental (MTCE).

A tabela 9 e a figura 25 mostram a comparação da área da fibra muscular do MTCE. Os grupo EE e LBP foram equivalentes ao grupo controle e superiores aos demais.

**Tabela 9.** Mediana, 1° e 3° intervalos interquartílicos da área das fibras do MTCE.

<i>Grupo</i>	<i>Área fibra MTCE (<math>\mu\text{m}^2</math>)</i>
<b>Controle</b>	3656,1 (2540,4 / 5482,8)a
<b>Desnervado</b>	840,2 (521,6 / 1541,5)d
<b>NLT</b>	3008,5 (2276,8 / 3703,8)b
<b>EE</b>	3407,7 (2668,6 / 4524,5)a
<b>LBP</b>	3673,4 (2627,5 / 4663,4)a
<b>LBP+EE</b>	2509,3 (2132,6 / 3010,9)c

\*Kruskal – Wallis seguido pelo Método de Dunn ( $P = <0,001$ )  
(Controle = EE = LBP) > NLT > LBP+EE > Desnervado



**Figura 25 –** Área da fibra do MTC experimental ( $\mu\text{m}^2$ ). Kruskal-Wallis seguido pelo Método de Dunn. ( $p < 0,001$ ). (Controle = EE = LBP) > NLT > LBP+EE > Desnervado

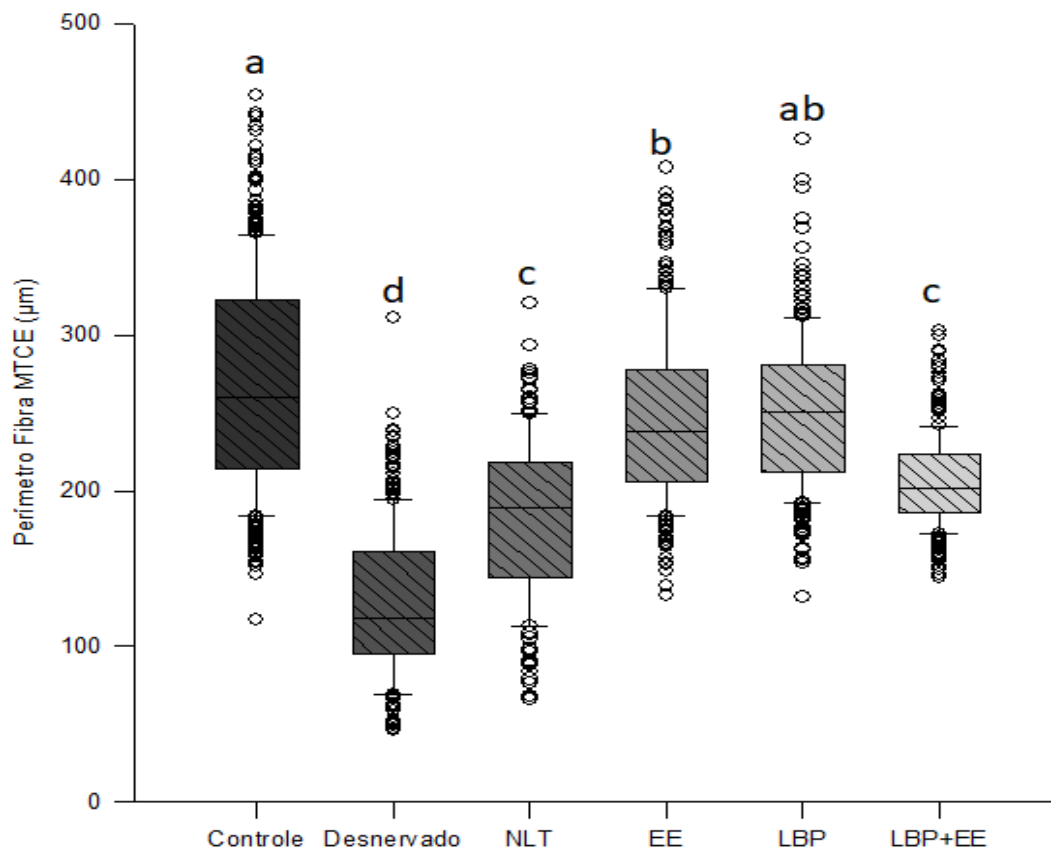
A tabela 10 e a figura 26 representam o perímetro da fibra muscular do músculo tibial cranial experimental. Para este parâmetro, o grupo LBP foi equivalente

ao controle e ao grupo EE e ambos foram superiores aos demais grupos experimentais.

**Tabela 10.** Mediana, 1° e 3° intervalos interquartílicos do perímetro das fibras do MTCE.

<i>Grupo</i>	<i>Perímetro Fibra MTCE (<math>\mu\text{m}</math>)</i>
Controle	260,1 (214,3 / 322,6)a
Desnervado	118,1 (95,7 / 160,3)d
NLT	189,4 (144,3 / 217,8)c
EE	237,5 (205,5 / 278,1)b
LBP	250,0 (211,5 / 280,7)ab
LBP+EE	201,5 (185,5 / 223,7)c

\*Kruskal – Wallis seguido pelo Método de Dunn ( $P = <0,001$ )  
 (Controle = LBP) > (NLT = LBP+EE) > Desnervado  
 (LBP = EE) > (NLT = LBP+EE) > Desnervado



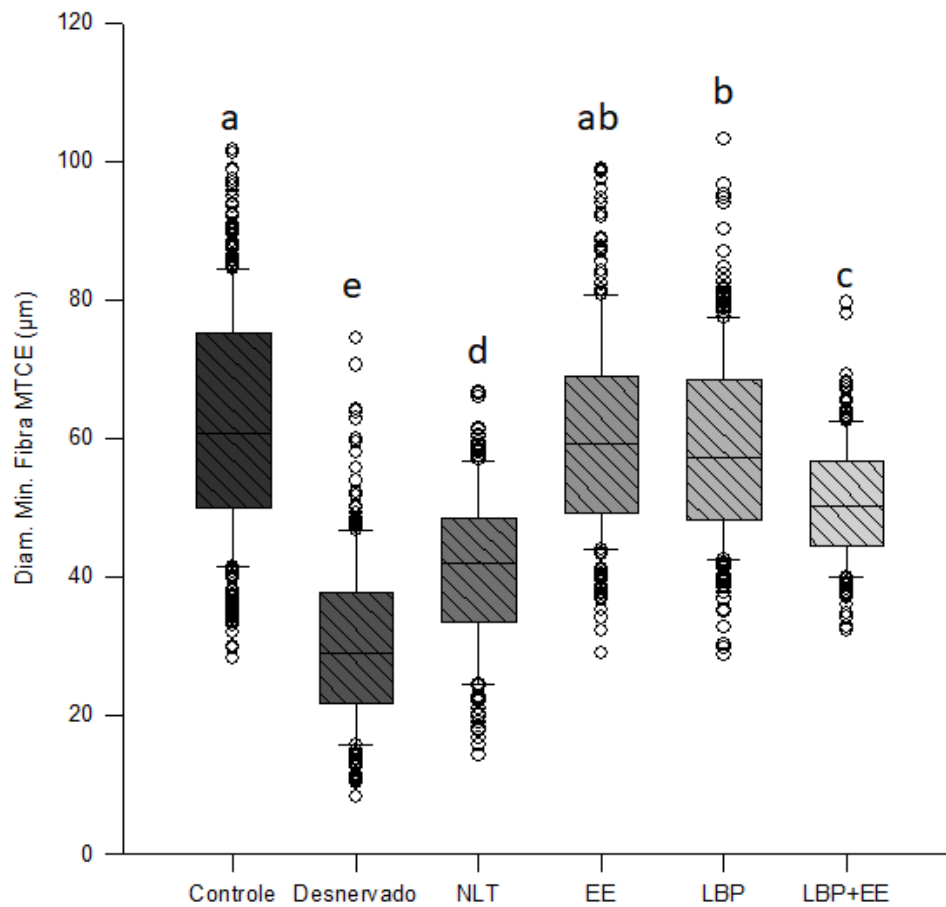
**Figura 26 –** Perímetro do MTCE ( $\mu\text{m}$ ). Kruskal-Wallis seguido pelo Método de Dunn. (Controle = LBP) > (NLT = LBP+EE) > Desnervado; (LBP = EE) > (NLT = LBP+EE) > Desnervado

A tabela 11 e a figura 27 representam o diâmetro mínimo da fibra muscular do músculo tibial cranial experimental. O grupo EE foi equivalente ao grupo controle e ao grupo LBP e ambos foram superiores aos demais grupos experimentais.

**Tabela 11.** Mediana, 1° e 3° intervalos interquartílicos do diâmetro mínimo das fibras do MTCE.

<i>Grupo</i>	<i>Diam. Min. Fibra MTCE (µm)</i>
Controle	60,75 (50,11 / 75,24)a
Desnervado	29,053 (21,83 / 3784)e
NLT	41,92 (33,53 / 48,51)d
EE	59,3 (49,4 / 68,85)ab
LBP	57,35 (48,32 / 68,52)b
LBP+EE	50,14 (44,53 / 56,65)c

\*Kruskal – Wallis seguido pelo Método de Dunn (P = <0,001)  
 (Controle = EE) > LBP+EE > NLT > Desnervado  
 (EE = LBP) > LBP+EE > NLT > Desnervado



**Figura 27** – Diâmetro mínimo da fibra do MTCE (µm). Kruskal-Wallis seguido pelo Método de Dunn.

(Controle = EE) > LBP+EE > NLT > Desnervado; (EE = LBP) > LBP+EE > NLT > Desnervado

### Análise morfométrica dos segmentos nervosos

A análise morfométrica da fibra nervosa do seguimento N1 foi realizada sem a presença do Grupo Desnervado, pois o mesmo não apresentou fibras para serem medidas.

A tabela 12 e a figura 28 representam o número de fibras nervosas do segmento N1 em cada grupo. O único grupo que não foi equivalente ao grupo controle foi o NLT.

**Tabela 12.** Média e desvio padrão do número de fibras nervosas .

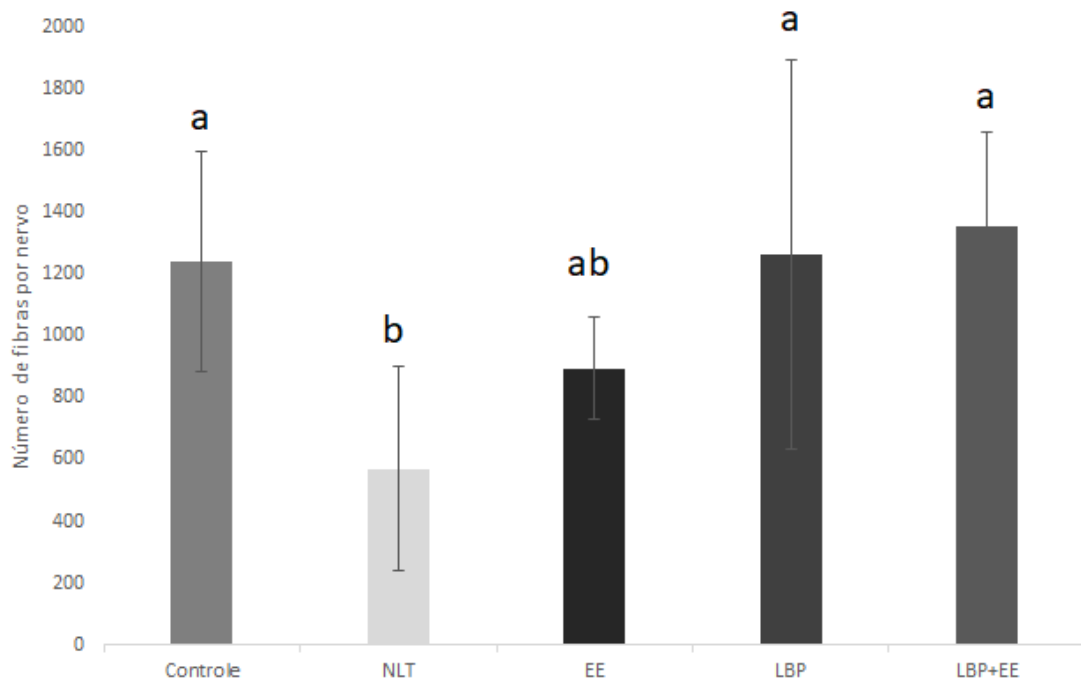
<i>Grupo</i>	<i>Nº Fibras Nervosas</i>
Controle	1239,7± (357,2)a
NLT	570,7 ± (332,6)b
EE	895,7 ± (165,6)ab
LBP	1263 ± (630,9)a
LBP+EE	1353,8 ± (305,6)a

ANOVA seguida pelo Teste de Tukey (P <0,001)

(Controle = LBP = LBP+EE) > NLT

Controle = EE = LBP = LBP+EE

EE = NLT



**Figura 28** – Número de fibras por nervo no segmento N1. ANOVA seguido pelo Teste de Tukey (p < 0,001).

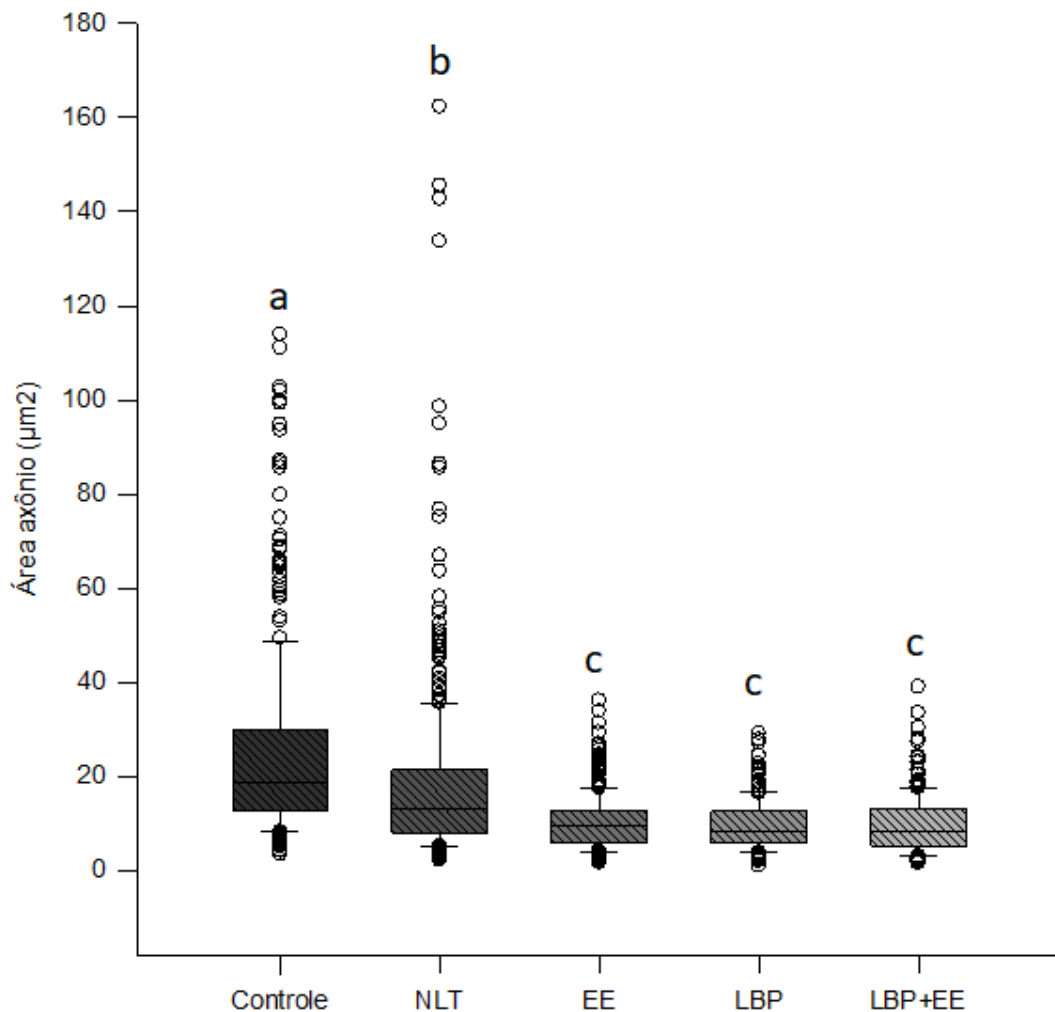
(Controle = LBP = LBP+EE) > NLT; Controle = EE = LBP = LBP+EE; EE = NLT

A tabela 13 e a figura 29 representam a área dos axônios do segmento N1 em cada grupo. O grupo Controle está superior aos demais e o grupo NLT está superior aos demais grupos experimentais.

**Tabela 13.** Mediana, 1° e 3° intervalos interquartílicos da área dos axônios.

<i>Grupo</i>	<i>Área do axônio (<math>\mu\text{m}^2</math>)</i>
<b>Controle</b>	18,48 (12,73 / 29,55)a
<b>NLT</b>	13,15 (7,96 / 21,26)b
<b>EE</b>	9,3 (5,81 / 12,79)c
<b>LBP</b>	8,29 (5,83 / 12,48)c
<b>LBP+EE</b>	8,35 (5,29 / 12,83)c

\*Kruskal – Wallis seguido pelo Método de Dunn ( $P = <0,001$ )  
**Controle > NLT > (EE = LBP = LBP+EE)**



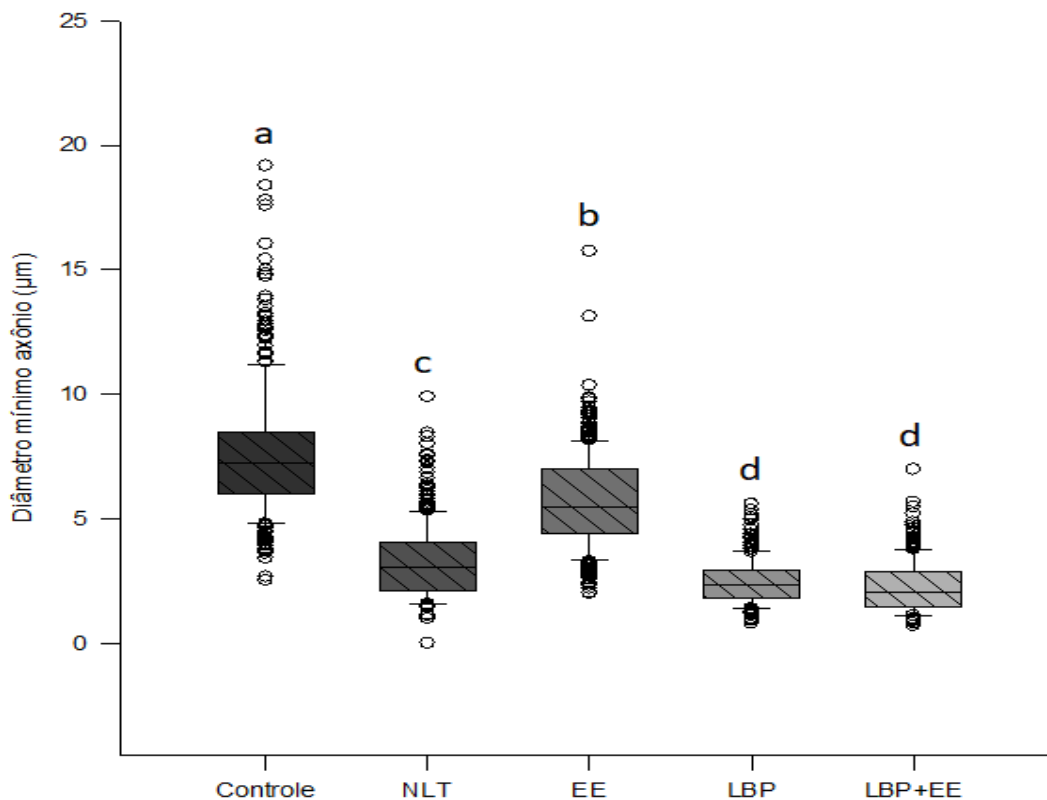
**Figura 29 –** Área dos axônios ( $\mu\text{m}^2$ ). Kruskal-Wallis seguido pelo Método de Dunn. ( $p < 0,001$ ). **Controle > NLT > (EE = LBP = LBP+EE)**

A tabela 14 e a figura 30 representam o diâmetro mínimo dos axônios do segmento N1 em cada grupo. O grupo Controle está superior aos demais e o grupo EE está superior ao grupo NLT e aos demais.

**Tabela 14.** Mediana, 1° e 3° intervalos interquartílicos do diâmetro mínimo do axônios.

<i>Grupo</i>	<i>Diâm. Min. axônio (µm)</i>
Controle	7,22 (5,99 / 8,49)a
NLT	3,08 (2,14 / 4,08)c
EE	5,49 (4,39 / 6,98)b
LBP	2,33 (1,82 / 2,95)d
LBP+EE	2,04 (1,49 / 2,91)d

\*Kruskal – Wallis seguido pelo Método de Dunn ( $P = <0,001$ )  
Controle > EE > NLT > (LBP = LBP+EE)



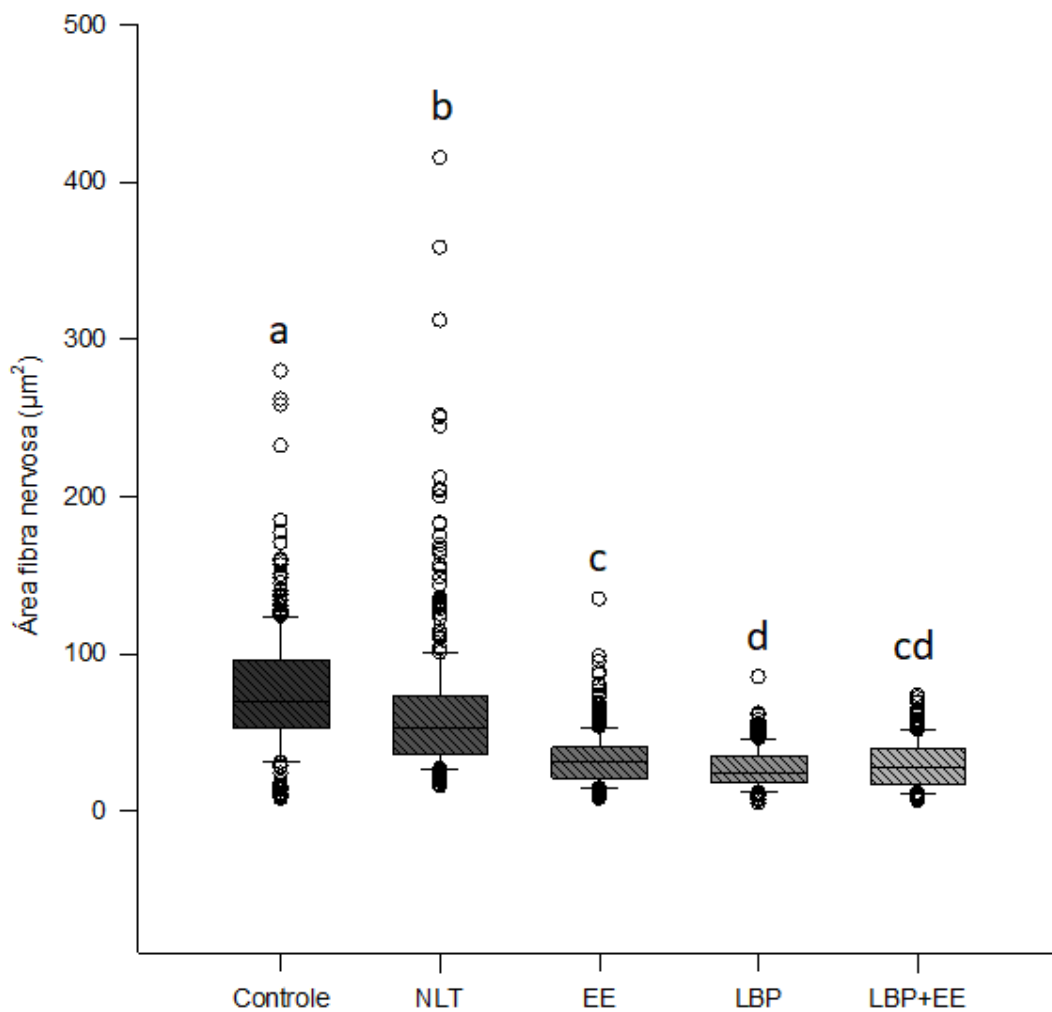
**Figura 30** – Diâmetro mínimo dos axônios (µm). Kruskal-Wallis seguido pelo Método de Dunn. ( $p < 0,001$ ). Controle > EE > NLT > (LBP = LBP+EE)

A tabela 14 e a figura 31 representam a área das fibras nervosas do segmento N1 em cada grupo. O grupo Controle está superior aos demais e o grupo NLT em relação aos outros grupos experimentais.

**Tabela 15.** Mediana, 1° e 3° intervalos interquartílicos da área da fibra nervosa.

<i>Grupo</i>	<i>Área da fibra (<math>\mu\text{m}^2</math>)</i>
Controle	70,42 (53,43 / 95,74)a
NLT	52,96 (36,04 / 73,12)b
EE	31,26 (21,58 / 40,84)c
LBP	24,72 (17,96 / 35,19)d
LBP+EE	27,97 (17,72 / 39,72)cd

Kruskal – Wallis seguido pelo Método de Dunn ( $P = <0,001$ )  
 Controle > NLT > (EE = LBP+EE); Controle > NLT > (LBP = LBP+EE); EE > LBP



**Figura 31** – Área das fibras nervosas do segmento N1 ( $\mu\text{m}^2$ ). Kruskal – Wallis seguido pelo Método de Dunn ( $P = <0,001$ ).

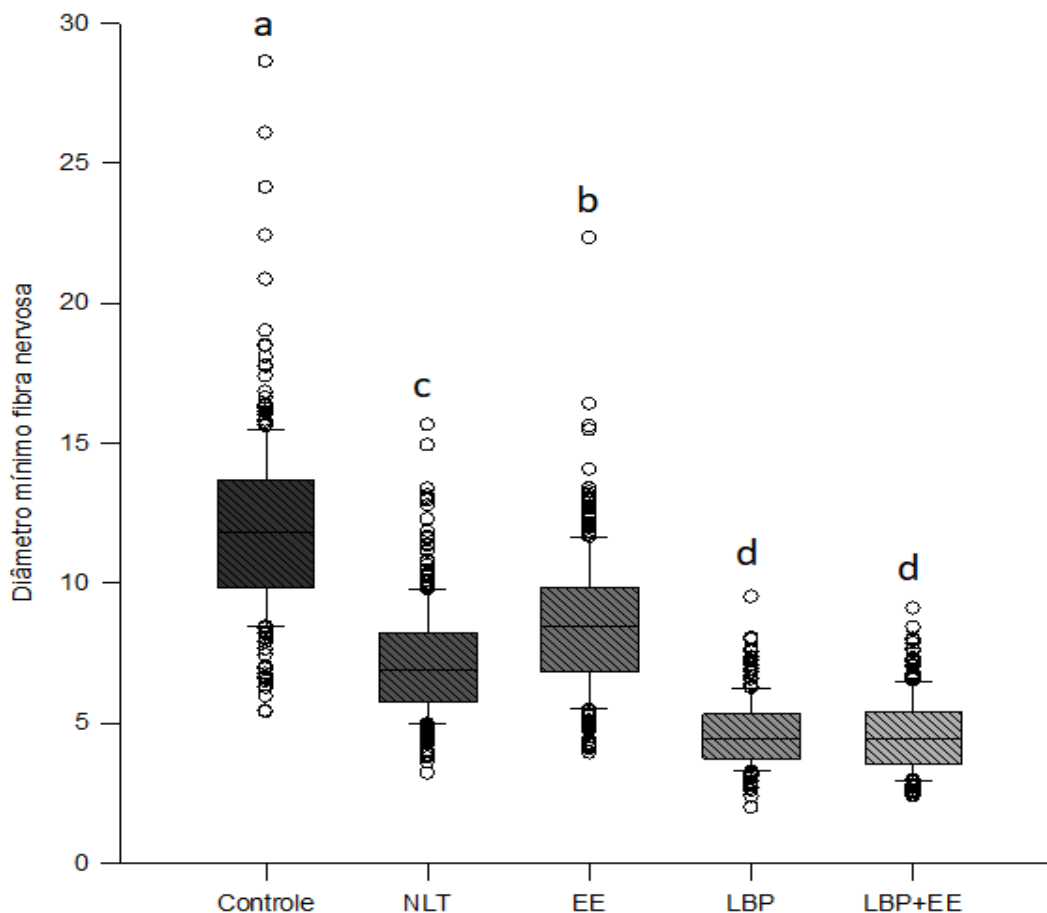
Controle > NLT > (EE = LBP+EE); Controle > NLT > (LBP = LBP+EE); EE > LBP

A tabela 16 e a figura 32 representam o diâmetro mínimo das fibras nervosas do segmento N1 em cada grupo. Aqui observamos o grupo controle superior aos demais com o grupo EE superando os outros grupos experimentais.

**Tabela 16.** Mediana, 1° e 3° intervalos interquartílicos do diâmetro mínimo das fibras nervosas.

<b>Grupo</b>	<b>Diâm. Min. fibras (<math>\mu\text{m}</math>)</b>
<b>Controle</b>	11,81 (9,84 / 13,68)a
<b>NLT</b>	6,92 (5,78 / 8,25)c
<b>EE</b>	8,48 (6,86 / 9,86)b
<b>LBP</b>	4,47 (3,75 / 5,32)d
<b>LBP+EE</b>	4,45 (3,55 / 5,41)d

**Kruskal – Wallis seguido pelo Método de Dunn ( $P = <0,001$ )**  
**Contrle > EE > NLT > (LBP = LBP+EE)**



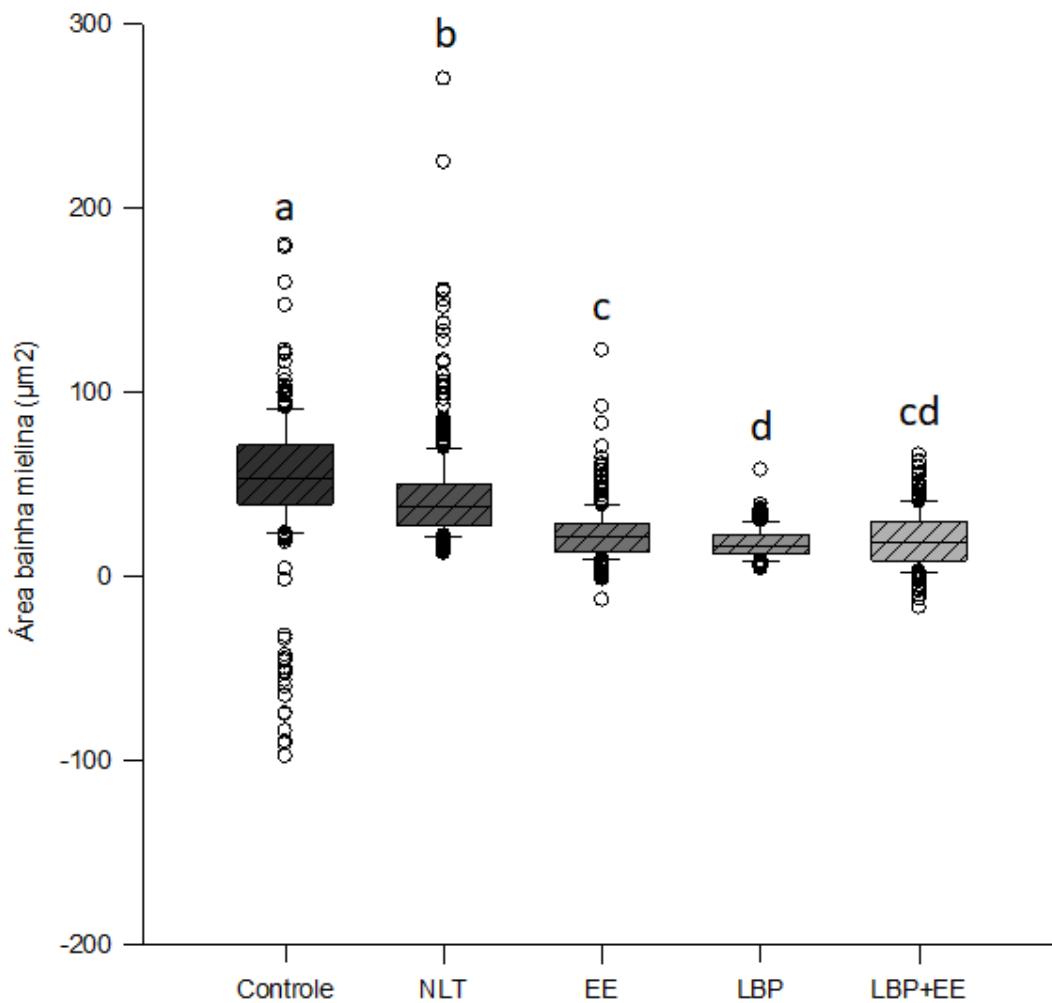
**Figura 32 –** Diâmetro mínimo das fibras nervosas do segmento N1 ( $\mu\text{m}$ ). Kruskal – Wallis seguido pelo Método de Dunn ( $P = <0,001$ ). **Contrle > EE > NLT > (LBP = LBP+EE)**

A tabela 17 e a figura 33 representam a área da bainha de mielina das fibras nervosas no segmento N1 em cada grupo. O grupo NLT é superior aos demais grupos experimentais porém inferior ao grupo controle.

**Tabela 17.** Mediana, 1° e 3° intervalos interquartílicos da área bainha de mielina.

<i>Grupo</i>	<i>Área bainha de mielina (<math>\mu\text{m}^2</math>)</i>
Controle	53,43 (39,27 / 71,19)a
NLT	37,56 (27,28 / 50,26)b
EE	21,29 (13,72 / 28,57)c
LBP	16,32 (11,94 / 22,76)d
LBP+EE	18,35 (8,72 / 29,93)cd

Kruskal – Wallis seguido pelo Método de Dunn ( $P = <0,001$ )  
 Controle > NLT > EE > LBP; Controle > NLT > EE = LBP; LBP = LBP+EE



**Figura 33** – Área da bainha de mielina das fibras nervosa no segmento N1 ( $\mu\text{m}^2$ ).  
 Kruskal-Wallis seguido pelo Método de Dunn. ( $p < 0,001$ ).

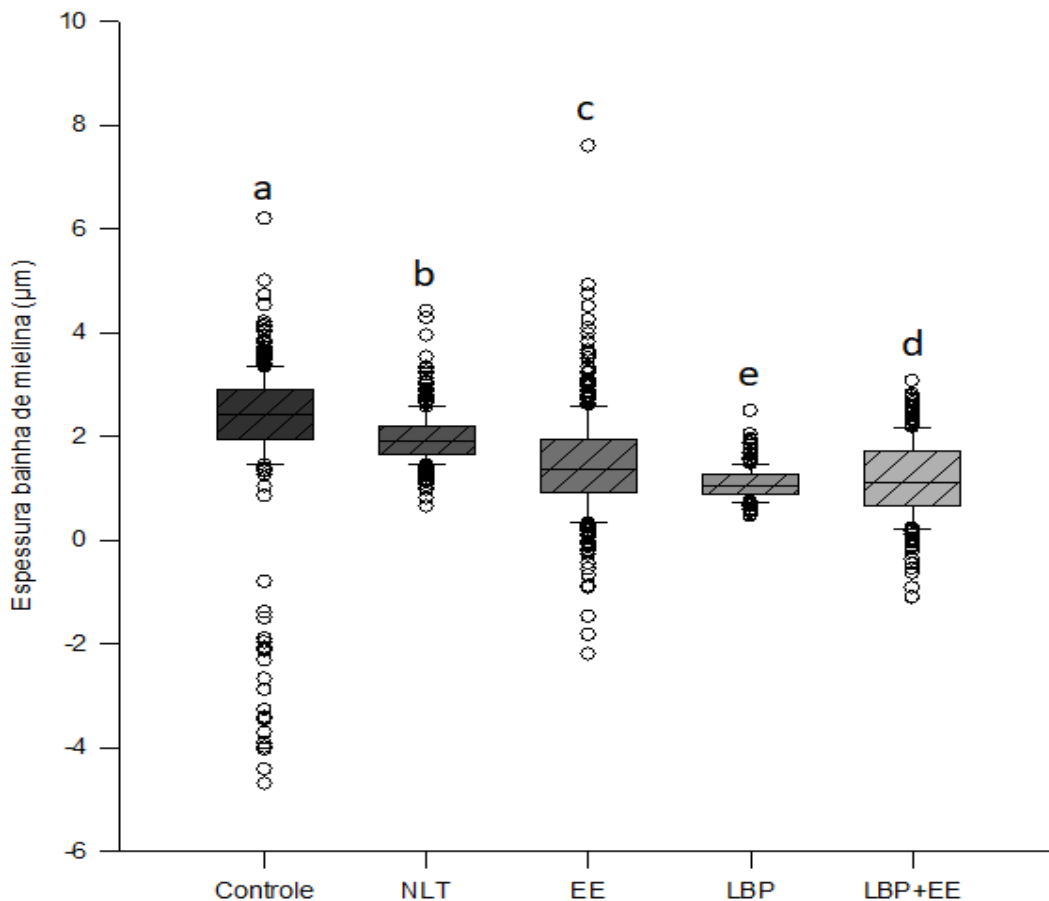
Controle > NLT > EE > LBP; Controle > NLT > EE = LBP; LBP = LBP+EE

A tabela 18 e a figura 34 representam a espessura da bainha de mielina das fibras nervosas no segmento N1 em cada grupo. Os resultados mostram o grupo NLT superior aos demais grupos experimentais e inferior ao grupo controle.

**Tabela 18.** Mediana, 1° e 3° intervalos interquartílicos da espessura da bainha de mielina.

<b>Grupo</b>	<b>Espes Bai Mielin (<math>\mu\text{m}</math>)</b>
<b>Controle</b>	2,42 (1,94 / 2,89)a
<b>NLT</b>	1,92 (1,64 / 2,18)b
<b>EE</b>	1,35 (0,91 / 1,93)c
<b>LBP</b>	1,04 (0,87 / 1,28)e
<b>LBP+EE</b>	1,12 (0,66 / 1,69)d

**Kruskal – Wallis seguido pelo Método de Dunn (P <0,001)**  
**Controle > NLT > EE > LBP+EE > LBP**



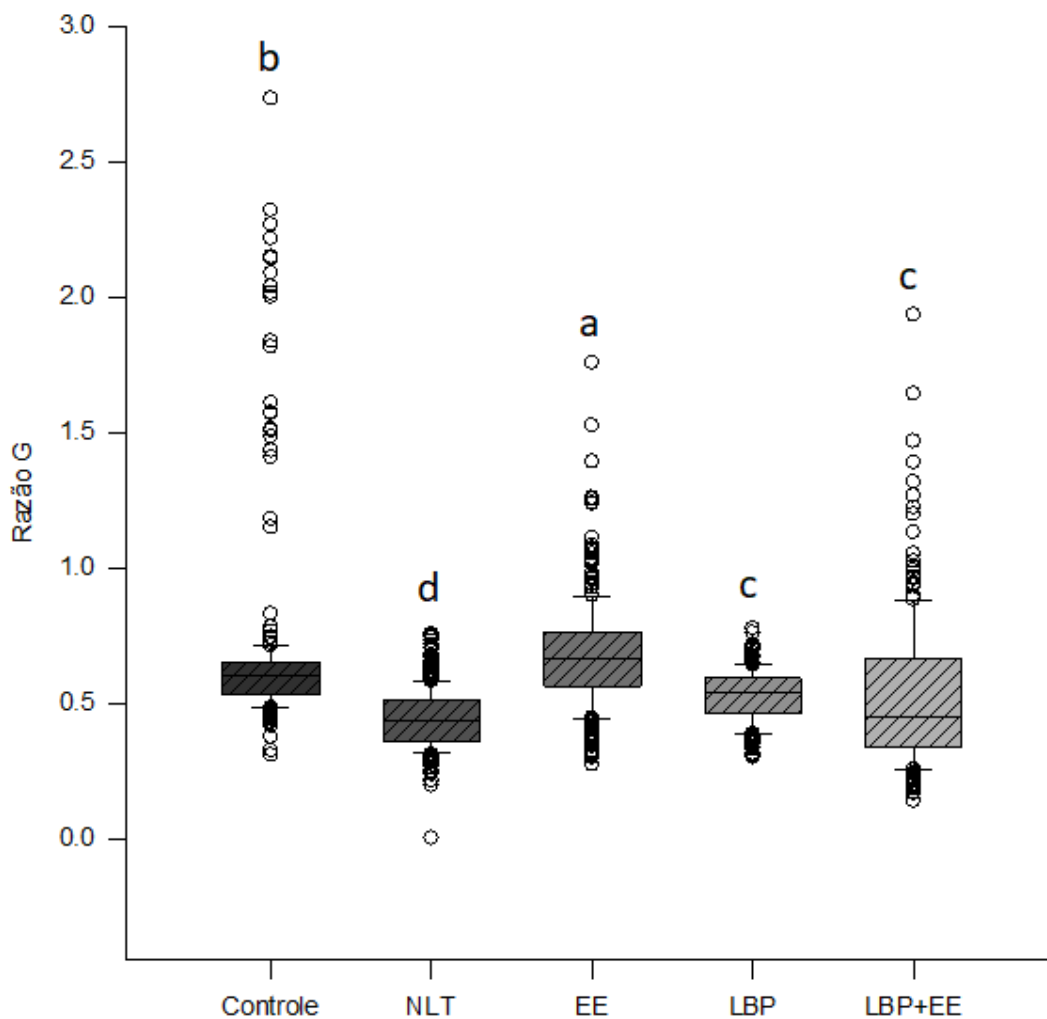
**Figura 34 –** Espessura da bainha de mielina das fibras nervosas do segmento N1 ( $\mu\text{m}$ ). Kruskal-Wallis seguido pelo Método de Dunn. (P < 0,001).  
**Controle > NLT > EE > LBP+EE > LBP**

A tabela 19 e a figura 35 representam a Razão G das fibras nervosas no segmento N1 em cada grupo. Os resultados mostram o grupo EE superior aos demais grupos inclusive do controle, porém o grupo controle também se encontra na faixa de normalidade para essa medida.

**Tabela 19.** Mediana, 1° e 3° intervalos interquartílicos da Razão G.

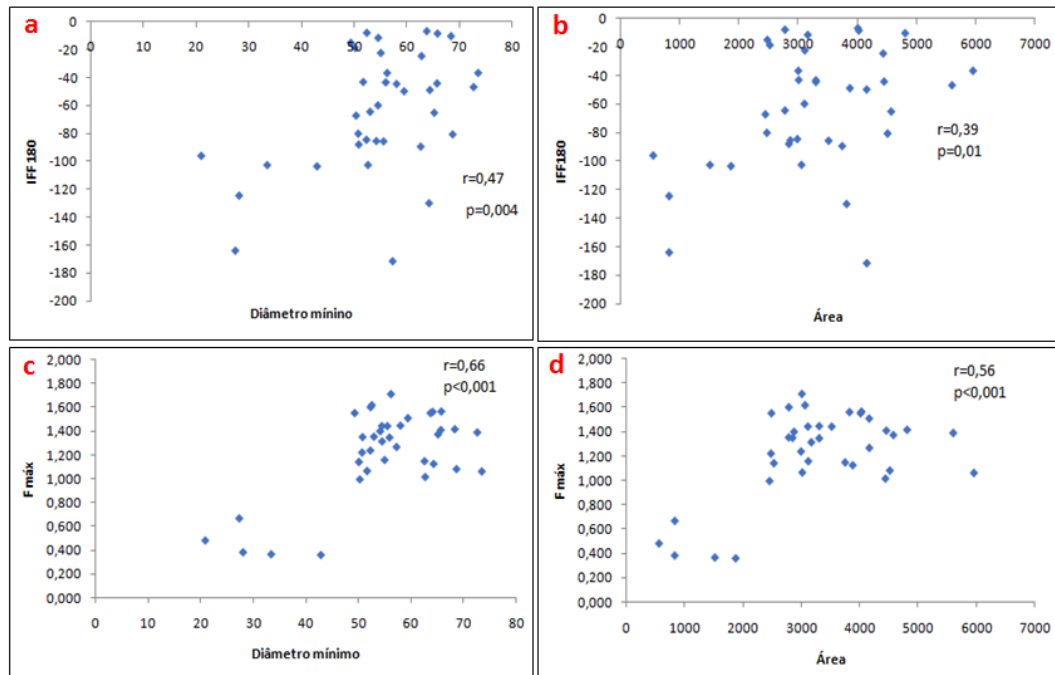
<i>Grupo</i>	<i>Razão G</i>
Controle	0,60 (0,53 / 0,65)b
NLT	0,44 (0,36 / 0,51)d
EE	0,67 (0,56 / 0,76)a
LBP	0,54 (0,46 / 0,59)c
LBP+EE	0,45 (0,34 / 0,66)c

Kruskal – Wallis seguido pelo Método de Dunn (P = <0,001)  
EE > Controle > (LBP = LBP+EE) > NLT



**Figura 35** – Razão G das fibras nervosas do segmento N1 ( $\mu\text{m}$ ). Kruskal-Wallis seguido pelo Método de Dunn. (P < 0,001). EE > Controle > (LBP = LBP+EE) > NLT

A figura 36 representa a correlação entre o IFF 180, Força Muscular, Diâmetro Mínimo das Fibras Musculares e Área das Fibras Musculares. Podemos observar uma correlação positiva entre todos esses parâmetros.

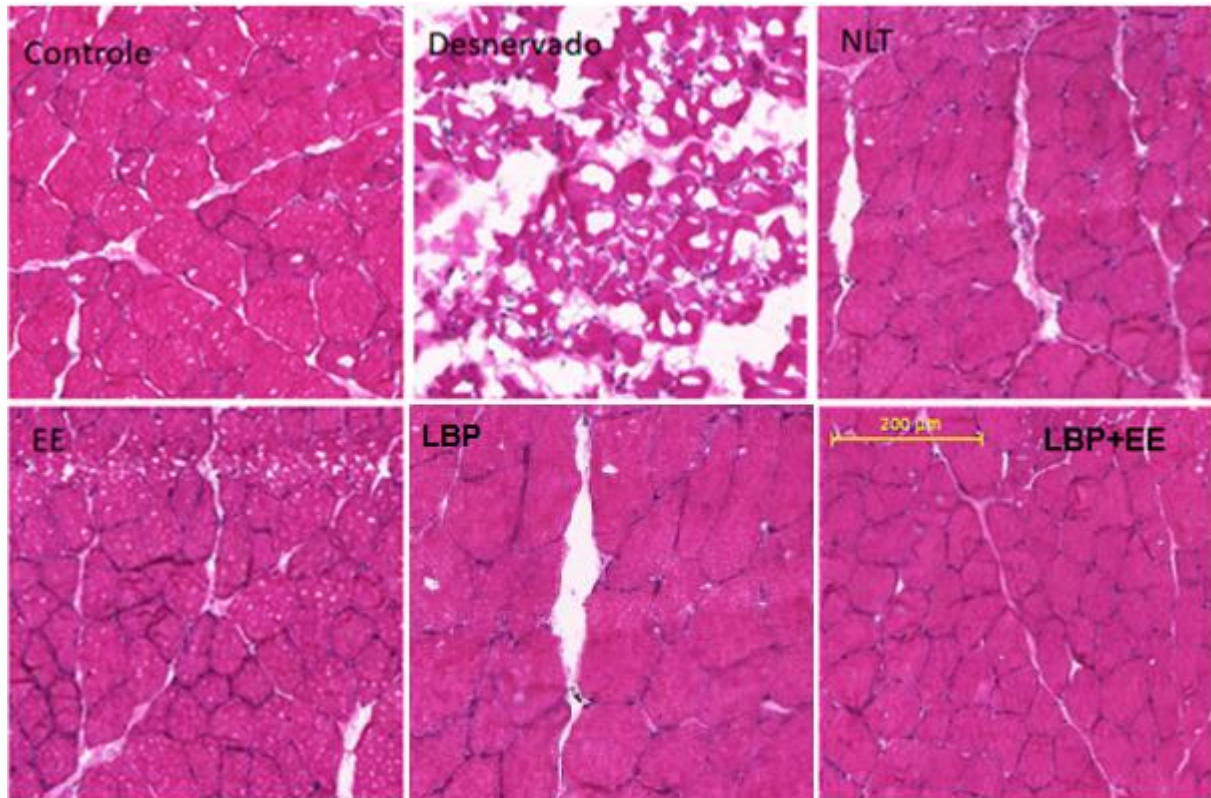


**Figura 36:** Correlação de Pearson. **a:** IFF180 x Diâmetro mínimo do MTCE. **b:** IFF180 x Área das fibras do MTCE. **c:** Força Máxima de contração do MTCE x Diâmetro Mínimo do MTCE. **d:** Força Máxima de contração do MTCE x Área das Fibras do MTCE.

### Morfologia dos músculos e nervos

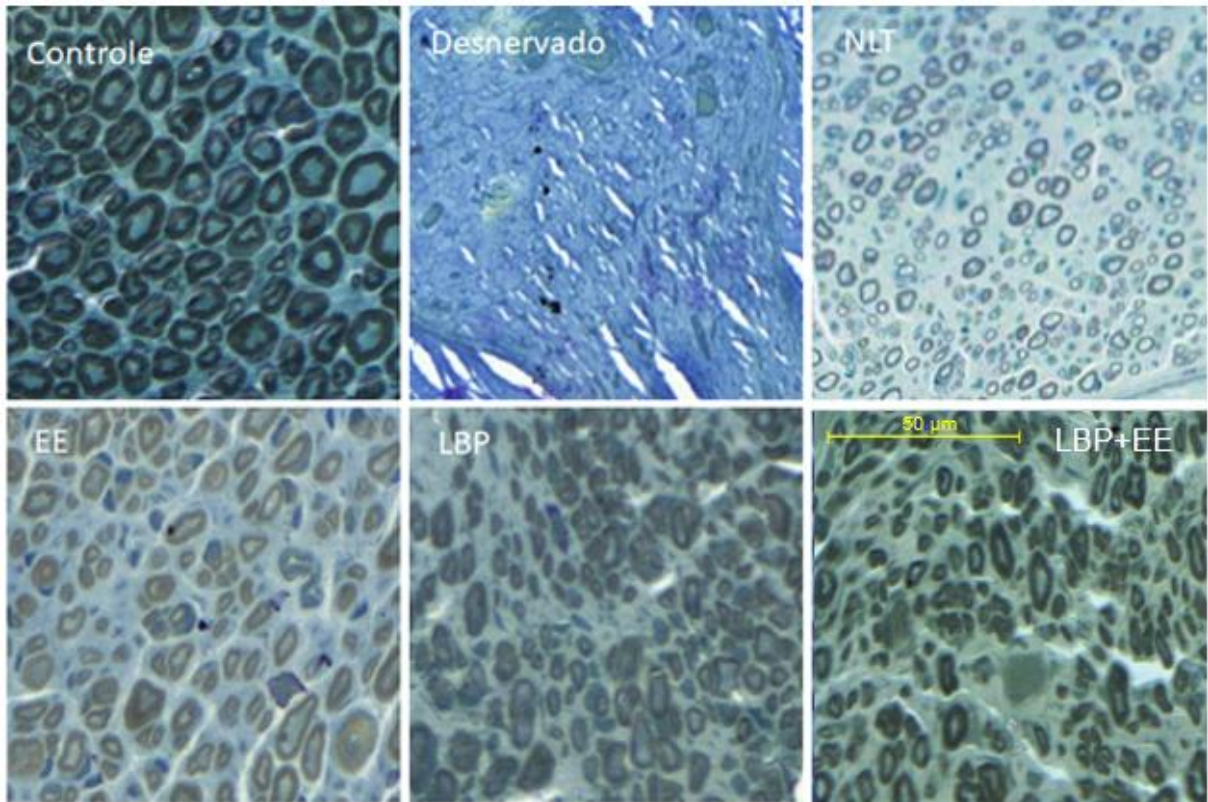
Os músculos tibiais craniais do grupo controle apresentaram características de músculo normal com fibras poligonais, núcleos, na maioria das fibras, em posição periférica e pouco tecido conjuntivo. Os músculos tibiais craniais dos grupos NLT, EE, LBP e LBP+EE apresentaram características semelhantes ao grupo Controle, porém algumas lâminas mostravam quantidade maior de tecido conjuntivo. Os músculos tibiais craniais do grupo Desnervado apresentaram fibras musculares com menor diâmetro e um aumento na quantidade de tecido conjuntivo, polimorfismo e

desorganização, núcleos, na maioria das fibras, centralizados, demonstrando atrofia muscular (Fig. 37).



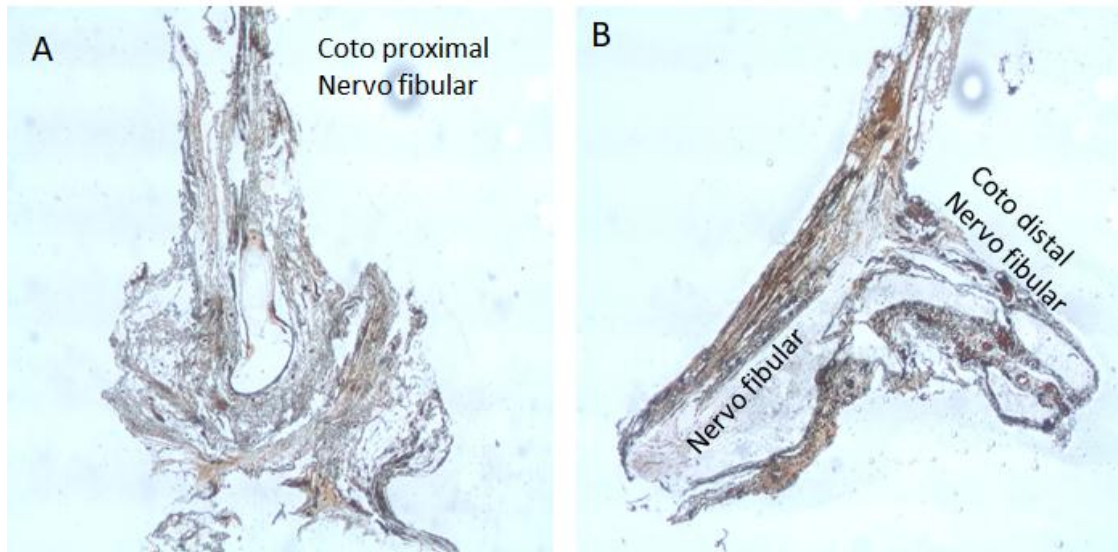
**Figura 37** - Cortes transversais do MTC nos diversos grupos, mostrando a semelhança entre os grupos Controle, EE, NLT; LBP e LBP+EE enquanto o grupo Desnervado apresenta um desarranjo das fibras com núcleos centralizados e grande quantidade de tecido conjuntivo.

Quanto ao segmento de nervo estudado, denominado N1, observamos no grupo Controle grande quantidade de axônios, bainha de mielina espessa e bem definida. Nos grupos NLT, EE, LBP e LBP+EE observamos fibras menores, com bainha de mielina menos espessas e área das fibras nervosas menor e aumento do tecido conjuntivo em relação ao grupo Controle. Observamos também um padrão heterogêneo quanto ao tamanho das fibras nervosas nos quatro grupos experimentais. No grupo Desnervado observamos uma grande quantidade de tecido conjuntivo sem a presença de fibras nervosas (Fig. 38).



**Figura 38** - Corte transversal do coto distal do nervo fibular comum (N1), mostrando o grupo Controle fibras nervosas bem definidas com presença de bainha de mielina, os grupos NLT, EE, LBP e LBP+EE apresentam aparências semelhantes e o grupo Desnervado sem presença de fibras nervosas e grande quantidade de tecido conjuntivo.

Quanto ao segmento N2, ou seja, porção distal do coto proximal do nervo fibular comum, observou-se a presença de neuroma de amputação e descontinuidade da formação de brotos terminais e colaterais (Fig. 39A). No segmento N3, ou seja, corte longitudinal do ponto da neurorrafia, observamos brotamento nervoso ocorrendo da lateral do nervo tibial, que é o doador, para o coto distal do nervo fibular comum que é o receptor. O tecido nervoso observado apresenta a mesma densidade do nervo tibial no nervo fibular comum (Figs. 39B).



**Figura 39 – A:** Corte longitudinal do coto proximal do nervo fibular comum (N2) mostrando o neuroma de amputação. **B:** Corte longitudinal da neurorrafia látero-terminal entre o coto distal do nervo fibular comum com a face lateral do nervo tibial (N3) mostrando o brotamento nervoso do nervo tibial para o nervo fibular comum.

### Dados gerais

Durante o experimento tivemos intercorrências com alguns animais. No quadro 1 observa-se quais animais, seus grupos, momento da intercorrência e qual a intercorrência.

**Quadro 1:** Indicação das intercorrências com os animais.

Rato n°	Grupo	Momento	Intercorrência
7	Controle	180	Óbito anestesia
8	Controle	180	Óbito anestesia
28	NTL	120	Sacrificado infecção
32	NTL	180	Nervo seccionada na dissecação
47	EE	150	Óbito asfixia no cápsula
52	EE	20	Sacrificado infecção
58	EE	50	Óbito (morto na caixa)
59	EE	10	Óbito asfixia na cápsula
71	LBP	180	Óbito anestesia
76	LBP	180	Deiscência da musculatura
81	EE+LBP	60	Óbito (morto na caixa)
82	EE+LBP	180	Óbito anestesia
83	EE+LBP	180	Óbito anestesia
95	EE+LBP	10	Sacrificado infecção
96	EE+LBP	180	Óbito anestesia

**Quadro 2** – Visão geral das médias e desvios padrões dos resultados obtidos. IMM = Índice de Massa Muscular; FM 100 = Força Muscular 100 Hz; AFM = Área da Fibra Muscular; DMFM = Diâmetro Mínimo da Fibra Muscular; NFN = Número de Fibras Nervosas; AFN = Área da Fibra Nervosa; DMFN = Diâmetro Mínimo da Fibra Nervosa; ABM = Área da Bainha de Mielina; EBM = Espessura da Bainha de Mielina e Razão G.

	IMM	FM100	DMFM	AFM	NFN	AFN	DMFN	ABM	EBM	Razão G
Controle	1,7 (1,4/2,0) a	1,4 (±0,2) a	60,8 (50,1/75,2) a	3656,1 (2540,4/5482) a	1239,7 (±357,2) a	70,42 (53,43/95,74) a	11,8 (9,8/13,7)	53,4 (39,7/71,2) a	2,4 (1,9/2,9) a	0,6 (0,5/0,6) b
Desnervado	0,3 (0,3/0,3) c	0,4 (±0,1) b	29,1 (21,8/37,8) e	840,2 (521,6/1541,5) d						
NLT	1,3 (1,2/1,5) ab	1,3 (±1,3) a	41,9 (33,5/48,5) d	3008,5 (2276,8/3703,8) b	570,7 (±332,6) b	52,96 (36,04/73,12) b	6,9 (5,8/8,3) c	37,7 (27,3/50,3) b	1,9 (1,6/2,2) b	0,44 (0,4/0,5) d
EE	1,4 (1,3/1,5) ab	1,3 (±0,3) a	59,3 (49,4/68,9) ab	3407,7 (2668,6/4663,4) a	895,7 (±165,6) ab	31,26 (21,58/40,84) c	8,8 (6,9/9,7) b	21,3 (13,7/28,6) c	1,4 (0,9/1,9) c	0,67 (0,6/0,8) a
LBP	1,4 (1,2/1,5) ab	1,2 (±0,2) a	57,3 (48,3/68,5) b	3673,4 (2627,5/4663,4) a	1263 (±630,9) a	24,72 (17,96/35,19) d	4,5 (3,8/5,3) d	16,3 (11,9/22,8) d	1,0 (0,9/1,3) e	0,54 (0,5/0,6) c
LBP+EE	1,4 (1,2/1,5) ab	1,3 (±0,1) a	50,1 (44,5/56,6) c	2509,3 (2132,6/3010,9) c	1353,8 (±305,6) a	27,97 (17,72/39,72) cd	4,5 (3,5/5,4) d	18,4 (8,7/29,9) cd	1,1 (0,7/1,7) d	0,45 (0,3/0,6) c

## 5 DISCUSSÃO

Toda a parte experimental e de coleta deste estudo foi realizada no Bloco 2 da Unidade de Pesquisa Experimental (UNIPLEX) da FMB - UNESP, e a parte de preparo histológico foi realizada no Bloco 3 da mesma unidade. Estes dois laboratórios juntos apresentam todas as condições estruturais e técnicas para a realização de pesquisas experimentais na nossa linha de estudo.

Neste trabalho, foram utilizados ratos machos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Wistar por serem de fácil obtenção, manipulação e manutenção. Estes animais ocupam pouco espaço, facilitando estudos de longa duração (Ellis & McCaffrey, 1984), além de representarem a espécie mais utilizada na literatura (Pereira *et al.*, 1998).

Ratos do sexo masculino estão menos suscetíveis à ação dos hormônios adenohipofisários e hormônios gonadais, como o estrógeno e a progesterona (Lincoln, 1980; Carandente *et al.*, 1989). Estes hormônios podem exercer efeitos neurotróficos e influenciar no brotamento de axônios sensoriais mielínicos, além de serem mais fáceis de adquirir, pois não servem como matriz de reprodução.

O modelo experimental utilizado foi o “nervo tibial-fibular e músculo tibial cranial” do nervo isquiático introduzido por Viterbo *et al.* (1992). Segundo estes autores este modelo apresenta duas vantagens: músculo tibial cranial é innervado exclusivamente pelo nervo fibular comum e sua localização superficial possibilita o acompanhamento clínico da reinervação.

Alguns autores usam um modelo experimental envolvendo os membros de ratos no estudo da NLT. Estes modelos envolvem, principalmente, os nervos mediano, ulnar e musculocutâneo (Bertelli *et al.*, 1996; Lutz *et al.*, 2000a; Lutz *et al.* 2000b; Papalia *et al.*, 2003; Liao *et al.*, 2009). A NLT tem se mostrado uma boa opção para a resolução de reinervação sem que haja prejuízo ao nervo doado e por esse motivo vem sendo usada até o momento para vários modelos experimentais (Jia *et al.*, 2017).

Também existem modelos experimentais com outros animais. Sundine *et al.* (2003) avaliaram a reinervação do músculo orbicular dos olhos em cães. Jaberri *et al.* (2003) utilizaram coelhos, seguindo o mesmo modelo do tibial e fibular comum utilizado em ratos. Myckatyn *et al.* (2004) utilizaram camundongos transgênicos.

Mennen (1998) utilizou a NLT em primatas, assim como Schmidhammer *et al.* (2007).

Os animais foram sacrificados após 180 dias de tratamento. Acreditamos ser esse prazo suficiente para ocorrer brotamento e amadurecimento axonal, assim como a chegada dos axônios à placa motora, provocando a reinervação das fibras musculares e consequente recuperação funcional do músculo.

Gigo-Benato *et al.* (2010a), observaram durante 14 dias a recuperação funcional de ratos após lesão por esmagamento do nervo isquiático e concluíram que a EE foi prejudicial à recuperação do músculo e nervo após a lesão, porém devemos indagar se 14 dias de recuperação seriam suficientes para que a reinervação muscular ocorra, mesmo em modelo de esmagamento nervoso e não secção total do nervo. Acreditamos que seja necessário um tempo maior para que possamos chegar a conclusões mais concretas quanto à reinervação do músculo.

Russo *et al.* (2008) observaram regulação da expressão gênica MMP-2 em músculos esqueléticos desnervados e concluíram que a EE pode ser útil na elaboração de novas estratégias terapêuticas para a reabilitação em pacientes com desnervação do músculo. Porém estes autores observaram 28 dias após desnervação muscular e não realizaram testes funcionais.

Buchaim *et al.* (2016) fizeram a secção do ramo bucal do nervo facial bilateral em ratos. O lado direito foi reconstruído com neurorrafia término terminal e o lado esquerdo foi utilizado cola de fibrina. O trabalho foi dividido em 4 grupos com neurorrafia com e sem LBP e grupos com cola de fibrina com e sem LBP. Após 10 semanas no total, observaram que o LBP apresentou um resultado satisfatório na regeneração do nervo facial sendo, portanto uma técnica que ajuda na estimulação do processo de regeneração axonal.

Andraus *et al.* (2017) após a utilização de LBP na regeneração do nervo isquiático de ratos com duração de 21 dias de tratamento, concluíram que a lesão no nervo isquiático com desnervação muscular consequente, foram beneficiadas pela laserterapia promovendo a recuperação da função neuromuscular, atividade da MMP-2 e aumentando a força máxima de ruptura mecânica do músculo.

Muitos estudos que utilizam estimulação elétrica no músculo desnervado não observaram evolução funcional dos animais com observação entre 7 e 52 dias, e as

avaliações foram apenas histológicas (Durigan *et al.*, 2006; Caierão *et al.*, 2008; Carvalho *et al.*, 2009; Polônio, 2010; Teodori *et al.*, 2011; Du *et al.*, 2018). Esses trabalhos, por serem de curto tempo de observação, realizaram a estimulação elétrica com os animais anestesiados. Como nosso tempo de estimulação foi longo e, por este motivo, os ratos passariam por muitas sessões de EE, achamos arriscado anestésiar os animais três vezes por semana durante 180 dias. Optamos por estimular os animais acordados. Para tal, desenvolvemos um método de estimulação que envolve a imobilização dos animais em uma cápsula metálica (Figs. 10 e 11). Esta cápsula prende o membro pélvico do animal na região inguinal de forma anatômica sem provocar lesão ou sofrimento.

O mesmo modelo de imobilização foi utilizado para a realização da laserterapia, pois a cápsula mantinha exposta a cicatriz cirúrgica que é o local da aplicação do LBP (Fig. 12). A exemplo da eletroterapia os estudos com LBP não apresentam tempo de observação tão grande quanto o nosso ficando entre 3 dias como Alcântara *et al.* (2013) a 12 semanas como Shen *et al.* (2013). Por esse motivo a sessão de LBP pode ser realizada com o animal sob anestesia e isso diferencia muito em relação ao nosso modelo experimental.

A estimulação elétrica utilizada durante este estudo não provocou dor ou sofrimento, pois os níveis de estimulação foram ajustados para que permanecessem dentro do limiar motor e não alcançassem o limiar doloroso (Robinson & Snyder-Mackler, 2001; Low & Reed, 2001, Nelson *et al.*, 2003). Além disso esse modelo já foi testado pelo nosso grupo em Maciel *et al.* (2013).

A corrente de estimulação foi determinada baseada em parâmetros criteriosamente pré-estabelecidos. Conforme Ward (2009), a corrente de média frequência com curta duração, entre 2 a 4 ms, são ideais para produzir fortalecimento muscular. A frequência foi determinada de acordo com o tipo de fibra muscular predominante no músculo tibial cranial.

A intensidade da corrente foi determinada conforme Maciel *et al.* (2013) para diferenciar dos 1 mA e 5 mA usualmente utilizados por trabalhos que estimulam os ratos anestesiados ou com eletrodos implantados. Estes fatores podem causar alteração na condutibilidade da corrente no corpo do animal. (Dow *et al.*, 2004; Durigan *et al.*, 2006; Carvalho *et al.*, 2009; Polônio *et al.*, 2010; Teodori *et al.*, 2011).

Contudo, quando observamos as massas finais dos grupos pudemos perceber que os grupos que receberam EE como tratamento apresentaram em média massas musculares menores. Esse fato também ocorreu em nosso estudo realizado anteriormente (Maciel et al., 2013), o que poderia nos levar a crer que mesmo com todos os critérios estabelecidos e controlados, os animais ainda podem estar sofrendo algum tipo de estresse com a EE.

A dosificação do LBP que utilizamos foi baseada em estudos realizados por Andraus, Barbieri e Mazzer (2010) que também utilizaram a dose de 4 J (equivalente à  $59,7 \text{ J/cm}^2$ ) por ponto e obtiveram bons resultados na regeneração nervosa após lesão do nervo isquiático em ratos. Rochkind (1992) já chamou a atenção para a dosificação da terapia a LASER, pois reparou que o efeito do LBP no tecido nervoso é dose-dependente e quando doses menores que  $3,5 \text{ J/cm}^2$  eram utilizadas não ocorria mudanças nos potenciais de ação dos nervos, por esse motivo já em 1992, Rochkind, contrariando uma tendência da época, sustentava o uso de doses mais elevadas para a regeneração nervosa.

A NLT foi realizada sem retirada de epineuro, pois as fibras regeneradas após a NLT têm a capacidade de absorver e transpor o endoneuro, perineuro e epineuro em nervos delgados, com diâmetro inferior a 1,5 mm (Viterbo et al., 1992; Viterbo et al., 1994 a, b; Lundborg et al., 1994; Zhao et al., 1997; Viterbo et al., 1998). Em nervos mais espessos, é recomendado que a janela epiperineural seja realizada. (Viterbo et al., 1998).

O número de 20 ratos em cada grupo com NLT nos pareceu adequado quando delineamos o trabalho, pois essa quantidade difere para mais em relação aos estudos equivalentes porém devemos observar que a variabilidade do WTA é bem elevada e requer um número maior de animais. Já o número de 10 ratos nos grupos controles e desnervado também nos pareceu adequado, uma vez que estes dois grupos apresentam resultados mais homogêneos (Viterbo et al., 1992; Franco, 2010; Maciel et al., 2013). Na literatura, esse número é muito variável, de 5 a 40 animais (McCallister et al., 1999; Caierão et al., 2008; Goheen-Robillard et al., 2002; De Sá et al., 2004).

## **Massa corporal e massa do MTC**

A massa inicial dos animais estudados não demonstrou diferença entre os grupos, mostrando que houve homogeneidade na amostra ao iniciarmos o experimento. Contudo, a massa final não apresentou o mesmo resultado, pois os grupos que passaram por EE apresentaram massas corporais menores que os demais. Podemos associar este fato à dois procedimentos, a própria EE elétrica pode ter provocado um estresse elevado nos animais e também o tempo de contenção nas cápsulas de estimulação, que foi maior para os grupos com EE. Estes dois fatores podem ter elevado o nível de estresse dos animais muito mais que dos outros grupos levando ao um menor ganho de massa corporal no final do trabalho.

Por esse motivo, ao invés de analisarmos a massa do MTC diretamente, utilizamos o índice da Massa Muscular (IMM), que foi calculada dividindo a massa do MTC pela massa corporal final de cada animal e multiplicada por 1000. É esperado que um animal de maior massa corporal também apresente maior massa muscular, por isso utilizando este índice, equivalemos os grupos (Vieira & Hossne, 2001). O IMM mostrou que os grupos NLT, EE, LBP e LBP+EE foram equivalentes porém, os grupos EE, LBP e LBP+EE também se equivaleram ao grupo controle.

Quando observamos a porcentagem de preservação da massa do MTCE em relação ao MTCN podemos perceber que todos os grupos que passaram por cirurgia de neurraxia apresentam boa preservação do músculo e não apresentaram diferenças estatísticas neste parâmetro. Isso nos indica que todos os tratamentos apresentam um bom potencial de preservação muscular.

Segundo Gigo-Benato et al. (2010b) o tecido muscular é fortemente afetado pelas lesões de nervos periféricos por isso a inervação se torna um ponto crítico para a integridade estrutural e funcional do músculo. A desnervação muscular leva a uma profunda perda de massa e inabilidade do músculo de gerar força. Por esse motivo a medida da massa muscular ou do índice de massa muscular se torna uma importante medida para determinar como está a função muscular do rato após o tratamento.

Viterbo et al. (2017) usou a massa do músculo tibial cranial de ratos, após reparação do nervo fibular comum, como parâmetro para demonstrar que não houve

diferença em relação à preservação muscular quando comparados três tipos de neurografia, a NTT, a NTL, e a NLT.

Gigo-Benato et al. (2004) aplicaram a irradiação com o LBP sobre o nervo mediano, seccionado e reparado por neurografia látero-terminal do coto distal no nervo ulnar, em ratos. Este estudo demonstrou que, no grupo tratado com LBP, ocorreu recuperação da massa muscular mais rapidamente que nos demais grupos além de apresentar melhora significativa da função, em comparação com o grupo controle.

### **Teste de Avaliação da Marcha com Índice Funcional do Fibular (IFF)**

O teste da marcha analisa o modo de andar do animal através do cálculo da expressão, como porcentagem, de perda da função do membro tratado em relação ao contralateral. O teste de marcha foi desenvolvido por De Medinaceli *et al.* (1982) através do Índice Funcional do Isquiático (IFI) que avalia a função relacionada ao nervo isquiático, porém foi aperfeiçoado por Bain *et al.* (1989), que desenvolveu métodos específicos para o nervo tibial (Índice Funcional do Tibial – IFT) e para o nervo fibular (Índice Funcional do Fibular - IFF). Como nosso modelo experimental envolve especificamente o nervo fibular comum, usamos o IFF de Bain *et al.* (1989). Estes testes funcionais da caminhada são de baixo custo e fácil aplicação, permitindo acompanhar a evolução clínica dos ratos. Além disto, revelam a função muscular e plasticidade cerebral, resultado final desejado em qualquer reconstrução de nervo periférico. Por isto estes testes vêm sendo utilizados por inúmeros autores (Carlton & Goldeberg, 1986; Dellon & Mackinnon, 1989; Dellon & Dellon, 1991; Bervar, 2000; Monte-Raso *et al.*, 2008; Andraus *et al.*, 2010; Maciel *et al.*, 2013; Viterbo *et al.*, 2016).

Aos 30 dias, os ratos do grupo Controle se diferenciavam de todos os ratos dos demais grupos, apresentando os melhores índices funcionais. Esse resultado já era esperado, pois com 30 dias ainda não foi possível perceber os efeitos dos tratamentos propostos. Após 180 dias, já podemos perceber as diferentes evoluções entre os grupos experimentais. Com exceção do grupo NLT, os demais grupos experimentais foram estatisticamente equivalentes ao grupo controle ao final do experimento, demonstrando a importância, em termos funcionais, dos tratamentos propostos após a realização da cirurgia de reconstrução nervosa periférica.

Também é muito importante perceber quando observamos a figura 24 que os grupos Controle e NLT não apresentaram evolução ao longo do tempo em relação ao momento inicial para o final do tratamento. Esse achado era esperado para o grupo controle que já partiu de um estado funcional normal. O grupo Desnervado apesar de demonstrar estatisticamente uma diferença ao longo do tempo, essa diferença foi negativa em relação ao ponto de partida, ou seja, os animais do grupo desnervado pioraram ainda mais a função neuromuscular. Os grupos EE, LBP e LBP+EE apresentaram melhora significativa em relação ao início do tratamento nos levando a entender que o tratamento pós cirúrgico com os métodos empregados foram importantes para a melhora funcional dos animais. Esta observação corrobora os achados de Takano *et al.* (2010) sobre aumento da força e da massa muscular em idosos após EE combinada com contração voluntária.

Andraus *et al.* (2017) encontraram melhora funcional dos grupos irradiados por LBP em diversas doses em relação ao grupo sem LBP após lesão por esmagamento de nervo isquiático de ratos. Takhtfooladi *et al.* (2015) em um trabalho semelhante encontraram evolução funcional após aplicação de LBP na recuperação de lesão por esmagamento do nervo isquiático em ratos quando comparado ao grupo controle.

### **Teste Eletrofisiológico**

Os animais do grupo desnervado não apresentaram resposta muscular ao estímulo elétrico, justamente por não apresentarem a conexão entre o nervo e o músculo, por este motivo, os valores de latência tenderam ao infinito e os valores de amplitude, ao infinito negativo, sendo retirados da análise estatística.

O teste eletrofisiológico nos fornece dados de latência e amplitude. A latência traduz-se na condução nervosa, ou seja, o número de fibras mielinizadas. Já a amplitude nos informa o número de fibras musculares que respondem ao estímulo elétrico e, conseqüentemente, ao número de axônios excitáveis (Robinson & Snyder-Mackler, 2001).

O teste foi realizado com o nervo tibial seccionado distalmente à NLT e repetimos o teste três vezes por animal. A frequência, duração e intensidade do

estímulo foram constantes para que a única variável fosse relativa ao grupo experimental.

O teste eletrofisiológico demonstrou uma diferença entre o grupo LBP e os demais para Latência e os demais parâmetros não detectaram diferença entre os grupos. Isto pode significar que, fora para a latência, os grupos experimentais conseguiram resultados positivos e se equivaleram ao grupo Controle, ou que este teste não foi suficientemente sensível.

Cabe ressaltar que tivemos intercorrências durante os testes eletrofisiológicos, pois o aparelho apresentou problemas técnicos como agulha de captação quebrada, ou falha na hora de captar sinal elétrico entre outros. Com isso perdemos a coleta de 9 ratos no grupo LBP de um total 19 coletas além de não podermos garantir que as medidas realizadas estão dentro dos padrões desejados.

### **Teste de Força Máxima do MTC**

O teste de força máxima foi elaborado seguindo os padrões de Isaacs *et al.* (2005), com as adaptações necessárias para cumprir o objetivo do nosso modelo experimental. Isaacs *et al.* (2005), realizaram o estímulo elétrico, durante o teste de força, no nervo e não no músculo, como foi realizado em nosso estudo, porque queriam comprovar a passagem do estímulo pela NTL, pois não realizaram estudos eletrofisiológicos específicos da condução nervosa. Além disso, a força muscular medida por Isaacs *et al.* (2005) não foi a força máxima e sim uma porcentagem do lado operado em relação ao lado controle do animal.

Marcos (2002) e Hala (2003) também realizaram o estímulo elétrico no nervo e não no músculo do animal, porém seus objetivos também eram diferentes do nosso. Estes autores estimularam o nervo fibular comum intacto para provocar contração do MTC de ratos e verificar o processo de fadiga muscular.

Optamos por estimular o músculo diretamente porque assim poderíamos alcançar a força de contração máxima do MTC dos animais. Também é importante ressaltar que se tentássemos realizar o estímulo elétrico, durante o teste de força máxima de contração do MTC, no nervo, não seria possível captar as contrações dos músculos dos ratos do grupo Desnervado e isso impediria uma comparação na qualidade da contração entre todos os grupos.

Utilizando uma frequência de 100 Hz, frequência que provoca contração tetânica, não encontramos diferenças entre os grupos experimentais e o grupo controle. A única diferença ocorreu do grupo desnervado em relação aos demais.

Este dado se apresentou diferente em relação ao estudo realizado por nosso grupo em 2013 onde encontramos diferença de força de contração do grupo eletro estimulado em relação ao grupo sem estimulação elétrica.

Os trabalhos realizados com LBP não costumam medir a força de contração muscular. Normalmente os autores de trabalhos com LBP se interessam mais na regeneração do nervo do que na preservação muscular (Buchaim et al., 2016; Souza et al., 2018).

### **Análise do músculo tibial cranial**

O MTC foi corado por HE, pois esta coloração evidencia bem a fibra muscular, permitindo as análises morfométricas desejadas. Além disso, é um método de baixo custo.

É importante destacar que a medida de diâmetro mínimo é mais confiável que a medida de área ou de diâmetro máximo, pois esse não sofre alteração da inclinação da navalha durante o corte histológico, conforme ressaltado por Romão *et al.* (2007) e descrito por De Sá *et al.* (2004).

Ao analisarmos os parâmetros de área, perímetro e diâmetro mínimo do corte transversal do músculo, encontramos uma superioridade dos grupos EE e LBP em relação aos grupos NLT e LBP+EE. Em relação à área da fibra tanto o grupo EE quanto o LBP se equiparam ao controle. Todos os grupos são superiores ao grupo Desnervado.

Este fato demonstra que o treinamento por EE e tratamento por LBP foram positivos para o MTC após a NTL, pois existe uma relação direta entre a secção transversal da fibra muscular com a força que esse músculo pode produzir (Neto, 2007). Este fato está sendo comprovado com os achados da figura 36 onde encontramos correlação positiva entre área da fibra muscular e o IFF180, mostrando que quanto maior a área da fibra muscular melhor será sua recuperação funcional. O mesmo ocorre para força muscular e área da fibra muscular. Outros estudos também

demonstram melhores parâmetros musculares para grupos tratados com EE ou com LBP após lesão de nervo periférico (Gigo-Benato et al., 2010; Maciel et al., 2013; Huang et al., 2013). Porém cabe ressaltar que durante o teste de força muscular não encontramos diferença entre os grupo.

### **Análise dos nervos**

Em relação à área das fibras nervosas, nas medidas de espessura da bainha de mielina, área da bainha de mielina, área da fibra nervosa e área do axônio nenhum grupo se igualou ao grupo controle e o grupo NLT foi superior aos demais grupos experimentais em todos esses parâmetros.

Para os parâmetros de diâmetro mínimo do axônio e diâmetro mínimo da fibra nervosa também nenhum grupo se equivaleu ao grupo controle porém, dessa vez foi o grupo EE que superou os demais grupos experimentais.

Em relação ao número de fibras nervosas por nervo os grupos LBP e LBP+EE foram superiores ao grupo NLT além de serem equivalentes ao grupo controle juntamente com o grupo EE.

Para a Razão G, que mede a proporcionalidade entre axônio e bainha de mielina, o grupo EE foi superior a todos os outro incluindo o grupo controle porém, o grupo controle também apresenta uma média que o coloca na faixa de normalidade para esta razão.

Os resultados encontrados nesta pesquisa em relação ao segmento nervoso N1 sugerem que houve uma aceleração da regeneração do nervo. Este fato também foi observado por Teodori *et al.* (2011); Tagami *et al.* (2009) e Buchaim et al. (2016).

Ahlborn *et al.* (2007) observaram, além da melhora funcional, os efeitos positivos sobre os motoneurônios e axônios regenerados indicando a EE como potencial abordagem clinicamente viável para a melhoria do reparo de nervos periféricos.

Nesse sentido Gigo-Benato et al. (2010b) também observaram, além dos efeitos da regeneração nervosa provocado pelo LBP, uma melhora nos parâmetros musculares, assim como Souza et al. (2018) e Wang et al. (2014) encontraram melhora funcional após recuperação de lesão de nervo periférico e tratamento com

LBP e Du et al. (2018) encontraram atenuação da atrofia muscular usando EE associada com células tronco da crista neural.

Os seguimentos N2 foi muito importante para comprovar o neuroma de amputação do coto proximal do nervo fibular comum descartando a possibilidade de uma reinervação espontânea que provocaria um viés indesejado no trabalho. O seguimento N3 apresenta a importância de comprovar a ocorrência de brotamento de axônios do nervo doador para o nervo receptor. Esses dois fatos ficaram comprovados na figura 39.

Este trabalho mostra uma associação interessante entre a corrente elétrica e o LASER de baixa potência visando recuperação do sistema neuromuscular após lesão e de nervo periférico corrigida com NLT. Além disso o trabalho também apresenta as terapias LBP e EE como opções sem serem combinadas. Os resultados foram interessante e mostraram de forma geral que essas intervenções são válidas, porém não pudemos realizar uma comparação com trabalhos que combinem as duas terapias porque não encontramos esse modelo na literatura atual.

Os trabalhos que normalmente se apresentam com LBP e EE estão fazendo uma comparação entre as duas técnicas e não uma combinação entre elas, além disso não necessariamente esses trabalhos objetivam reparação de lesões de nervos periféricos. A maioria desses trabalhos falam sobre desordens temporomandibulares (Núñez et al., 2006; Casali et al., 2013; Seifi et al., 2017; Rezazadeh et al., 2017).

Analisando de modo geral a todos os atributos e principalmente ao teste funcional que seria o desfecho principal desse estudo, observamos que os grupos EE, LBP e LBP+EE foram superiores ao grupo NLT e por este motivo, a terapias aplicadas neste estudo poderiam ser sugeridas como tratamento associado após todos os reparos de nervos periféricos. Mantendo sempre o cuidado de desenvolver e selecionar os parâmetros terapêuticos adequados para cada tipo de músculo.

Não encontramos na literatura um trabalho que tivesse a proposta de realizar o tratamento de lesões de nervos periféricos com a combinação do LBP com a EE especialmente com o tempo de observação e tratamento que usamos (180 dias). Isto reforça a importância desse estudo.

Como desfecho final e observando os parâmetros separadamente, pudemos observar que quando juntamos os resultados dos parâmetros musculares os grupos que se destacam são EE e LBP. Quando juntamos os resultado dos parâmetros das fibras nervosas os grupos em destaques são EE e NLT. Por fim quando juntamos os parâmetros funcionais os grupos em destaque são EE, LBP e LBP+EE. Com isso podemos observar que o grupo EE parece ter apresentado boa resposta tanto muscular, quanto para as fibras nervosas e essas respostas foram traduzidas em uma melhora considerável da função do sistema neuromuscular dos animais. Já o grupo LBP+EE apresentou boa melhora funcional mas não teve bons parâmetros morfométricos tanto para músculo quanto para nervo. Esse fato pode ser resultado de uma interação entre as duas técnicas de tratamento que ainda não conhecemos mas que certamente continuaremos investigando em estudos futuros.

Observamos um menor aumento de massa corporal dos animais tratados com estimulação elétrica e podemos associar esse fato à contingência cápsula de imobilização ou mesmo ao estímulo elétrico em si. Com isso podemos imaginar que o tratamento com a estimulação elétrica poderia ter alcançado resultados ainda melhores caso o estresse fosse eliminado. Esse fato também deverá ser observado em pesquisas futuras.

## **6 CONCLUSÃO**

Com base em nosso modelo experimental, pudemos concluir que todos os métodos de tratamento foram capazes de proporcionar um certo grau de regeneração nervosa e recuperação funcional.

A estimulação elétrica apresentou melhores resultados na regeneração nervosa, manutenção muscular e recuperação funcional dos sistema neuromuscular do que os demais grupos.

## REFERÊNCIAS

Abreu MF, Fagundes DS. Ação da irradiação laser de baixa frequência (LLLT) sobre os mecanismos celulares envolvidos na reparação de tecido nervoso periférico. *Rev. Cient. Fac. Edu. Meio Amb.* [on line]. 2011; 2(2):80-96.

Ahlborn P, Schachner M, Irintchev A. One hour electrical stimulation accelerates functional recovery after femoral nerve repair. *Exp Neurol.* 2007; 208(1):137-44. Epub 2007 Aug 23.

Akgul T, Gulsoy M, Gulcur HO. Effects of early and delayed laser application on nerve regeneration et al. *Lasers Med Sci* (2014) 29:351–357.

Alcântara CC, Gigo-Benato D, Salvini TF, Oliveira AL, Anders JJ, Russo TL. Effect of low-level laser therapy (LLLT) on acute neural recovery and inflammation-related gene expression after crush injury in rat sciatic nerve. *Lasers Surg Med* (2013) 45:246–252

Al-Qattan MM, Al-Thunyan A. Variables affecting axonal regeneration following end-to-side neurorrhaphy. *Br J Plast Surg.* 1998; 51(3):238-42.

Andraus RAC. Efeitos da Irradiação a LASER de Baixa Potência na Regeneração do Nervo Fibular Comum do Rato Submetido a Lesão por Esmagamento, 2009. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Disponível em:< file:///C:/Users/User/Downloads/Dissertacao\_Mestrado\_Definitiva.pdf>. Acesso em: 05 nov. 2018.

Andraus RAC, Barbieri CH, Mazzer N. A irradiação local com laser de baixa potência acelera a regeneração do nervo fibular comum de ratos. *Acta Ortop Bras.* 2010; 18(3):152-7.

Andraus RAC, et al. LLLT activates MMP-2 and increases muscle mechanical resistance after nerve sciatic rat regeneration. *Lasers Med Sci.* 2017; May;32(4):771-778.

Andreo L, et al. Effects of photobiomodulation on experimental models of peripheral nerve injury. *Lasers Med Sci.* 2017 Dec;32(9):2155-2165.

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

Babcock WW. A standard technique for operations on peripheral nerves with especial reference to the closure of large gaps. *Surg Gynecol Obstet.* 1927; 45:364-78.

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):129-36.

Baker MM, Juhn MS. Patellofemoral pain syndrome in the female athlete. *Clin Sports Med.* 2000; 19:315-29.

Ballance CA, Ballance HA, Stewart P. Remarks on the operative treatment of chronic facial palsy of peripheral origin. *Br Med J.* 1903; 2:1009-13.

Ballance CA. Some results of nerve anastomosis. *Br J Surg.* 1923; 11:327-46.

Basmajian JV. *Electro-fisiología de la acción muscular.* Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana S.A., 1976.

Beris A, Lykissas M, Korompilias A, Mitsionis G. End-to-side nerve repair in peripheral nerve injury. *J Neurotrauma.* 2007; 24(5):909-16.

Beris AE, Lykissas MG. Experimental results in end-to-side neurorrhaphy. *Int Rev Neurobiol.* 2009; 87:269-79.

Bertelli JA, Santos ARS, Calixto JB. Is axonal sprouting able to traverse the conjunctival layers of the peripheral nerve? A behavioral, motor, and sensory study of end-to-side nerve anastomosis. *J Reconstr Microsurg.* 1996; 12(8):559-63.

Bervar M. Video analysis of standing — an alternative footprint analysis to assess functional loss following injury to the rat sciatic nerve. *J Neurosci Methods.* 2000; 102: 109–116.

Bickel CS, Slade JM, Warren GL, Dudley GA. Fatigability and variable-frequency train stimulation of human skeletal muscle. *Phys Ther.* 2003; 83:366-73.

Bora FW Jr, Pleasure DE, Didizian NA. A study of nerve regeneration and neuroma formation after nerve suture by various techniques. *J Hand Surg Am.* 1976; 1:138-43.

Bora FW Jr. A comparison of epineural, perineural and epineural methods of nerve suture. *Clin Orthop Relat Res.* 1978; 133:91-4.

Bora W. Peripheral nerve repair in cats: the fascicular stitch. *J Bone Joint Surg Am.* 1967; 49:659-66.

Bratton BR, Kline DG, Hudson AR, Coleman WT. Use of monofilament polyglycolic acid suture for experimental peripheral nerve repair. *J Surg Res.* 1981; 31:482-9.

Braun RM. Epineurial nerve suture. *Clin Orthop Relat Res.* 1982; 163:50-6.

Brenner MJ, Dvali L, Hunter DA, Myckatyn TM, Mackinnon SE. Motor neuron regeneration through end-to-side repairs is a function of donor nerve axotomy. *Plast Reconstr Surg.* 2007; 120(1):215-23.

Brushart TME & Seiler WA. Selective reinnervation of distal motor stumps by peripheral motor axons. *Exp Neurol.* 1987; 97:289-300.

Buchaim et al. The new heterologous fibrin sealant in combination with low-level laser therapy (LLLT) in the repair of the buccal branch of the facial nerve. *Lasers Med Sci*, 2016.

Burt AV. *Neuroanatomia*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1995, p412.

Cabral CMN, Monteiro-Pedro V. Recuperação funcional de indivíduos com disfunção femoropatelar por meio de exercícios em cadeia cinética fechada: revisão da literatura. *Rev Bras Fisioter*. 2003; 7:1-8.

Caierão QM, Betini J, Teodori RM, Minamoto VB. O efeito do intervalo da estimulação elétrica no músculo desnervado de rato. *Rev Bras Fisioter*. 2008; 12(2):143-8.

Câmara CNS, Brito MVH, Silveira EL, Silva DSG, Simões VRF, Pontes RWF. Histological analysis of low-intensity laser therapy effects in peripheral nerve regeneration in Wistar rats. *Acta Cir. Bras*. 2011; 26 (1):12-18.

Camargo VM, Costa J, André ES. Estudo comparativo entre dois tipos de raio laser de baixa potência e seus respectivos efeitos sobre a regeneração nervosa periférica. *Fisioter Mov*. 2006;19(2):127-34.

Carandente F, Angeli A, Candiani GB, Crosignani PG, Dammasco F, De-Cecco L, Marrama P, Massobrio M, Martini L. Rhythms in the ovulatory cycle. 2nd: LH, FSH, estradiol and progesterone. *Chronobiologia*. 1989; 16(4):353-63.

Carlton JM, Goldberg NH. Quantitating integrated muscle function following reinnervation. *Surg Forum*. 1986; 37: 611–614.

Carvalho DCI, Rosim GC, Gama LOR, Tavares MR, Tribioli RA, Santos IR, Cliquet Júnior A. Tratamentos não farmacológicos na estimulação da osteogênese. *Rev Saúde Pública*. 2002; 36(5):647-54.

Carvalho LC, Polizello JC, Padula N, Freitas FC, Shimano AC, Mattiello-Sverzut AC. Propriedades mecânicas do gastrocnêmio eletroestimulado pós-imobilização. *Acta Ortop Bras*. [online]. 2009; 17(5):269-72.

Casali R, Damiani C, Maestri R, Wells CD. Pain and electrophysiological parameters are improved by combined 830-1064 high-intensity LASER in symptomatic carpal tunnel syndrome versus Transcutaneous Electrical Nerve Stimulation. *Eur J Phys Rehabil Med*. 2013; 49:205-11.

Chem RC. Cirurgia sobre nervos periféricos. *Rev Amrigs*. 1978; 22:20-37.

Chen Y-J, Wang Y-H, Wang C-Z, Ho M-L, Kuo P-L, et al. Effect of Low Level Laser Therapy on Chronic Compression of the Dorsal Root Ganglion. *PLoS ONE*. 2014; 9(3): e89894, 1- 8.

Coleman CC. Surgical treatment of peripheral nerve injuries. *Surg Gynecol Obstet*. 1944; 78:113-24.

Colin W, Donoff RB. Nerve regeneration through collagen tubes. *J Dent Res.* 1984; 63:987.

Colomé LM, Gomes C, Crosignani N, Paz AH, Lugo AA, Guimarães KM, Foerstrom LP, Tessari JP, Colomé LM, Graça DL, Meurer L, Passos EP, Pippi NL, Cotesini EA, Lima EOC. Utilização de células tronco autólogas de medula óssea na regeneração do nervo tibial de coelhos mediante técnica de tubulização com prótese de silicone. *Ciência Rural.* 2008; 38(9):2529-34.

Cowan SM, Bennell KL, Hodges PW, Crossley KA, McConnell J. Delayed onset of electromyographic activity of vastus medialis obliquus relative to vastus lateralis in subjects with patellofemoral pain syndrome. *Arch Phys Med Rehabil.* 2001; 82:183-9.

Da-Silva C. *Biologia Celular e Molecular da regeneração do sistema nervoso periférico.* Atual Neurociênc. 1995; 19:1-16.

Dellon AL, Ferreira MC, Williams EH, Rosson GD. Which End is Up? Terminology for Terminolateral (End-to-Side) Nerve Repair: A Review. *J Reconstr Microsurg.* 2010; 26(5):295-301

Dellon AL, Mackinnon SE. Selection of the appropriate parameter to measure neural regeneration. *Ann Plast Surg.* 1989; 23:197–202.

Dellon ES, Dellon AL. Functional assessment of neurologic impairment: track analysis in diabetic and compression neuropathies. *Plast Reconstr Surg.* 1991; 88:686–694.

De Medinaceli L, Freed W, Wyatt RJ. An index of the functional condition of rat sciatic nerve based on measurements made from walking tracks. *Exp Neurol.* 1982; 77:634-43.

De Sá JMR, Mazzer N, Barbieri CH, Barreira AA. The end-to-side peripheral nerve repair functional and morphometric study using the peroneal nerve of rats. *J Neurosci Methods.* 2004; 136(1):45-53.

Doucette SA, Child DD. The effect of open and closed exercise and knee joint position on patellar tracking in lateral patellar compression syndrome. *J Orthop Sports Phys Ther.* 1996; 23:104-10.

Dow DE, Cederna PS, Hassett CA, Kostrominova TY, Faulkner JA, Dennis RG. Number of contractions to maintain mass and force of denervated rat muscle. *Muscle Nerve.* 2004; 30:77–86.

Du J, et al. Optimal electrical stimulation boosts stem cell therapy in nerve regeneration. *Biomaterials.* 2018 October ; 181: 347–359.

Durigan JLQ, Cancelliero KM, Dias CKN, Silva CA, Guirro RRJ, Polacow MLO. Efeitos da estimulação elétrica neuromuscular sobre o membro posterior imobilizado

de ratos durante 15 dias: análises metabólicas e morfométricas. *Rev Bras Fisioter.* 2006; 10(3):297-302.

Ellis JC, McCaffrey TV. Animal model for peripheral nerve grafting. *Otolaryngol Head Neck Sur.* 1984; 92(5):546-50.

Elzing K, Tyreman N, Ladak A, Savaryn B, Olson J, Gordon T. Brief electrical stimulation improves nerve regeneration after delayed repair in Sprague Dawley rats. *Experimental Neurology* 2015; 269; 142–153.

Elsberg CA. Experiments on motor nerve regeneration and the direct neurotization of paralyzed muscles by their own and by foreign nerves. *Science.* 1917; 45:318-20.

Enoka RM. Bases neuromecânicas da cinesiologia. 2ed. São Paulo: Manole, 2000.

Evans PJ, Bain JR, Mackinnon SE, Makino AP, Hunter DA. Selective reinnervation: a comparison of recovery following microsuture and conduit nerve repair. *Brain Res.* 1991; 559(2):315-21.

Fansa H, Keilhoff G, Altmann S, Plogmeier K, Wolf G, Chneider W. The effect of the immunosuppressant FK506 on peripheral nerve regeneration following nerve grafting. *J Hand Surg Br.* 1999; 24(1):38-42.

Fonseca ST, Cruz ABC, Lima SS, Seixas AFAM. Análise eletromiográfica dos músculos vasto medial oblíquo e vasto lateral em exercícios usados no tratamento da síndrome da dor patelofemoral. *Rev Fisiot Univers São Paulo.* 2001; 8(1):1-10.

Fox TA. Dysplasia of the quadriceps mechanism: hypoplasia of the vastus medialis muscle as related to the hypermobile patella syndrome. *Surg Clin North Am.* 1975; 55:199-206.

Franco RG. Estudo Comparativo com diferentes números de pontes na neurografia látero-terminal em ratos. [Dissertação de Mestrado]. Botucatu: Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina, 2010.

Fu SY, Gordon T. The cellular and molecular basis of peripheral nerve regeneration. *Mol Neurobiol.* 1997; 14:67-116.

Galli SK, Valauri F, Komisar A. Facial reanimation by cross-facial nerve grafting: report of five cases. *Ear Nose Throat J.* 2002; 81(1):25-9.

Gaster M, Handberg A, Beck-Nielsen H, Schroder HD. Glucose transporter expression in human skeletal muscle fibers. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2000; 279(3):E529-38.

Gatta R. Sulla anastomosi latero-terminale dei tronchi nervosi. *Arch Ital Chir.* 1938; 48:155-71.

Gigo-Benato D, Geuna S, Castro RA, Tos P, Fornaro M, Boux E, Battiston B, Giacobini-Robecchi MG, et al. Low-power laser biostimulation enhances nerve repair

after end-to-side neurorrhaphy: a double-blind randomized study in the rat median nerve model. *Lasers in Medical Science* (2004) 19: 57–65.

Gigo-Benato D, Russo TL, Geuna S, Domingues NR, Salvini TF, Parizzoto NA. Electrical stimulation impairs early functional recovery and accentuates skeletal muscle atrophy after sciatic nerve crush injury in rats. *Muscle Nerve*. 2010a; 41(5):685-93.

Gigo-Benato D, Russo TL, Tanaka EH, Assis L, Salvini TF Parizzoto NA. Effects of 660 and 780nm Low-Level Laser Therapy on Neuromuscular Recovery After Crush Injury in Rat Sciatic Nerve. *Lasers in Surgery and Medicine* 2010b; 42:673–682.

Giovanoli P, Koller R, Meuli-Simmen C, Rab M, Haslik W, Mittlbo M, Meyer VE, Frey M. Functional and Morphometric Evaluation of End-to-Side Neurorrhaphy for Muscle Reinnervation. *Plast Reconstr Surg*. 2000; 106(2):388-92.

Girolami U, Anthony DC, Frosch MP. Nervo periférico e músculo esquelético. In: Cotran RS, Kuman V, Collins T. *Robbins Patologia Estrutural e Funcional*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p.1135-54.

Goheen-Robillard B, Myckatyn TM, Mackinnon SE, Hunter DA. End-to-side neurorrhaphy and lateral axonal sprouting in a long graft rat model. *Laryngoscope*. 2002; 112(5):899-905.

Gordon T. Electrical Stimulation to Enhance Axon Regeneration After Peripheral Nerve Injuries in Animal Models and Humans. *Neurotherapeutics*. 2016; 13:295–310.

Grabb WC, Bement SL, Koepke GH, Green RA. Comparison of methods of peripheral nerve suturing in monkeys. *Plast Reconstr Surg*. 1970; 46:31-8.

Gregory CM, Bickel CS. Recruitment patterns in human skeletal muscle during electrical stimulation. *Phys Ther*. 2005; 85:358-64.

Guiro RRJ, Silva CA, Forti F, Cancelliero KM. Análise do músculo esquelético desnervado tratado com metformina e/ou estimulação elétrica de baixa frequência. *Rev Bras Fisioter*. 2004; 8(1):21-7.

Guyton AC, *Tratado de fisiologia médica*. 6a.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1986.

Haninec P, Ámal FS, Tomas R, Houstava L, Dubovy P. Direct repair (nerve grafting), neurotization, end-to-side neurorrhaphy in the treatment of brachial plexus injury. *J Neurosurg*. 2007; 106:391-99.

Hala AZA. Efeito da irradiação laser e da irradiação infra vermelha em músculo tibial anterior de ratos submetido ao processo de fadiga muscular. [Dissertação de Mestrado]. São José dos Campos: Universidade do Vale do Paraíba, Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, 2003.

Harris ME, Tindall SC. Techniques of peripheral nerve repair. *Neurosurg Clin N Am*. 1991; 2:93-104.

Hayashi A, Yanai A, Komuro Y, Nishida M, Inoue M, Seki T. Collateral sprouting occurs following end-to-side neurotization. *Plast Reconstr Surg*. 2004; 114(1):129-137.

Henneman E, Olson CB. Relations between structure and function in the design of skeletal muscles. *J Neurophysiol*. 1965; 28:581-598.

Hentz VR, Rosen JM, Xiao SJ *et al*. A comparison of suture and tubulization nerve repair techniques in a primate. *J Hand Surg Am*. 1991; 16:251-61.

Huang J, Zhang Y, Lu L, Hu X, Luo Z. Electrical stimulation accelerates nerve regeneration and functional recovery in delayed peripheral nerve injury in rats. *European Journal of Neuroscience*. 2013; 38; 3691–3701.

Huckhagel T1, Nüchtern J2, Regelsberger J3, Gelderblom M4, Lefering R5; TraumaRegister DGU. Nerve trauma of the lower extremity: evaluation of 60,422 leg injured patients from the TraumaRegister DGU® between 2002 and 2015. *Scand J Trauma Resusc Emerg Med*. 2018 May 15;26(1):40.

Iñigo PR. Estimulación con corrientes de alta frecuencia para la cicatrización de la ruptura de meniscos en las lesiones en zona vascular y avascular, reporte preliminar de un nuevo abordaje terapéutico. *Rev Mex Ortop Traumatol*. 1998; 12(5):421-4.

Isaacs J, Allen D, Chen LE, Nunley J. Reverse End-to-Side Neurotization. *J Reconstr Microsurg*. 2005; 21(1):43-48.

Ito T, Hirohata H, Yamamoto K. Peripheral nerve repairs by the funicular suture technique. *Acta Orthop Scand*. 1976; 47:283-9.

Jaberi FM, Abbas BP, Nezhad ST, Tanideh N. End-to-side neurotization: an experimental study in rabbits. *Microsurgery*. 2003; 23(4):359-62.

James DE, Strube M, Mucckler M. Molecular cloning and characterization of an insulin-regulatable glucose transporter. *Nature*; 1989; 338:83-7.

Jia X, Chen C, Yang J, Yu C. End-to-side neurotization with the phrenic nerve in restoring the function of toe extension: an experimental study in a rat model. *Journal of Plastic Surgery and Hand Surgery*. 2017; 1-4.

Junqueira LC, Carneiro C. *Histologia básica*. 9 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999, p427.

Kanaya F, Tajima T. Effect of electrostimulation on denervated muscle. *Clin Orthop Relat Res*. 1992; (283):296-301.

Karu T. Photobiological fundamentals of low-power laser therapy. *IEEE J. Quant. Elec*. 1987; QE-23; 10: 1703-1717.

Kisner C, Colby LA. Exercícios Terapêuticos: Fundamentos e Técnicas. 4 ed. Barueri: Manole, 2005.

Kleinert HE, Griffin JM. Technique of nerve anastomosis. *Orthop Clin North Am.* 1973; 4:907-15.

Koh KS, Kim JK, Kim CJ, Kwun BD, Kim SY. Hypoglossal-facial crossover in facial-nerve palsy: pure end-to-side anastomosis technique. *Br J Plast Surg.* 2002; 55(1):25-31.

Kotwal A, Schmidt CE. Electrical stimulation alters absorption and nerve cell interactions with electrically conducting biomaterials. *Biomaterials.* 2001; 22(10):1055-64.

Kumar PA, Hassan KM. Cross-face nerve graft with free-muscle transfer for reanimation of the paralysed face: a comparative study of the single stage and two-stage procedures. *Plast Reconstr Surg.* 2002; 109(2):451-62.

Kurze T. Microtechniques in neurological surgery. *Clin Neurosurg.* 1964; 11:128.

Langley NN, Hashimoto M. On the suture of separate nerve bundles in a nerve trunk and on internal plexuses. *J Physiol.* 1917; 51:318.

Liao WC, Chen JR, Wang YJ, Tseng GF. The efficacy of end-to-end and end-to-side nerve repair (neurorrhaphy) in the rat brachial plexus. *J Anat.* 2009; 215(5):506-21.

Lincoln GA, Short RV. Seasonal breeding nature's contraceptive. *Recent Prog Horm Res.* 1980; 36:1-52.

Liu K, Chen LE, Seaber AV, Goldner RV, Urbaniak JR. Motor functional and morphological findings following end-to-side neurorrhaphy in the rat model. *J Orthop Res.* 1999; 17(2):293-300.

Lohman R, Bullock F, McNaughton T, Siemionow M. End-to-end vs. end-to-side neurorrhaphy. *J Reconstr Microsurg.* 1997; 13:135-6.

Low J, Reed A. Eletroterapia explicada: princípios e prática. 3 ed. Barueri: Manole, 2001.

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

Lundborg G, Dhalin LB, Danielsen N, Nachemson AK. Tissue specificity in nerve regeneration. *Scand J Plast Reconstr Surg.* 1986; 20:279-83.

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

Lundborg G, Zhao Q, Kanje M, Danielsen N, Kerns JM. Can sensory and motor collateral sprouting be induced from intact peripheral nerve by end-to-side anastomosis? *J Hand Surg Br.* 1994; 19B:277-82.

Lutz BS, Chuang DCC, Hsu JC, Ma SF, Wei FC. Selection of donor nerve an important factor in end-to-side neurorrhaphy. *Br J Plast Surg.* 2000a; 53:149-54.

Lutz BS, Ma SF, Chuang DC, Wei FC. Role of the target in end-to-side neurorrhaphy: reinnervation of a single muscle vs. multiple muscles. *J Reconstr Microsurg.* 2000b; 16(6):443-8.

Maciel FO. Efeitos da corrente russa no ganho de força muscular. *Fisioterapia Ser.* 2010; 5(4):226-9.

Maciel F O, Viterbo F, Chinaque LFC, Souza BM. Effect of electrical stimulation of the cranial tibial muscle after end-to-side neurorrhaphy of the peroneal nerve in rats. *Acta Cir. Bras.* 2012; 28 (1): 39-47.

Majno G. *The healing hand man and wound in the ancient world.* Cambridge: Harvard University Press, 1975.

MacGregor K, Gerlach S, Mellor R, Hodges PW. Cutaneous stimulation rom patella tape causes a differential increase in vasti muscle activity in people with patellofemoral pain. *J Orthop Res.* 2004; 23:351–8.

Mandelbaum-Livnat MM1, Almog M1, Nissan M1, Loeb E2, Shapira Y1, Rochkind S. Photobiomodulation Triple Treatment in Peripheral Nerve Injury: Nerve and Muscle Response. *Photomed Laser Surg.* 2016 Dec;34(12):638-645.

Marcos RL. Avaliação do efeito da irradiação laser AsGaAl (630-680 nm) no modelo experimental de fadiga muscular induzida por estimulação elétrica em ratos. [Dissertação de Mestrado]. São José dos Campos: Universidade do Vale do Paraíba, Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, 2002.

Matsuda K, Kakibuchi M, Kubo T, Tomita K, Fujiwara T, Hattori R, Yano K, Hosokawa K. A new model of end-to-side nerve graft for multiple branch reconstruction: end-to-side cross-face nerve graft in rats. *J Plast Reconstr Aesthet Surg.* 61(11):1357-67. 2008.

McCallister WV, Tang P, Trumble TE. Is end-to-side neurorrhaphy effective? A study of axonal sprouting stimulated from intact nerves. *J Reconstr Microsurg.* 1999; 15(8):597-604.

McIntyre DL, Robertson GE. Quadriceps muscle activity in women runners with and without patellofemoral pain syndrome. *Arch Phys Med Rehabil.* 1992; 7(10):14.

Mcquarrie IG. *Peripheral Nerve Surgery.* *Neurol Clin.* 1985; 3:453-66.

Mennen U. End-to-side nerve suture in primate (Chacma Baboon). *J Hand Surg.* 1998; 3:1-6.

Millesi H, Meissl G, Berger A. The interfascicular nerve-grafting of the median and ulnar nerves. *J Bone Joint Surg Am.* 1972; 54:727-50.

Millesi H. Peripheral nerve injuries. Nerve sutures and nerve injuries. *Scand J Plast Reconstr Surg Suppl.* 1982; 19:25-37.

Millesi H. Peripheral nerve repair: terminology, questions, and facts. *J Reconstr Microsurg.* 1985; 2(1):21-31.

Millesi H, Zöch G, Reihnsner R. Mechanical properties of peripheral nerves. *Clin Orthop Relat Res.* 1995; 314:76-83.

Millesi H, Hausner T, Schmidhammer R, Trattnig S, Tschabitscher M. Anatomical structures to provide passive motility of peripheral nerve trunks and fascicles. *Acta Neurochir Suppl.* 2007; 100:133-5.

Monte-Raso VV, Barbieri CH, Mazzer N, Yamasita AC, Barbieri G. Is the sciatic functional index always reliable and reproducible? *J Neurosc Methods.* 2008; 170:255-61.

Müller SF. Estudo Morfológico da regeneração axonal na síntese látero-terminal de nervo periférico de ratos com adesivo de fibrina e micro-sutura. [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo, Faculdade de Medicina, 2001.

Murray JA, Willins M, Mountain RE. A comparison of epineurial and perineurial sutures for the repair of a divided rat sciatic nerve. *Clin Otolaryngol Allied Sci.* 1994;19(2):95-7.

Myckatyn TM, Mackinnon SE, Hunter DA, Brakefield D, Parsadonian A. A novel model for the study of peripheral-nerve regeneration following common nerve injury paradigms. *J Reconstr Microsurg.* 2004; 20(7):533-44.

Narakas A. Les greffes nerveuses, expérience clinique. *Ann Chir Main.* 1989; 8:302-11.

Nelson RM, Hayes KW; Currier DP. *Eletroterapia Clínica.* 3 ed. Barueri: Manole, 2003.

Nemeth PM. Electrical stimulation of denervated muscle prevents decreases in oxidative enzymes. *Muscle Nerve.* 1982; 5(2):134-9.

Neto AG. Comparação entre estimulação elétrica funcional e contração voluntária máxima no treinamento de força muscular da preensão palmar. [Dissertação de Mestrado]. Brasília: Universidade Católica de Brasília, Programa de Pós Graduação em Educação Física, 2007.

Nissan M. et al. HeNe Laser irradiation delivered transcutaneously: its effect on the sciatic nerve of rats. *Laser Surg. Med.* 1986; 6:435-438.

Núñez SC, Garces AS, Suzuki SS, Ribeiro MS. Management of Mouth Opening in Patients with Temporomandibular Disorders through Low-Level Laser Therapy and Transcutaneous Electrical Neural Stimulation. *Photomedicine and Laser Surgery*. 2006; 24(1): 45–49.

Ögün TC, Özdemir M, Senaran H, Üstün ME. End-to-side neurorrhaphy as a salvage procedure for irreparable nerve injuries. *J Neurosurg*. 2003; 99(1):180-5.

Orgel MG, Terzis JK. Epineural vs. perineurial repair. An ultrastructural and electrophysiological study of nerve regeneration. *Plast Reconstr Surg*. 1977; 60:80-91.

Papalia I, Geuna S, Tos PL, Boux E, Battiston B, Stagno D'Alcontres F. Morphologic and functional study of rat median nerve repair by terminolateral neurorrhaphy of the ulnar nerve. *J Reconstr Microsurg*. 2003; 19(4):257-64.

Papalia I, Lacrois C, Brunelli F, D'Alcontres FS. Direct neurotization after end-to-side neurorrhaphy. *J Reconstr Microsurg*. 2001; 17(4):237-46.

Pardini Jr AG, Freitas AD, Plentz EG. Avaliação da sensibilidade após neurorafia látero-terminal de nervos digitais: nota prévia. *Rev Bras Ortop*. 2005; 40(9):543-54.

Patel NP, Lyon KA, Huang JH. An update—tissue engineered nerve grafts for the repair of peripheral nerve injuries. *Neural Regen Res*. 2018 May;13(5):764-774.

Pereira CEM, Silva JDM, Romeiro VR. Aspectos éticos da experimentação animal. *Acta Cir Bras*. 1998; 13(2):123-128.

Pette D, Staron RS. Mammalian skeletal muscle fiber type transitions. *Int Rev Cytol*. 1997; 170:143-223.

Politis MJ, Ederle K, Spencer PS. Tropism in nerve regeneration in vivo. Attraction of regenerating axons by diffusible factors derived from cells in distal nerve stumps of transected peripheral nerves. *Brain Res*. 1982; 253:1-12.

Polônio JT, Mazzer M, Barbieri CH, Mattiello-Sverzut AC. Eletroestimulação seletiva mantém estrutura e função do tibial anterior desnervado de ratos. *Acta Ortop Bras*. 2010; 18(2):85-9.

Qin L, Appell HJ, Chan KM, Maffulli N. Electrical stimulation prevents immobilization atrophy in skeletal muscle of rabbits. *Arch Phys Med Rehabil*. 1997; 78:512-7.

Reddy GK, Stehno-Bittel L, Enwemwka CS. Laser photostimulation accelerates wound healing in diabetic rats. *Wound Rep. Regen*. 2001; 9,3: 248-255.

Rezazadeh F., Hajian K., Shahidi sh., Piroozi S. Comparison of the Effects of Transcutaneous Electrical Nerve Stimulation and Low-Level Laser Therapy on Drug-Resistant Temporomandibular Disorders. *J Dent Shiraz Univ Med Sci*, 2017 September; 18(3): 187-192.

Robinson AJ, Snyder-Mackler L. Eletrofisiologia clínica. 2 ed. Porto Alegre: Artmed, 2001.

Rochkind S, et al. Stimulatory effect of He-Ne low dose laser on injured sciatic nerves of rats. *Neurosurg.* 1987; 20, 6:843-847.

Rochkind S. Central Nervous System Transplantation Benefitted by Low-power Laser Irradiation. *Lasers in Medical Science* 1992.7:143-151.

Rochkind S. Photobiomodulation in Neuroscience: A Summary of Personal Experience. *Photomed Laser Surg.* 2017 Nov;35(11):604-615.

Rodrigues AC, Silva MD. Inside-out versus standard artery graft to repair a sensory nerve in rats. *Microsurgery.* 2001; 21:102-7.

Romão AM, Viterbo F, Stipp E, Garbino JA, Rodrigues JA. Eletroestimulação do músculo tibial cranial após esmagamento do nervo fibular comum: estudo neurofisiológico e morfométrico no rato. *Rev Bras Ortop.* 2007; 42(3):41-6.

Rouleau M, Crepeau J, Tetreault L, Lamarche J. Facial nerve sutures: epineural versus perineural sutures. *J Otolaryngol.* 1981; 10:338-42.

Rovak JM, Cederna PS, Kuzon WM. Terminolateral neurorrhaphy: a review of the literature. *J Reconstr Microsurg.* 2001; 17(8):615-24.

Ruffin MT, Kningham RB. Anterior knee pain: the challenge of patellofemoral syndrome. *Am Fam Physician.* 1993; 47(1):185-94.

Russo TL, Peviani SM, Durigan JLQ, Salvini TF. Electrical stimulation increases matrix metalloproteinase-2 gene expression but does not change its activity in denervated rat muscle. *Muscle Nerve.* 2008; 37:593–600.

Rutherford OM, Jones DA. The role of learning and coordination in strength training. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol.* 1986; 55(1):100-5.

Saito S, Shimizu N. Stimulatory effects of low -power laser irradiation on bone regeneration in midpalatal suture during expansion in the rat. *Am. J. Orthod. Dentofac. Orthop.* 1997; 111:525-532.

Sato KM. Comparação de neurorrafias término-terminais e término-laterais na reconstrução do nervo mediano: pesquisa experimental em ratos Wistar adultos [TCC Graduação Medicina]. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

Schmidhammer R, Redl H, Hopf R, Van der Nest DG, Millesi H. Synergistic terminal motor end-to-side nerve graft repair: investigation in a non-human primate model. *Acta Neurochir Suppl.* 2007; 100:97-101.

Seddon HJ. Three types of nerve injury. *Brain.* 1943; 66:237-88.

Seddon HJ. Nerve grafting. *J Bone Joint Surg Br.* 1963; 45:447-61.

Shaller O. *Nomenclatura anatômica veterinária ilustrada.* Barueri: Manole, 1999. 614p.

Seifi M, Ebadifar A, Kabiri S, Badiie MR, Abdolazimi Z, Amdjadi P. Comparative effectiveness of low level laser therapy and transcutaneous electric nerve stimulation on temporomandibular joint disorders. *J Lasers Med Sci.* 2017;8(Suppl 1):S27-S31.

Shen CC, Yang YC, Huang TB, Chan SC, Liu BS. Neural regeneration in a novel nerve conduit across a large gap of the transected sciatic nerve in rats with low-level laser phototherapy. *J Biomed Mater Res A.* 2013; 101:2763–2777.

Souza TD, Del Carlo RJ, Vilorio MIV. Eletroterapia no processo de reparação da superfície articular de coelhos. *Ciência Rural.* 2001; 31(5):819-24.

Souza LG, Marcolino AM, Kuriki HU, Gonçalves ECD, Fonseca MCR, Barbosa RN. Comparative effect of photobiomodulation associated with dexamethasone after sciatic nerve injury model. *Lasers in Medical Science.* 2018; 1-9.

Smith JW. Microsurgery of peripheral nerves. *Plast Reconstr Surg.* 1964; 33:317.

Snyder-Mackler L, Delitto A, Stralka SW, Bailey SL. Use of electrical stimulation to enhance recovery of quadriceps femoris muscle force production in patients following anterior cruciate ligament reconstruction. *Phys Ther.* 1994; 74:901-7.

Soo CL, Currier DP, Therelked AJ. Augmenting Voluntary Torque of Healthy Muscle by Optimization of Electrical Stimulation. *Phys Ther.* 1988; 68:333-7.

Sperandei S. The myth of the selective activation of the vastus medialis. *R bras Ci e Mov.* 2005; 13(1):109-16.

Starkey C. *Recursos terapêuticos em fisioterapia.* Barueri: Manole, 2001.

Stiene HA, Brosky T, Reiking MF, Nyland J, Mason MB. A comparison of closed kinetic chain and isokinetic joint isolation exercise in patients with patellofemoral dysfunction. *J Orthop Sports Phys Ther.* 1996; 24:136-41.

Stookey B. Artificial nerve branches for innervation of paralyzed muscles. *Arch Surg.* 1923; 6:731-8.

Sunderland, S. *Nerves and nerves injuries.* Baltimore: Williams and Wilkins Co., 1968. p.5, 26, 58,200-202.

Sunderland S. *Nerve injuries and their repair: a critical appraisal.* NY:Churchill Livingstone, 1991.

Sunderland S. *Nervios perifericos y sus lesiones.* 2a ed. Barcelona: Salvat, 1985.

Sunderland S. The intraneural topography of the radial, median and ulnar nerves. *Brain*. 1945; 68:243.

Sundine MJ, Quan EE, Saglam O, Dhawan V, Quesada PM, Ogden L, Harralson TG, Gossman MD, Maldonado CJ, Barker JH. The use of end-to-side nerve grafts to reinervate the paralyzed orbicularis oculi muscle. *Plast Reconstr Surg*. 2003; 111(7):2255-64.

Tagami Y, Kurimoto T, Miyoshi T, Morimoto T, Sawai H, Mimura O. Axonal Regeneration Induced by Repetitive Electrical Stimulation of Crushed Optic Nerve in Adult Rats. *Jpn J Ophthalmol*. 2009; 53:257-66.

Takhtfooladi MA, Jahanbakhsh F, Takhtfooladi HA, Yousefi K, Allahverdi A. Effect of low-level laser therapy (685 nm, 3 J/cm<sup>2</sup>) on functional recovery of the sciatic nerve in rats following crushing lesion. *Lasers Med Sci*. 2015 Apr;30(3):1047-52.

Takano Y, Haneda Y, Maeda T, Sakai Y, Matsuse H, Kawaguchi T, Tagawa Y, Shiba N. Increasing muscle strength and mass of thigh in elderly people with the hybrid-training method of electrical stimulation and volitional contraction. *Tohoku J Exp Med*. 2010; 221(1):77-85.

Tang JB. Vein conduits with interposition of nerve tissue for peripheral nerve defects. *J Reconstr Microsurg* 11:21-26, 1995.

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

Terzis JK, Sun DD, Thanos PK. Histological and basic science review; past, present, and future of nerve repairs. *J Reconstr Microsurg*. 1997; 13:215-25.

Tessitore A, Pflsticker LN, Paschoal JR. Aspectos neurofisiológicos da musculatura facial visando a reabilitação na paralisia facial. *Rev CEFAC*. 2008; 10(1):68-75.

Thomeé R, Restrom P, Karlsson J, Grimby G. Patellofemoral pain syndrome in young women. Part II – Muscle function in patients and healthy controls. *Scand J Med Sci Sports*. 1995; 5:245-51.

Valent F, Eleopra R, Manganotti P, Passadore P. A population-based study of injuries to the brachial plexus and to the peripheral nerves of the shoulder girdle and upper limb in the Italian region Friuli Venezia Giulia. *Neurosurg Rev*. 2018 Apr;41(2):519-523.

Van Dulken H, Thomeer TWM. Recent developments in peripheral nerve surgery. Management of open traumatic peripheral nerve lesions. *Arch Chir Neerl*. 1978; 30:91-9.

Vieira S, Hossne WS. Metodologia científica para a área de saúde. Rio de Janeiro: Campus, 2001. 192p.

Viterbo F. A new method for treatment of facial palsy: the cross-face nerve transplantation with end-to-side neurorrhaphy. *Rev Soc Bras Cir Plast Reconst Est.* 1993; 8:29-35.

Viterbo F. *Neurorrafia Látero-Terminal, estudo experimental no rato.* [Tese de Doutorado]. Botucatu: Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina, 1992.

Viterbo F, Teixeira E, Hoshino K, Padovani CR. End-to-side neurorrhaphy with and without perineurium. *Revista Paulista de Medicina.* 1998; 116:1808-14.

Viterbo F, Trindade JC, Hoshino K, Mazzoni Neto A. Latero-terminal neurorrhaphy without removal of the epineural sheath: experimental study in rats. *Rev Paul Med.* 1992; 110:267-75.

Viterbo F, Trindade JC, Hoshino K, Mazzoni Neto A. End-to-side neurorrhaphy with removal of the epineurial sheath: an experimental study in rats. *Plast Reconstr Surg.* 1994a; 94:1038-47.

Viterbo F, Trindade JC, Hoshino K, Mazzoni Neto A. Two end-to side neurorrhaphies and nerve graft with removal of the epineural sheath: experimental study in rats. *Br J Plast Surg.* 1994b; 47:75-80.

Viterbo F, Brock RS, Maciel F, Ayestaray B, Garbino JA, Rodrigues CP. End-to-side versus end-to-end neurorrhaphy at the peroneal nerve in rats. *Acta Cir Bras.* 2017;32(9):697-705.

Wang CZ, Chen YJ, Wang YH, Yeh ML, Huang MH, et al. Low-Level Laser Irradiation Improves Functional Recovery and Nerve Regeneration in Sciatic Nerve Crush Rat Injury Model. *PLoS ONE.* 2014; 9(8):1-11.

Ward AR, Shkuratova N. Russian Electrical Stimulation: the early experiments. *Phys Ther.* 2002; 82:1019-30.

Ward AR. Electrical stimulation using kilohertz-frequency alternating current. *Phys Ther.* 2009; 89:181-190.

Wilk KE, Reinold MM. Principles of patellofemoral rehabilitation. *Sports Med Arthrosc.* 2001; 9:325-36.

Willand MP, Nguyen MA, Borschel GH, Gordon T. Electrical Stimulation to Promote Peripheral Nerve Regeneration. *Neurorehabilitation and Neural Repair.* 2015; 1-7.

Williams HB. The value of continuous electrical muscle stimulation using a completely implantable system in the preservation of muscle function following motor nerve injury and repair: an experimental study. *Microsurgery.* 1996; 17(11):589-96.

Wong AYC, Scott JJA. Functional recovery following direct or graft repair of nerve gaps in the rat. *Exp Neurol.* 1991; 114:364-6.

Yamamoto Y, Sasaki S, Sekido M, Yokoyama T, Tsutsumida A, Furukawa H, Sawamura Y, Sugihara T. Alternative approach using the combined technique of nerve crossover and cross-nerve grafting for reanimation of facial palsy. *Microsurgery*. 2003; 23:251-6.


Yamamoto Y, Sasaki S, Sekido M, Yokoyama T, Tsutsumida A, Furukawa H, Sawamura Y, Sugihara T. Alternative approach using the combined technique of nerve crossover and cross-nerve grafting for reanimation of facial palsy. *Microsurgery*. 2003; 23:251-6.

Yoleri L, Songur E, Yoleri O, Vural T, Cagdas A. Reanimation of early facial paralysis with hypoglossal/facial end-to-side neuroorrhaphy: a new approach. *J Reconstr Microsurg*. 2000; 16(5):347-55.

Zhao Q, Dahlin LB, Kanje M, Lundborg G, Lu SB. Axonal projections and functional recovery following fascicular repair of the rat sciatic nerve with Y-tunneled silicone chambers. *Restor Neurol Neurosci*. 1992; 4(1):13-19.

Zhao J, Chen Z, Chen T. Nerve regeneration after termino-lateral neuroorrhaphy: experimental study in rats. *J Reconstr Microsurg*. 1997; 13:31-7.

## ANEXO 1

		UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA CAMPUS DE BOTUCATU FACULDADE DE MEDICINA																	
				Comissão de Ética no Uso de Animais Criada através da Portaria DFM nº 611 de 13/12/2012															
<h1>CERTIFICADO Nº 1154/2015-CEUA</h1>																			
<p>Projeto de Pesquisa Projeto: <b>(Protocolo CEUA 1154-2015) Efeito da estimulação elétrica e do laser terapêutico na recuperação muscular e nervosa após neurotrafia latero-terminal do nervo fibular em ratos, a ser conduzido por Fábio Oliveira Maciel, orientado pelo Prof. Dr. Fausto Viterbo Oliveira Neto, com a colaboração de Luiz Carlos Edevalter Bardella, relatado pela Profa. Dra. Bertha Furlan Polegato, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA.</b></p>																			
<table border="1"> <tr> <td>Vigência do projeto</td> <td>28/02/2019</td> </tr> <tr> <td>Espécie/Linhagem</td> <td>Ratos Norvegicus</td> </tr> <tr> <td>Nº de animais</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>Peso/Idade</td> <td>200 gramas/6 semanas</td> </tr> <tr> <td>Sexo</td> <td>Macho</td> </tr> <tr> <td>Origem</td> <td>Biotério Central da FMB-UNESP</td> </tr> </table>		Vigência do projeto	28/02/2019	Espécie/Linhagem	Ratos Norvegicus	Nº de animais	100	Peso/Idade	200 gramas/6 semanas	Sexo	Macho	Origem	Biotério Central da FMB-UNESP						
Vigência do projeto	28/02/2019																		
Espécie/Linhagem	Ratos Norvegicus																		
Nº de animais	100																		
Peso/Idade	200 gramas/6 semanas																		
Sexo	Macho																		
Origem	Biotério Central da FMB-UNESP																		
<p><b>Projeto de Pesquisa aprovado em reunião da CEUA em 24/09/2015</b></p>																			
<p>   <b>Profa. Dra. Noeme Sousa Rocha</b>            Vice-presidente da CEUA         </p>		<p>   <b>Kleber Messias de Camargo</b>            Secretário da CEUA         </p>																	
<p>Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu – S. P. CEP- 18.618-970 Fone: (14) 3880-1608/3880-1609 e-mail secretaria: kleber@fmb.unesp.br</p>																			

# Effects of electrical stimulation and laser therapy in muscle and nerve recovery after side-to-end neurorrhaphy of the peroneal nerve in rats

<sup>1</sup>Fabio Maciel, <sup>2</sup>Fausto Viterbo

<sup>1</sup>Assistant Professor, School of Physical Education and Physiotherapy - UFAM

<sup>2</sup>Adjunct Professor of Botucatu Medical School - UNESP

Thesis presented to the Faculty of Medicine, Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho", Botucatu, to obtain the title of Doctor of General Surgery.

Advisor: Prof. Dr. Fausto Viterbo Oliveira Neto

Botucatu  
2019

## SUMMARY

**INTRODUCTION:** It is questionable whether the Electrical Stimulation (ES) and Low Power Laser (LPL) therapy have ability to improve muscle and nerve recovery post side-to-end neurorrhaphy (SEN). To analyze the efficiency of ES and LPL therapy in maintaining the cranial tibial muscle (CTM) and regeneration of the common peroneal nerve post SEN.

**METHODS:** This study was approved by the certificate No. 1154/2015 CEUA FMB - UNESP. 100 males Wistar rats were used with average weight of 384.33 g and approximately 9 weeks old. The animals were divided into six experimental groups. Control group, denervated group, group with side-to-end neurorrhaphy (SEN), group with SEN and Electrical Stimulation (ES) group with SEN and low power laser therapy (LPL) and group with SEN and combination of ES and LPL (LPL+ES). The treatment was performed for 180 days. Functional and histological tests were performed. Statistical Analysis: Comparing the groups was used predominantly Kruskal Wallis and Dunn test, ANOVA, followed by Tukey's test and Friedman's test to assess functional outcome over time. Throughout the analysis, used was  $p < 0.05$  significance level.

**RESULTS:** The Peroneal Functional Index (PFI) showed no statistically significant difference between the groups ES; LPL+ES; LPL and the control group. The muscle morphometry showed superiority of groups ES; LPL+ES and LPL in relation to SEN group. The nerve morphometry showed greater statistical equivalence between the SEM; ES; LPL+ES; and LPL groups than the muscular part. The G ratio ES group showed superior to the other groups and only the ES and control groups within the normal range for this measurement.

**CONCLUSION:** Based on our experimental model, we concluded that both the electrical stimulation, and the low power laser as the combination of the two techniques were efficient in nerve regeneration, muscle maintenance and functional recovery of neuromuscular system after side-to-end neurorrhaphy.

**Key words:** Electrical stimulation, laser, microsurgery, Peroneal Nerve, Nerve Regeneration

## INTRODUCTION

Peripheral nerves, as well as other tissues in the body are subject to inflammatory, traumatic, metabolic, toxic, genetic and neoplastic diseases (Girolami et al., 2000). These conditions lead to different degrees and types of lesions (Politis et al, 1982;. Lundborg et al., 1986).

The lesions in peripheral nerves usually cause changes in structure, metabolism and physiological activity of the neuronal cell body, and can stop the innervation of the distal organ. In case of motor neuron, the compromised organ is the muscle (Chem 1978; From -Silva, 1995; Valentine et al, 2018).

Nerve injuries are well known for reducing the functional capacity and decreased quality of life of patients, these lesions induce high socioeconomic costs due to prolonged rehabilitation and absenteeism of young trauma victims (Huckhagel, 2018).

In this context, microsurgery has shown fundamental role in the prognosis of patients suffering from this evil. Thus, studies for the improvement of microsurgical techniques for nerve repair are vital for the scientific community in order to reduce the number of disabled patients (Sato, 2005; Huckhagel, 2018).

In the repair of peripheral nerve injuries when they have the proximal and distal stumps, end-to-end neurorrhaphy (EEN) is often used to make the union of the stumps of the damaged nerve by a suture (Rovak et al., 2001). However, one of EEN's limitations is the need to be no loss of nerve tissue (Seddon, 1963; Lundborg, 1987).

In the most extreme situations where there is loss of the proximal stump. In these cases, sacrifices a neighbor nerve, less important, and the same is cut and its proximal stump is sutured to the distal stump of the receptor nerve to be reconstructed. It can be used nerve graft between the two stumps if necessary. However, this procedure determines the donor nerve motor deficit (Tindal & Harris, 1991; Lohman et al., 1997). Furthermore, the quality of functional recovery is lower when the distance between the nerve stumps are greater than six centimeters (Ogún et al., 2003).

In 1903, Ballance et al. They proposed a new technique as an option to avoid the sacrifice of donor nerve. It was the side-to-end neurorrhaphy (SEN), wherein the nerve distal stump was reconstructed to be sutured to the side face of the donor nerve. however, the movements of the muscles reinnervated were accompanied by movements of muscles innervated by the donor nerve. Other authors (Ballance, 1923; Stookey, 1923; Gatta, 1938) also used this technique, but they all use a partial incision in the donor nerve. This donor nerve injury determined end-to-end terminal type of endoneural tubes and nerve damage in the donor and structures innervated by it. This led Babcock (1927) to suggest the abandonment of this technique.

In 1992, Viterbo et al. proposed the side-to-end neurorrhaphy without injury to the donor nerve and, even, without removing the epineurium (Viterbo et al., 1994a and b). In an experimental study in rats, Viterbo et al. (1992) performed a section of the peroneal nerve, which innervates the cranial tibial muscle (CTM), and the distal stump was sutured to the side of the intact tibial nerve without removal of the epineurium. Obtained, for the first time, muscle reinnervation without prejudice to the donor nerve. This technique brought great contribution because, thereafter, any nerve can be used as donor nerve without harming themselves or for the structures innervated by it. Several studies have confirmed the findings of Viterbo, both experimentally and clinically (Lundborg et al., 1994; Viterbo et al., 1994; Al-Qattan & Al-Thunyan, 1998; Liu et al., 1999; Mueller, 2001; Rovak et al., 2001; Jaber et al. 2003; Ogun et al. 2003; Pardini et al., 2005; Haninec et al., 2007, Maciel et al, 2013;. Viterbo et al, 2017).

The peripheral nerve side-to-end neurorrhaphy has been suggested in clinical situations where the proximal segment of the injured nerve is not available (Lundborg et al., 1994, 2000). However, with all the technical advance achieved by microsurgery, although not get full motor recovery regardless of how good has been performed the nerve repair (Sundeland, 1985), for the complete recovery of motor function depends on regeneration of axons and, during the regeneration of axons the atrophy process occurs. (Romão et al., 2007, Maciel et al, 2013.).

To try to improve functional recovery post SEN, studies were conducted to evaluate the LASER as regenerative therapy in cases of peripheral nerve lesions (Camargo et al, 2006; Hall et al, 2011; Wang CZ et al, 2014; Andraus et al, 2017; Andreo et al, 2017; Rochkind, 2017).

LPL therapy is a technique capable of accelerating the repair process of biological tissue trauma (Abreu et al, 2011; Chen YJ et al, 2014). Mechanisms involving the biostimulation process are at the molecular level (Abreu et al, 2011; CZ Wang et al, 2014). In this case, the light penetrates the interior of the fabric where it is absorbed by certain chromophors, resulting in increased cellular metabolism by increasing the ATP synthesis by mitochondrial (Abreu et al, 2011). Research has shown that the application of LPL in certain skin conditions has the ability to stimulate the proliferation of fibroblasts, and reduce local edema, promoting neovascularization and neural regeneration (Abreu et al, 2011; Hall et al, 2011; Chen YJ et al, 2014; Takhtfooladi et al 2015).

The beneficial effects of therapy by low power laser on the skin tissue have been known for a long time. In fact, laser radiation, especially laser derivative of Helium and Neon gas (Ne), has been used in various medical disciplines to promote epithelial regeneration (Nissan et al, 1986; Reddy et al, 2001), bone regeneration (Saito & Shimizu, 1997) and used experimentally on neurons in vitro and in cell culture visual rats (Rochkind et al., 1987).

For Karu (1987), among the physiological effects of LPL therapy long term is increased consequent mitosis and cell division. Irradiation of human fibroblasts with a HeNe laser significantly increased the number of cells compared with their non irradiated controls. One possible mechanism is that the irradiation causes a replacement in cellular metabolism, the light having the role of trigger controller. Changes in the level of cAMP (cyclic adenosine monophosphate) suggest that the "quanta" of light can act as a proliferative stimulus because cAMP is scheduled to stimulate transcription events in a wide variety of cells and possibly these events could generate increased mitosis.

Akgul et al. in 2014, they found effective in treatment of peripheral nerve injuries using the LPL 650 nm wavelength in an animal model. The morphological analysis of this study indicated that LPL has the ability to reduce the migration of mononuclear cells to the damaged nerve, leading to a decrease in the areas of edema and faster regeneration.

In 2016, Mandelbaum-Livnat et al. found in animal models with the use of laser in the preservation and restoration of muscle connected to an injured peripheral nerve, the LPL increased the biochemical activity and improved muscle morphological recovery and for this reason indicated use with therapeutic applications to the muscle especially in resulting atrophy progression of peripheral nerve injury.

Andraus et al. 2017, they conducted a study with mice and injury sciatic nerve crush treated with LPL 830 nm at energy densities (35, 70, 140 and 280 J / cm<sup>2</sup>) for 21 days. The functional results with the Sciatic Functional Index and strength test showed that the treated group were higher than injured untreated group demonstrating recovery of neuromuscular function.

Andreo et al., 2017, in a systematic review, and show the positive effects of neuromuscular repair process using both red LPL as infrared, with functional and morphological improvement, still they call attention to the importance of the parameters to be applied to achieve regeneration in peripheral nerve injuries. Most studies with positive results using laser with power more than 50 mW and total energy exceeding 15 J applied at multiple points.

Another agent that could present a positive result in this treatment would be the electrical stimulation with regenerative purposes, which although controversial, (Williams, 1996; Nemeth, 1982; Kanaya & Tajima, 1992; Iñigo, 1998; Kotwal and Schmidt, 2001; Souza et al .., 2001; Carvalho et al, 2002) has become the object of study in muscular functional recovery, as it can be applied as muscle atrophy prevention method that would slow and, in some cases, prevent the loss of muscle tissue resulting from a period of inactivity or denervation (Maciel et al., 2013).

Investigations on the use of electrical stimulation regenerative purpose are extensive, however the procedures used are still controversial. So there is no consensus on the intensity,

frequency, duration and assessment methods used. Several authors, including Tagami et al. (2009) and Maciel et al. (2013) who observed axonal regeneration during the application of electrical stimulation in rats they reported it to be beneficial and without functional impairment (Nemeth, 1982; Kanaya & Tajima, 1992; Williams, 1996; Iñigo, 1998), unlike other, claiming to be harmful, causing contractions and spasms (Kotwal and Schmidt., 2001; Souza et al, 2001; Carvalho et al., 2002).

Currently, electrical stimulation to increase the performance of skeletal muscle is already accepted and constantly demonstrated in experimental and clinical trials (RuPFIIn & Kiningham, 1993; Snyder-Mackler et al., 1994; Gordon, 2016).

Several studies available investigating the role of electrical stimulation in order to induce muscle strength in humans (McIntyre and Robertson, 1992; Fonseca et al, 2001; Wilk & Reinold, 2001; Stiene et al., 1996; Cabral & Monteiro-Peter, 2003; Maciel 2010).

The study of nerve regeneration and recovery of a muscle after neurorraphy can be accomplished by observing the histological changes, by measuring the electrical conduction velocity, the electromyographic analysis or the isometric response of the muscle subjected to tetanic contraction, or in special situations, such as in the case of the sciatic nerve in rats, in which the animal is subjected to analysis of gait (De Medinacelli et al, 1982;. Bain et al., 1989; Sato, 2005).

By observing these attributes, several authors have confirmed the occurrence of both budding side motor and sensory after the side-to-end neurorrhaphy with subsequent physiological recovery of previously denervated muscle and significant functional recovery (McCallister et al., 1999; Lutz et al. 2000a; Goheen-Robillard et al., 2002; Hayashi et al., 2004; Beris et al., 2007, Brenner et al., 2007, Matsuda et al., 2008; Beris & Lykissas, 2009; Maciel et al, 2013.; Viterbo et al., 2017).

ES is capable of increasing the oxidative enzyme activity in muscle fibers, enhance muscle regeneration and prevent skeletal muscular atrophy (Pette & Staron,1997). In addition to the metabolic effects, ES is related to immobilization of reducing damage while minimizing the reduction in cross-sectional area, interstitial fibrosis and blood supply deficiency (Qin et al.,1997). ES also promotes increased effectiveness of muscle fiber contraction, thereby allowing the dynamic uptake via GLUT-4 glucose metabolism and activity of cellular metabolic pathways (Guirro et al., 2004). The glucose transporter expressed, predominantly, in skeletal muscle is GLUT-4 (James et al., 1989) and its expression, as well as being dependent on the action of insulin, is also related to the contractility of muscle, there, like this, clear association between the glucose transport in muscle fibers and the degree of muscle contraction baseline (Gaster et al., 2000).

For these reasons, part of the research has been to evaluate the functionality of a reinervado muscle by side-to-end neurorraphy and also concerned to propose SEN post

interventions to improve functional recovery in reinervada region (Tang, 1995; FANSA et al. 1999; Durigan et al, 2006). One such possibility is the neuromuscular electrical stimulation that for years, has been studied in electrophysiology (Dow et al., 2004; Durigan et al, 2006; Romão et al., 2007, Russo et al, 2008; Carvalho et al, 2009; Polonius et al, 2010; Maciel et al, 2013; CZ Wang et al, 2014; Elzing et al, 2015; Willand et al, 2015; Gordon, 2016).

Still do not know all the possibilities for recovery of a reinervada muscles for side-to-end neurorrhaphy, however, some studies confirm the passage of electrical stimulation through the same and activity log in reinervado muscle (Giovanoli et al., 2000; Isaacs et al., 2005; Maciel et al, 2013;. Viterbo et al, 2017.).

Within this vast universe of therapeutic possibilities, the question is whether the ES and LPL have ability to improve muscle and nerve recovery after SEN. We believe that the results of this study also apply in EEN, however as the SEN is newer and the fact of not harming the donor nerve to increase their potential and therefore certainly was increasingly used, we decided to study the SEN. The expected answer this question justified this research.

## **OBJECTIVE**

To analyze the efficiency of ES and LPL as a maintenance therapy for cranial tibial muscle regeneration and common peroneal nerve in rats after SEN.

## **METHOD**

This work was performed in the Experimental Surgery Laboratory, Department of Surgery and Orthopedics, Faculty of Medicine of Botucatu, UNESP.

### **Animals**

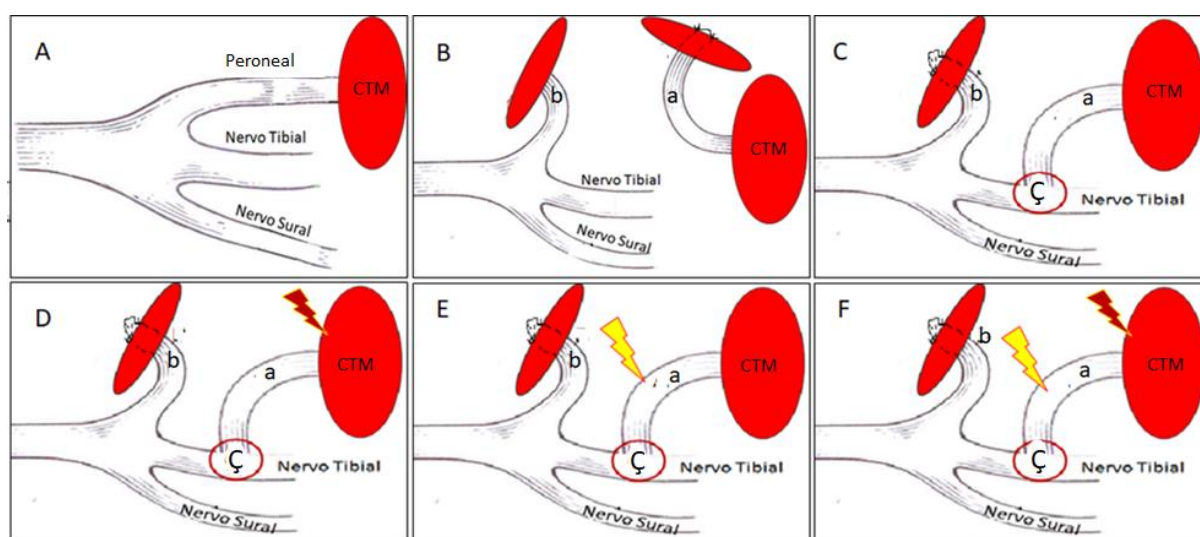
The entire procedure was performed according to the Ethical Principles in Animal Experimentation adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA), and underwent examination by the Commission of Ethics in Animal Experimentation of the School of UNESP Medicine - Botucatu, being approved under Protocol. SIPE-70/2015 - CEUA-1154.

100 rats (*Rattus norvegicus*) of Wistar strain, male, average mass 385.3 ( $\pm$  48.04) g. The animals were divided into six experimental groups. The animals were sacrificed after 180 days of treatment.

### **Experimental groups**

In the control group (control) with 10 animals, the peroneal nerve was dissected, however, this section or has not undergone neurorrhaphy (Fig. 1A). In denervated group (denervated) with 10 animals, the peroneal nerve was transected stumps and their been inverted 180 degrees. The distal end is fixed to the underlying musculature. The proximal

stump was pierced by an incision in the gluteus muscle and sutured to the subcutaneous plane to prevent contamination motor (Fig. 1B). In neurorrhaphy Látero-terminal Group (SEN) 20 animals, the peroneal nerve was sectioned and its proximal stump bent medially 100 °, and transfixated to the adjacent muscle was sutured to the musculature of this face surface, preventing the spontaneous regeneration. The distal stump of the peroneal nerve was bent, approximately 80 °, and sutured to the tibial nerve laterally (Fig. 1C). In SEN and ES group, 20 animals, the procedure was carried out the same as SEN group, but, after surgery, the animals received the electrical stimulation as a treatment for the cranial tibial muscle (Fig. 1D). In group LPL with 20 animals, the procedure performed was the same as in SEN group, but, after surgery, animals received treatment by laser (Fig. 1E). In group LPL+ES, 20 animals, the procedure was carried out the same as SEN group, but, after surgery, animals received treatment by laser and electrical stimulation (Fig. 1F).



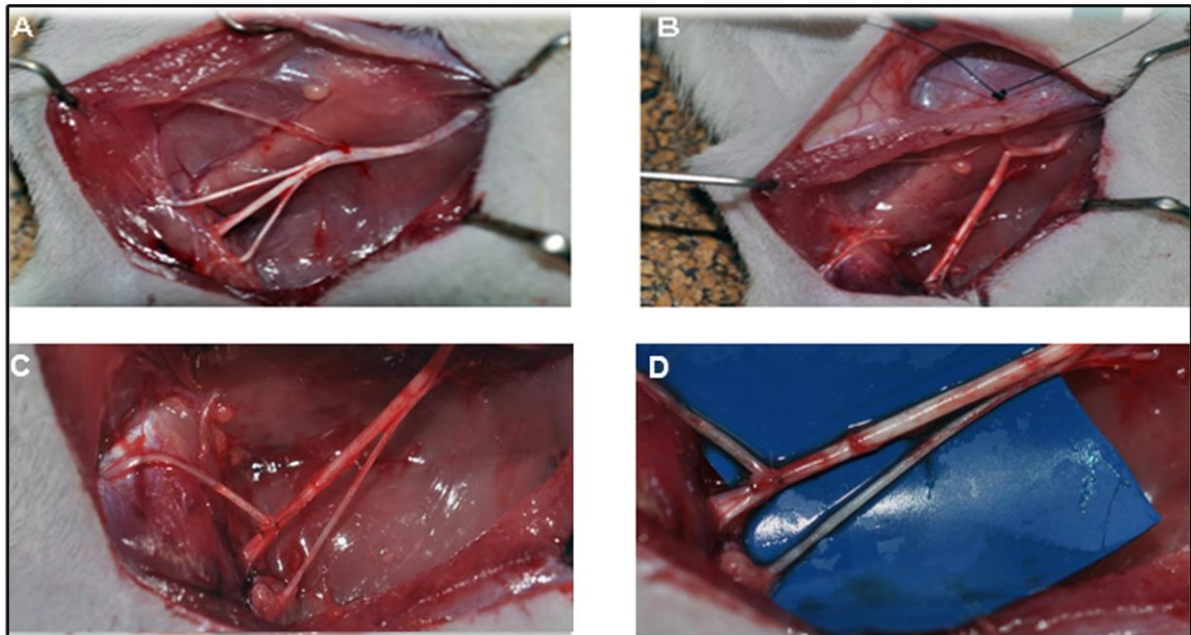
**Figure 1** -Indicates surgery groups. 1A - Control Group. 1B - denervated group. 1C - SEN Group. 1D - ES Group. 1E - LPL Group. 1F - LPL+ES Group. to: distal stump of the peroneal nerve. b proximal stump of the peroneal nerve. Ç: end-to-side neurorrhaphy. CTM: Tibial Muscle Cranial. Ray Red: Indicates treatment with ES. Ray Yellow: Indicates treatment with LASER.

## Surgery

Preceding each surgical procedure, animals were anesthetized with ketamine (70 mg / kg) and xylazine (30 mg / kg) intramuscularly and shaved. The dorsolateral surface of one of the hind limbs, right or left, chosen by lot and marked properly, suffered incision 2 to 3 cm along the major axis member, committing skin and subcutaneous tissue with subsequent dilatation of the muscles. The sciatic nerve, common peroneal, tibial and sural were dissected. After that, the procedure was performed according to the experimental group.

The surgeries were performed with the aid of a surgical microscope DF Vasconcelos 10 and 16 times increases. The neurorrhaphies were performed with 10-0 monofilament nylon

cord with circular cylindrical needle withdrawal without epineurium window and with two simple sutures (Fig. 2).



**Figure 2** -Indicates surgery in the left hind limb of the animal. A: Exposure sciatic nerve and its branches, peroneal nerve, tibial nerve and sural nerve. B: proximal peroneal nerve stump transfixing the adjacent musculature and being sutured to the surface of that face. C: end-to-side neurorrhaphy of peroneal nerve sutured to the side of the tibial nerve. D: Another view of the SEN.

After the procedure, the incision was sutured in layers with simple stitches using 4-0 nylon monofilament musculature and skin. The animals were kept in appropriate boxes, each containing three animals in a controlled temperature ( $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) light-dark cycle of 12 hours with food and water ad libitum until the time sacrifice.

### **Electrical stimulation**

The electrical stimulation was started five days after surgery. Animals from ES and LPL+ES groups underwent three weekly sessions during the 180 days. Receiving electrical stimulation applications to the cranial tibial muscle with alternating current synchronized with frequency of 1kHz modulation at 10 Hz, with a duration of 2 ms, contraction time of 10 seconds per 20 seconds of relaxation during 10 minutes. The initial current was increased to 8 mA and 12 mA after five minutes to prevent the accommodation effect of muscle tissue. Was used electric Neurodyn 10 Company Channels Ibramed (Apparatus acquired Assisted FAPESP 2010 / 09866-2).

The animals were stimulated awake and without anesthesia. For this we used a metal capsule with rear opening for the tail and two lateral openings for fixing the hindlimbs. After this immobilization, the electrodes of one square centimeter area were fixed on the belly of the

CTM with masking tape. 10 capsules were used, at the same time, to optimize the stimulation time (Fig. 3).



**Figure 3** - Animals receiving electrical stimulation.

### **Laser therapy**

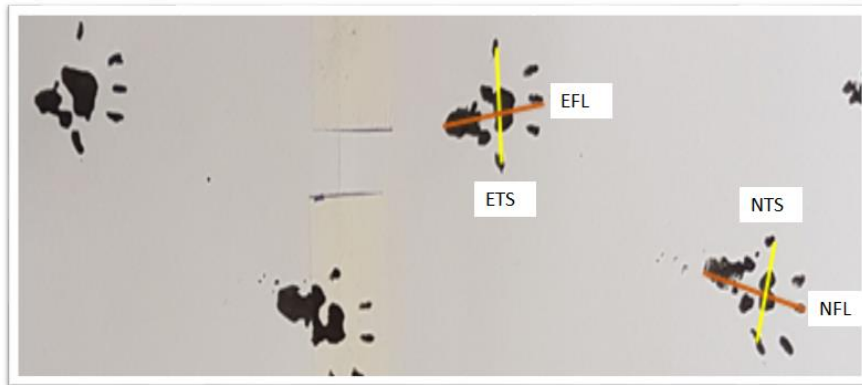
It used the apparatus LASER infrared (IR) gallium arsenide (GaAs) called Endophoton company (Amparo - SP) with a wavelength of 904 nm, output 50 mW, 0.067 cm<sup>2</sup> beam area, approximate penetration 1.5 cm, the continuously. The form of application is by transcutaneous punctual method and contact (to reduce reflection) with energy 4J (80 s per point) in each point, with the total of 3 points along the surgical scar with shaved rats. Laser therapy was started on the fifth day after surgery, with applications three times a week for 180 days.

### **Walking track analyses test**

Every 30 days the animals were subjected to the evaluation test of the march. Previously trained animals walked into a channel 9 cm wide by 78 cm long with its floor covered with a white strip of paper of appropriate size, after its rear feet painted with black India ink to mark the footprint on paper. The footprints left on the paper sheet were analyzed using measures described below:

- NFL (length of the normal foot footprint);
- EFL (length of the experimental foot footprint);
- NTS (total opening of the normal foot);
- ETS (full opening of the experimental foot).

From these measurements were performed calculations of the peroneal nerve functional index (MFI) according Bain et al. (1989) (Fig. 4).

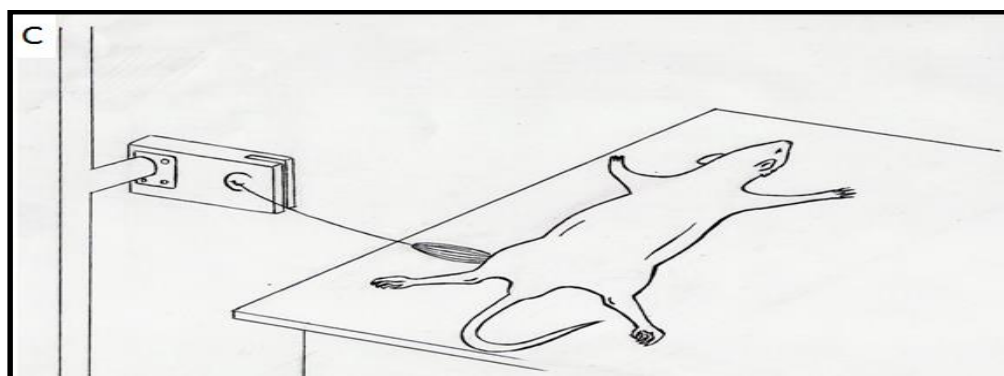


**Figure 4** - Measurements performed to calculate the peroneal nerve functional index (PFI).

### **ERM contraction force**

After the completion of electrophysiological test, The distal tendon of the cranial tibial muscles was cut and coupled to a Grass FT03 Technologies the force transducer, using suture with 4-0 nylon. The muscle was retracted by nylon thread increasing its length until it determine draw tension load of 0.18 N. This preload value was determined during device calibration and testing was adjusted between.

The electrical stimulator electrodes Neurodyn 10 were placed directly on the above CTM. The muscle contraction assay consisted of three sequential applications of 1s current with the same current specifications used for the treatment of animals in ES group. A computer recorded the force peaks. Muscle tension was adjusted between measurements. The tetanic contraction test was carried out with 100 mA with a frequency of 100 Hz (Fig. 5).



**Figure 5** - Muscle contraction strength test. CTM connection diagram with the force transducer (Aid FAPESP 2010 / 09866-2).

### **Collection of histological pieces and sacrifice**

After completion of muscle strength test The animals received a lethal dose of sodium pentobarbital intraperitoneally administered, and carried to the collecting nerve segments: distal cross section of the peroneal nerve stump (N1) as well as the collection of the cranial tibial muscle right and left.

The cranial tibial muscles were removed, measured had their masses and were kept immersed in liquid nitrogen (-196 ° C) until the time of histologic processing. Histological sections were stained with hematoxylin technique - eosin (HE).

The nerve segments were collected and fixed in Karnovisk solution and refrigerated at 4 ° C until the time of histologic processing. N1 segments had staining performed manually, blade by blade, with 1% toluidine blue.

All images were captured by an Image Scanner Panoramic Viewer and saved on a computer. The scanned images were saved and analyzed by area measurements, minimum diameter and circumference of muscle fibers and area measurements, minimum diameter, number of fibers and axons beyond the thickness and area of the myelin sheath to segment N1. The measurement of the myelin sheath area was obtained by subtracting the axonal area of the nerve fiber area and the thickness of the myelin sheath was obtained by subtracting the minimum diameter of axon minimum diameter of the fiber and dividing by two . total fiber count was performed on N1 segments.

Was also measured in the following N1, the ratio G represents the ratio of the diameter of axon and nerve fiber diameter. The G ratio is related to the conduction velocity of the nerve impulse. According Anselin et al. (1997), the myelinated axons are present G ratio between 0.6 and 0.7. The values below 0.6 indicate thicker myelin sheath, whereas values above 0.7 indicate thin myelin sheath.

Measurements were made of semi-automatic mode, using software Sigma Pro Image Analysis, version 5, the Jandel Scientific Corporation. The results obtained minimum area and axonal diameter were arranged in a table and then calculated the average of the measurements obtained for each animal. From these averages, the statistical analysis for comparison among groups was performed.

### **Statistical analysis**

When comparing the groups which passed normality tests, we used the variance analysis (ANOVA) followed by Tukey's test when significant difference detected. When the distribution data is presented outside the normal range, analysis of variance was used in ranks of Kruskal-Wallis followed by Dunn's method when detected difference. For the PFI used the Friedman test to measure the evolution of groups over time. In all analyzes, we used  $p < 0.05$  significance level.

## RESULTS

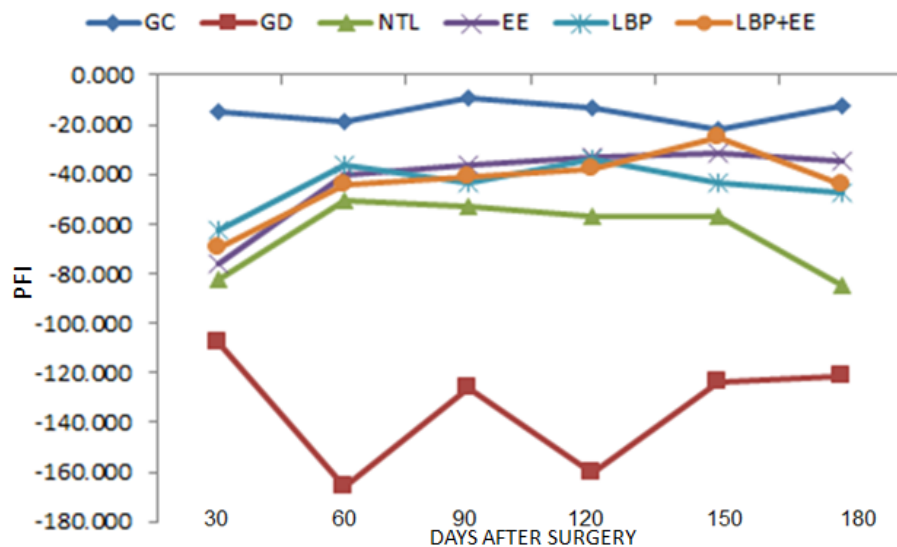
Table 1 represent the maximum strength of CTM between the experimental groups and the IFF for 30 and 180 days.

**Table 1.** Mean and standard deviation of the ERM contraction force (E). Median, 1 ° and 3 ° IFF interquartile ranges from 30 and 180 days.

Group	* Force contraction	#PFI 30 days	#PFI 180 days
Control	1.40 (± 0.182) at	-14.89 (-33.19 / -8.40) the	-12.49 (-24.60 / -7.93) the
denervated	0.43 (± 0.107) b	-108.13 (-125.22 / -73.07) b	-121.16 (-140.02 / -103.62) c
SEN	1.29 (± 0.213) at	-82.25 (-112.18 / -46.66) b	-84.60 (-111.45 / -52.19) bc
AND IS	1.32 (± 0.258) at	-75.84 (-98.65 / -52.82) b	-34.61 (-65.77 / -31.09) ab
LPL	1.23 (± 0.209) at	-62.63 (-94.27 / -52.33) b	-47.21 (-77.98 / -38.31) ab
LPL+ES	1.25 (± 0.137) at	-69.81 (-99.67 / -42.27) b	-44.56 (-84.60 / -18.73) ab

\* ANOVA followed by Tukey test (P <0.001)  
#Kruskal - Wallis test followed by Dunn's method.

Figure 6 comparatively shows the evolution of all groups along its functional performance in periods of 30, 60, 90, 120, 150 and 180 days.



**Figure 6 - Evolution of PFI between 30 and 180 days after surgery.**  
**Friedman Repeated Measures:**Control (P = 0.301); Denervated (P = 0.002); SEN (P = 0.085); ES (P = 0.007); LPL (P = 0.001); LPL+ES (P = 0.001).

Table 2 shows the comparison of the area and minimum diameter of muscle fiber CTME.

**Table 2.** Median, 1 ° and 3 ° interquartile ranges of the area and minimum diameter of the fibers CTME.

<b>Group</b>	<b>CTME fiber Area (<math>\mu\text{m}^2</math>)</b>	<b>Diam. Min. CTME fiber (<math>\mu\text{M}</math>)</b>
<b>Control</b>	3656.1 (2540.4 / 5482.8) to	60.75 (50.11 / 75.24) at
<b>denervated</b>	840.2 (521.6 / 1541.5) d	29.053 (21.83 / 3784) and
<b>SEN</b>	3008.5 (2276.8 / 3703.8) b	41.92 (33.53 / 48.51) d
<b>AND IS</b>	3407.7 (2668.6 / 4524.5) to	59.3 (49.4 / 68.85) ab
<b>LPL</b>	3673.4 (2627.5 / 4663.4) to	57.35 (48.32 / 68.52) b
<b>LPL+ES</b>	2509.3 (2132.6 / 3010.9) c	50.14 (44.53 / 56.65) c

\* Kruskal - Wallis test followed by Dunn's method (P = <0.001)

Table 3 represent the minimum diameter area of the nerve fibers and número N1 segment of fibers in each group.

**Table 3.** Median, 1 ° and 3 ° interquartile ranges of the area and minimum diameter of the nerve fiber. Mean and standard deviation of the number of nerve fibers.

<b>Group</b>	<b>* Fiber Area (<math>\mu\text{m}^2</math>)</b>	<b>* Min. Fibers Dia. (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	<b>#Nº of nerve fibers</b>
<b>Control</b>	70.42 (53.43 / 95.74) at	11.81 (9.84 / 13.68) to	± 1239.7 (357.2) to
<b>SEN</b>	52.96 (36.04 / 73.12) b	6.92 (5.78 / 8.25) C	± 570.7 (332.6) b
<b>AND IS</b>	31.26 (21.58 / 40.84) c	8.48 (6.86 / 9.86) b	± 895.7 (165.6) ab
<b>LPL</b>	24.72 (17.96 / 35.19) d	4.47 (3.75 / 5.32) d	± 1 263 (630.9) to
<b>LPL+ES</b>	27.97 (17.72 / 39.72) cd	4.45 (3.55 / 5.41) d	± 1353.8 (305.6) to

\* Kruskal - Wallis test followed by Dunn's method (P = <0.001)

#ANOVA followed by Tukey test (P <0.001)

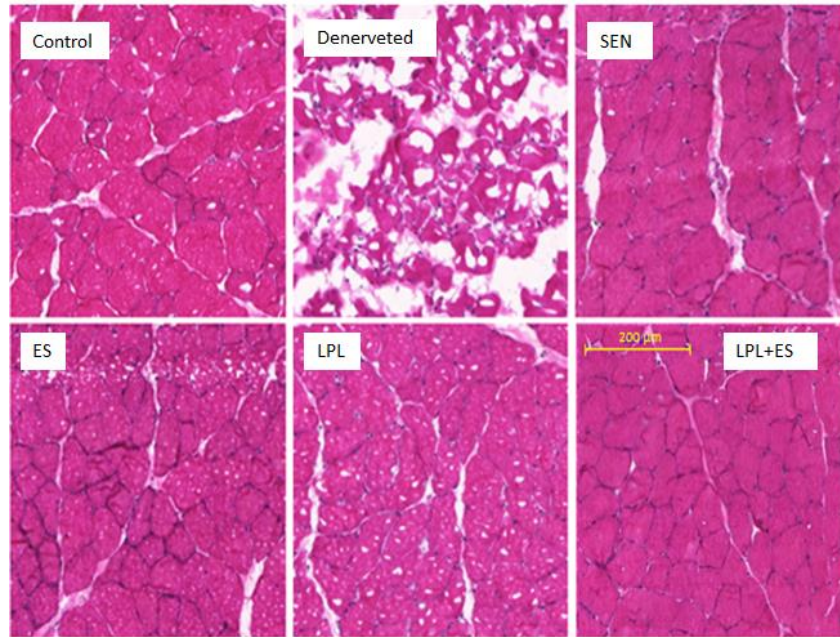
Table 4 represents the area, thickness of myelin sheath of nerve fibers in the segment N1 and G ratio in each group.

**Table 4.** Median, 1 ° and 3 ° interquartile ranges myelin sheath area.

<b>Group</b>	<b>Myelin sheath Area (<math>\mu\text{m}^2</math>)</b>	<b>Myelin sheath thickness (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	<b>G ratio</b>
<b>Control</b>	53.43 (39.27 / 71.19) at	2.42 (1.94 / 2.89) to	0.60 (0.53 / 0.65) b
<b>SEN</b>	37.56 (27.28 / 50.26) b	1.92 (1.64 / 2.18) b	0.44 (0.36 / 0.51) d
<b>AND IS</b>	21.29 (13.72 / 28.57) c	1.35 (0.91 / 1.93) C	0.67 (0.56 / 0.76) to
<b>LPL</b>	16.32 (11.94 / 22.76) d	1.04 (0.87 / 1.28) and	0.54 (0.46 / 0.59) C
<b>LPL+ES</b>	18.35 (8.72 / 29.93) cd	1.12 (0.66 / 1.69) d	0.45 (0.34 / 0.66) C

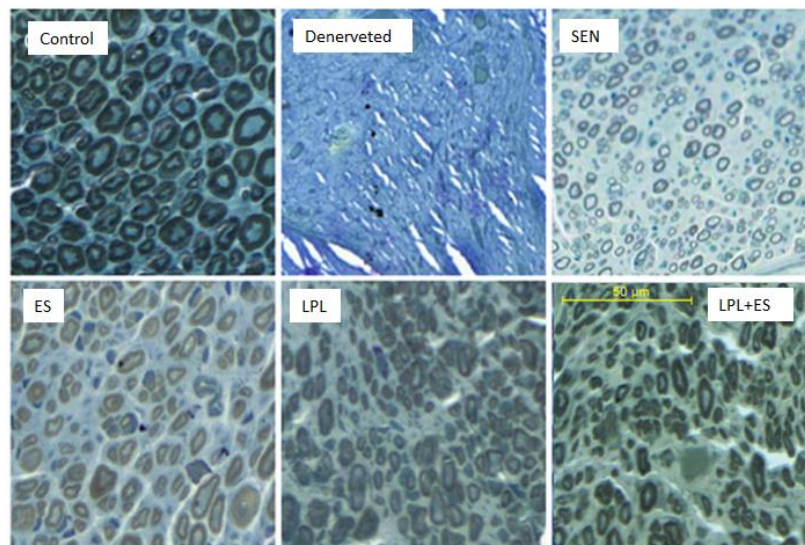
Kruskal - Wallis test followed by Dunn's method (P = <0.001)

The cranial tibial muscles of the control group had normal muscle characteristics with polygonal fiber cores, most of the fibers, position and some peripheral tissue. The cranial tibial muscles of SEN groups, ES, LPL+ES and LPL had characteristics similar to the control group, but some slides showed increased amount of connective tissue. The cranial tibial muscles of the denervated muscle fibers group showed smaller diameter and an increased amount of connective tissue disorganization and polymorphism, cores, most of the fibers, centering, showing muscular atrophy (Fig. 7).



**Figure 7** - Cross sections of the TCM in the different groups showing similar between the groups, ES, SEN; LPL and LPL+ES while the denervated group presents a breakdown of the fibers with centered nuclei and large amount of connective tissue.

As for the studied nerve segment, called N1, we observe the large control group amount of axons, the myelin sheath thick and well defined. In SEN groups, ES, LPL+ES and LPL observed fewer fibers with thinner myelin sheath and less area of the nerve fibers compared to the control group. We also observed a heterogeneous pattern and size of the nerve fibers in the four experimental groups. In denervated group observed a large amount of connective tissue without the presence of nerve fibers (Fig. 8).



**Figure 8** -Cross section of the distal stump of the peroneal nerve (N1) showing the group control nerve fibers and set with the presence of myelin, the SEN groups, ES, LPL and LPL+ES have similar appearances and denervated group without the presence of nerve fibers and a large amount of connective tissue.

## DISCUSSION

In this paper, we used rats (*Rattus norvegicus*) Wistar male because they are easy to obtain, handling and maintenance. These animals take up little space, facilitating long term studies (McCaffrey & Ellis, 1984), and represent the species most commonly used in the literature (Pereira et al., 1998).

Male mice are less susceptible to the action of gonadal hormones and adenohipophyseal hormones, such as estrogen and progesterone (Lincoln, 1980; Carandente et al., 1989). These hormones can exert neurotrophic effects and influence the budding myelinated sensory axons, and are easier to acquire, do serve as reproduction matrix.

The experimental model used was the "tibial-peroneal nerve and cranial tibial muscles" sciatic nerve introduced by Viterbo et al. (1992). According to the authors this model has two advantages: cranial tibial muscle is innervated exclusively by the peroneal nerve and its superficial location enables the clinical monitoring of reinnervation.

Some authors use an experimental model involving members of rats in the study of SEN. These models involve, mainly, the median, ulnar and musculocutaneous (Bertelli et al., 1996; Lutz et al, 2000a;. Lutz et al 2000b;. Papalia et al. 2003; Liao et al., 2009). The SEN has proven to be a good option for solving reinnervation without prejudice to act donated nerve and for this reason has been used to date for various experimental models (Jia et al., 2017).

There are also experimental models with other animals. Myckatyn et al. (2004) used transgenic mice. Jaberri et al. (2003) used rabbits, Following the same model of the tibial and peroneal used in rats. Sundine et al. (2003) evaluated the reinnervation of the orbicularis oculi muscle in dogs. Mennen (1998) used the SEN in primates, as Schmidhammer et al. (2007).

The animals were sacrificed after 180 days of treatment. We believe this is sufficient time to occur axonal sprouting and maturation, as well as the arrival of the motor axons plate, causing the reinnervation of muscle fibers and subsequent functional recovery of the muscle.

Gigo-behenate et al. (2010a) observed for 14 days functional recovery of rats after sciatic nerve crush injury and concluded that ES was detrimental to the recovery of muscle and nerve after injury, but we must ask whether 14 days of recovery would be sufficient for the muscle reinnervation occurs even in a model of nerve crush and not total nerve section. We believe that more time so we can reach more concrete conclusions about the muscle reinnervation required.

Russo et al. (2008) observed regulation of MMP-2 gene expression in denervated skeletal muscle and concluded that ES can be useful in developing new therapeutic strategies

for rehabilitation in patients with muscle denervation. But these authors observed 28 days after muscle denervation and did not undergo functional testing.

Buchaim et al. (2016) have the section of the buccal branch of the facial nerve in rats bilaterally. The right terminal end was reconstructed with neurorrhaphy and the left side was used fibrin glue. The study was divided in 4 groups with and without LPL neurorrhaphy groups and fibrin glue with or without LPL. After 10 weeks in total, the LPL observed that had a satisfactory result in the facial nerve regeneration and therefore a technique that helps in stimulation of axonal regeneration process.

Andraus et al. (2017) after the use of LPL nerve regeneration rat sciatic lasting 21 days of treatment, they concluded that the sciatic nerve injury resulting in muscle denervation, laser therapy have benefited by promoting the recovery of neuromuscular function, MMP activity 2 and increasing the maximum mechanical strength of the muscle rupture.

Many studies using electrical stimulation on the denervated muscle did not observe functional evolution of animals observation between 7 and 52 days, and the evaluations were only histological (Durigan et al, 2006;. Caierão et al, 2008;. Carvalho et al, 2009;. Polonius, 2010; Teodori et al, 2011;. Du et al, 2018.). These jobs, being short observation time, performed the electrical stimulation with anesthetized animals. As our stimulation time was long and, for this reason, the rats would undergo many ES sessions, we risked anesthetize the animals three times a week for 180 days. We chose to stimulate the animals awake. To this end, we have developed a stimulation method involving immobilization of the animals in a metal capsule (Figs. 10:11). This capsule holding hind limb of the animal in the inguinal region anatomical shape without causing injury or pain.

The same model was used for the immobilization of conducting laser therapy, for maintaining the capsule exposed to the surgical scar which is the site of application of LPL (Fig. 12). The example of electrotherapy studies with LPL have no observation time as large as our getting between 3 days as Alcantara et al. (2013) 12 weeks as Shen et al. (2013). For this reason the LPL session can be performed with the animal under anesthesia and it differs a lot compared to our experimental model.

The electrical stimulation used during this study did not cause pain or suffering, since the levels of stimulation were adjusted to remain within the threshold not reached the motor and pain threshold (Robinson & Snyder-Mackler, 2001; Low & Reed, 2001, Nelson et al., 2003). Also this model has already been tested by our group in Maciel et al. (2013).

The stimulation current was determined based in carefully predetermined parameters. As Ward (2009), the medium frequency current with short between 2 to 4 ms, are ideal for

producing muscle strengthening. The frequency was determined according to the predominant muscle fiber in the cranial tibial muscle.

The current intensity was determined as Maciel et al. (2013) to differentiate from 1 mA and 5 mA usually employed for jobs that stimulate or electrodes anesthetized rats deployed. These factors can cause changes in current conductivity in the animal's body. (Dow et al., 2004; Durigan et al, 2006;. Carvalho et al, 2009;. Polonius et al, 2010;. Teodori et al, 2011.).

However, when we look at the final mass of the groups we realized that groups received ES as treatment had on average lower muscle mass. This also occurred in our earlier study (Maciel et al., 2013), which could lead us to believe that even with all the established criteria and controlled, animals can still be suffering some form of stress with ES.

The dosage of LPL we used was based on studies by Andraus, Mazzer and Barbieri (2010) who also used the dose of 4 J (equivalent to 59.7 J / cm<sup>2</sup>) per point and obtained good results in nerve regeneration after injury sciatic nerve in rats. Rochkind (1992) have drawn attention to the dosage of laser therapy, as noticed that the effect of LPL in nervous tissue is dose dependent and when lower doses than 3.5 J / cm<sup>2</sup> was used did not occur changes in action potentials the nerves, therefore already in 1992 Rochkind, bucking a trend of the time, supported the use of higher doses for nerve regeneration.

The SEN was performed without removal of the epineurium, as the regenerated fibers after SEN have the ability to absorb and implement the endoneurium, epineurium and perineurium of the nerves thin, with a diameter less than 1.5 mm (Viterbo et al, 1992;. Viterbo et al. 1994, B; Lundborg et al., 1994; Zhao et al., 1997; Viterbo et al., 1998). In thicker nerves, it is recommended that the epiperineural window is performed. (Viterbo et al., 1998).

The number of 20 rats in each group seemed appropriate SEN when outlined in the work, because this amount differs for further study on the equivalent should be noted that though the variability of the WTA is quite high and requires a larger number of animals. The number of 10 rats in the control groups and denervated also seem right since these two groups are more homogeneous result (Viterbo et al, 1992;. Franco, 2010; Maciel et al, 2013.). In literature, this number varies widely, from 5 to 40 animals (McCallister et al., 1999; Caierão et al, 2008;. Goheen-Robillard et al., 2002; de Sa et al., 2004).

The walk test analyzes the gait of the animal by calculating the expression, as a percentage of loss of limb function treated in relation to the contralateral. The walking test was developed by De Medinaceli et al. (1982) through the Sciatic Functional Index (IFI) that evaluates the function related to the sciatic nerve, but was perfected by Bain et al. (1989) who developed specific methods for the tibial nerve (tibial Functional Index - LFS) and the peroneal nerve (functional peroneal index - MFI). As our experimental model specifically involves the

peroneal nerve, we use the IFF Bain et al. (1989). These functional walk tests are low cost and easy application, allowing monitoring the clinical course of rats. Furthermore, disclose muscle function and brain plasticity, in any desired end result of peripheral nerve reconstruction. Therefore these tests have been used by many authors (Carlton & Goldberg, 1986; Dellon & Mackinnon, 1989; Dellon & Dellon, 1991; Bervar, 2000; Monte-Raso et al., 2008; Andraus et al., 2010; Maciel et al, 2013.; Viterbo et al., 2016).

At 30 days, the rats of the control group differed from all the mice of the other groups, with the best functional indices. This result was expected, since 30 days has not been possible to realize the effects of proposed treatments. After 180 days, we notice the different changes between the experimental groups. Except SEN group, the remaining experimental groups were statistically equivalent to the control group at the end of the experiment, demonstrating the importance in functional terms, the proposed treatments after completion of peripheral nerve reconstruction.

It is also very important to realize when we see the figure 24 and the control groups showed no SEN evolution over time from the initial time to the end of treatment. This finding was expected for the control group to have started from a normal functional state. The denervated group although statistically show a difference over time, this difference was negative in relation to the starting point, i.e. the denervated animals group further worsened neuromuscular function. The ES groups, LPL and LPL+ES showed significant improvement from baseline in the treatment leading to understand that the post surgical treatment with the employed methods were important for functional improvement of animals. This observation confirms the findings of Takano et al.

Andraus et al. (2017) found improvement of functional groups by LPL irradiated at various doses compared to the group without LPL sciatic nerve injury by crushing rats. Takhtfooladi et al. (2015) found in a similar study functional outcome after application of LPL in crush injury of the sciatic nerve recovery in rats compared to the control group.

The maximum strength test was prepared following the standards Isaacs et al. (2005), with the adjustments required to achieve the goal of our experimental model. Isaacs et al. (2005), performed the electrical stimulation during the test of strength, nerve and not the muscle, as in our study, because they wanted to prove the passage of the stimulus by NTL, is it conducted specific electrophysiological nerve conduction studies. Furthermore, the muscle strength measured by Isaacs et al. (2005) it was not the maximum force, but a percentage of the operated side compared to the control side of the animal.

Mark (2002) and Hala (2003) also performed the electrical stimulation of the nerve and not the animal's muscle, but their goals were also different from ours. These authors stimulated the peroneal nerve intact to cause rat CTM contraction and verify the process of muscle fatigue.

We chose to stimulate the muscle directly because so we could achieve the strength of maximum contraction of the CTM animal. It is also important to note that if we tried to carry out the electrical stimulation during the maximum strength test ERM contraction, nerve, would not be possible to capture the contractions of the muscles of mice denervated group and it would prevent a comparison in the quality of contraction among all groups.

Using a frequency of 100 Hz frequency causes tetanic contraction, we found no differences between the experimental groups and the control group. The only difference ran the denervated group compared to the others.

This data is presented differently in relation to the study by our group in 2013 where we find contraction force difference electro stimulated group compared to the group without electrical stimulation.

The work carried out with LPL often not measure the strength of muscle contraction. Usually the authors work with LPL are more interested in nerve regeneration than in muscle preservation (Buchaim et al, 2016;. Souza et al, 2018.).

CTM was stained by HE staining clearly shows that as the muscle fiber, allowing the desired morphometric analysis. Moreover, it is a low-cost method.

Importantly, the minimum diameter measurement is more reliable than the measurement area or diameter maximum, because this is not changed inclination of the knife during the histologic section, as pointed out by Romão et al. (2007) and described by SA et al. (2004).

By analyzing the parameter area and minimum diameter of the cross-sectional muscle, we find superiority of ES and LPL groups for SEN + ES group and LPL. In relation to the area of the fiber both the ES group and LPL are equivalent to the control. All groups are superior to denervated group.

This shows that training for ES and treatment for LPL were positive for CTM after NTL, as there is a direct relationship between the cross section of muscle fiber with the strength that this muscle can produce (Neto, 2007). Other studies also demonstrate better muscle parameters for groups treated with ES or LPL after peripheral nerve injury (Gigo-behenate et al, 2010;. Maciel et al, 2013;. Huang et al, 2013.). But it is noteworthy that during muscle strength test found no difference between groups.

In relation to the area of the nerve fibers in the thickness measurements of the myelin sheath, myelin sheath area and the area of the nerve fiber equaled no group to the control group and the SEN group was superior to the other experimental groups in all these parameters.

To the minimum diameter of the nerve fiber also no group was equivalent to the control group but this time was the ES group outperformed the other experimental groups.

Regarding the number of nerve fibers in nerve LPL and LPL+ES groups were superior to SEN group and are equivalent to the control group with the ES group.

Reason for G, which measures the proportion between axon and myelin sheath, the ES group was superior to all others including the control group however, the control group also has an average that puts you in the normal range for this reason.

The results found in this study in relation to the nerve segment N1 suggest that there was an acceleration of nerve regeneration. This fact was also observed by Teodori et al. (2011); Tagami et al. (2009) Buchaim et al. (2016).

Ahlborn et al. (2007) observed, in addition to functional improvement, the positive effects on motor neurons and axons regenerated indicating the ES as a potential clinically viable approach for improving nervosperiféricos repair.

Accordingly Gigo-behenate et al. (2010b) observed in addition to the effects of nerve regeneration caused by LPL, an improvement in muscular parameters, as Souza et al. (2018) and Wang et al. (2014) found improved functional recovery after peripheral nerve injury and treatment with BPL and Du et al. (2018) found attenuation of muscle atrophy using ES associated with neural crest stem cells.

This work shows an interesting association between electric current and low power laser aiming system recovery from neuromuscular injury and peripheral nerve corrected SEN. Further work also shows the LPL and ES therapies as options without being combined. The results were interesting and showed in general that these interventions are valid, but could not make a comparison with works combining the two therapies because we did not find this model in the current literature.

Jobs that usually present with LPL and ES are making a comparison between the two techniques rather than a combination of them, moreover not necessarily these works aim to repair peripheral nerve injuries. Most of these works speak of temporomandibular disorders (Núñez et al, 2006;. Casali et al, 2013;. Seifi et al, 2017;. Rezazadeh et al, 2017.).

Analyzing generally to all attributes and especially to functional testing to be the main outcome of the present study, we found that the ES groups, LPL and LPL+ES were superior to SEN group and therefore, therapies applied in this study might be suggested as treatment associated after all repairs of peripheral nerves. keeping careful to develop and select the appropriate therapeutic parameters for each type of muscle.

## CONCLUSION

Based on our experimental model, we concluded that all treatment methods were able to provide some degree of nerve regeneration and functional recovery. We can also conclude that both the ES, and the LPL as the combination of the two techniques were more efficient in nerve regeneration, muscle maintenance and functional recovery of neuromuscular system than just repair by SEN.

Further studies with different treatment frequencies, modulations and doses of LPL, and ES in order to be able to standardize the treatment post SEN.

## REFERÊNCIAS

Abreu MF, Fagundes DS. Ação da irradiação laser de baixa frequência (LLLT) sobre os mecanismos celulares envolvidos na reparação de tecido nervoso periférico. Rev. Cient. Fac. Edu. Meio Amb. [on line]. 2011; 2(2):80-96.

Ahlborn P, Schachner M, Irintchev A. One hour electrical stimulation accelerates functional recovery after femoral nerve repair. Exp Neurol. 2007; 208(1):137-44. Epub 2007 Aug 23.

Akgul T, Gulsoy M, Gulcur HO. Effects of early and delayed laser application on nerve regeneration et al. Lasers Med Sci (2014) 29:351–357.

Alcântara CC, Gigo-Benato D, Salvini TF, Oliveira AL, Anders JJ, Russo TL. Effect of low-level laser therapy (LLLT) on acute neural recovery and inflammation-related gene expression after crush injury in rat sciatic nerve. Lasers Surg Med (2013) 45:246–252

Al-Qattan MM, Al-Thunyan A. Variables affecting axonal regeneration following end-to-side neurorrhaphy. Br J Plast Surg. 1998; 51(3):238-42.

Andraus RAC. Efeitos da Irradiação a LASER de Baixa Potência na Regeneração do Nervo Fibular Comum do Rato Submetido a Lesão por Esmagamento, 2009. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Disponível em:<file:///C:/Users/User/Downloads/Dissertacao\_Mestrado\_Definitiva.pdf>. Acesso em: 05 nov. 2018.

Andraus RAC, Barbieri CH, Mazzer N. A irradiação local com laser de baixa potência acelera a regeneração do nervo fibular de ratos. Acta Ortop Bras. 2010; 18(3):152-7.

Andraus RAC, et al. LLLT activates MMP-2 and increases muscle mechanical resistance after nerve sciatic rat regeneration. Lasers Med Sci. 2017; May;32(4):771-778.

Andreo L, et al. Effects of photobiomodulation on experimental models of peripheral nerve injury. Lasers Med Sci. 2017 Dec;32(9):2155-2165.

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

Babcock WW. A standard technique for operations on peripheral nerves with especial reference to the closure of large gaps. *Surg Gynecol Obstet*. 1927; 45:364-78.

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):129-36.

Baker MM, Juhn MS. Patellofemoral pain syndrome in the female athlete. *Clin Sports Med*. 2000; 19:315-29.

Ballance CA, Ballance HA, Stewart P. Remarks on the operative treatment of chronic facial palsy of peripheral origin. *Br Med J*. 1903; 2:1009-13.

Ballance CA. Some results of nerve anastomosis. *Br J Surg*. 1923; 11:327-46.

Basmajian JV. *Electro-fisiologia de la acción muscular*. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana S.A., 1976.

Beris A, Lykissas M, Korompilias A, Mitsionis G. End-to-side nerve repair in peripheral nerve injury. *J Neurotrauma*. 2007; 24(5):909-16.

Beris AE, Lykissas MG. Experimental results in end-to-side neurorrhaphy. *Int Rev Neurobiol*. 2009; 87:269-79.

Bertelli JA, Santos ARS, Calixto JB. Is axonal sprouting able to traverse the conjunctival layers of the peripheral nerve? A behavioral, motor, and sensory study of end-to-side nerve anastomosis. *J Reconstr Microsurg*. 1996; 12(8):559-63.

Bervar M. Video analysis of standing — an alternative footprint analysis to assess functional loss following injury to the rat sciatic nerve. *J Neurosci Methods*. 2000; 102: 109–116.

Bickel CS, Slade JM, Warren GL, Dudley GA. Fatigability and variable-frequency train stimulation of human skeletal muscle. *Phys Ther*. 2003; 83:366-73.

Bora FW Jr, Pleasure DE, Didizian NA. A study of nerve regeneration and neuroma formation after nerve suture by various techniques. *J Hand Surg Am*. 1976; 1:138-43.

Bora FW Jr. A comparison of epineural, perineural and epineural methods of nerve suture. *Clin Orthop Relat Res*. 1978; 133:91-4.

Bora W. Peripheral nerve repair in cats: the fascicular stitch. *J Bone Joint Surg Am*. 1967; 49:659-66.

Bratton BR, Kline DG, Hudson AR, Coleman WT. Use of monofilament polyglycolic acid suture for experimental peripheral nerve repair. *J Surg Res*. 1981; 31:482-9.

Braun RM. Epineurial nerve suture. *Clin Orthop Relat Res.* 1982; 163:50-6.

Brenner MJ, Dvali L, Hunter DA, Myckatyn TM, Mackinnon SE. Motor neuron regeneration through end-to-side repairs is a function of donor nerve axotomy. *Plast Reconstr Surg.* 2007; 120(1):215-23.

Brushart TME & Seiler WA. Selective reinnervation of distal motor stumps by peripheral motor axons. *Exp Neurol.* 1987; 97:289-300.

Buchaim et al. The new heterologous fibrin sealant in combination with low-level laser therapy (LLLT) in the repair of the buccal branch of the facial nerve. *Lasers Med Sci,* 2016.

Burt AV. *Neuroanatomia.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1995, p412.

Cabral CMN, Monteiro-Pedro V. Recuperação funcional de indivíduos com disfunção femoropatelar por meio de exercícios em cadeia cinética fechada: revisão da literatura. *Rev Bras Fisioter.* 2003; 7:1-8.

Caierão QM, Betini J, Teodori RM, Minamoto VB. O efeito do intervalo da estimulação elétrica no músculo desnervado de rato. *Rev Bras Fisioter.* 2008; 12(2):143-8.

Câmara CNS, Brito MVH, Silveira EL, Silva DSG, Simões VRF, Pontes RWF. Histological analysis of low-intensity laser therapy effects in peripheral nerve regeneration in Wistar rats. *Acta Cir. Bras.* 2011; 26 (1):12-18.

Camargo VM, Costa J, André ES. Estudo comparativo entre dois tipos de raio laser de baixa potência e seus respectivos efeitos sobre a regeneração nervosa periférica. *Fisioter Mov.* 2006;19(2):127-34.

Carandente F, Angeli A, Candiani GB, Crosignani PG, Dammasco F, De-Cecco L, Marrama P, Massobrio M, Martini L. Rhythms in the ovulatory cycle. 2nd: LH, FSH, estradiol and progesterone. *Chronobiologia.* 1989; 16(4):353-63.

Carlton JM, Goldberg NH. Quantitating integrated muscle function following reinnervation. *Surg Forum.* 1986; 37: 611–614.

Carvalho DCI, Rosim GC, Gama LOR, Tavares MR, Tribioli RA, Santos IR, Cliquet Júnior A. Tratamentos não farmacológicos na estimulação da osteogênese. *Rev Saúde Pública.* 2002; 36(5):647-54.

Carvalho LC, Polizello JC, Padula N, Freitas FC, Shimano AC, Mattiello-Sverzut AC. Propriedades mecânicas do gastrocnêmio eletroestimulado pós-imobilização. *Acta Ortop Bras.* [online]. 2009; 17(5):269-72.

Casali R, Damiani C, Maestri R, Wells CD. Pain and electrophysiological parameters are improved by combined 830-1064 high-intensity LASER in symptomatic carpal tunnel syndrome versus Transcutaneous Electrical Nerve Stimulation. *Eur J Phys Rehabil Med.* 2013; 49:205-11.

- Chem RC. Cirurgia sobre nervos periféricos. *Rev Amrigs*. 1978; 22:20-37.
- Chen Y-J, Wang Y-H, Wang C-Z, Ho M-L, Kuo P-L, et al. Effect of Low Level Laser Therapy on Chronic Compression of the Dorsal Root Ganglion. *PLoS ONE*. 2014; 9(3): e89894, 1- 8.
- Coleman CC. Surgical treatment of peripheral nerve injuries. *Surg Gynecol Obstet*. 1944; 78:113-24.
- Colin W, Donoff RB. Nerve regeneration through collagen tubes. *J Dent Res*. 1984; 63:987.
- Colomé LM, Gomes C, Crosignani N, Paz AH, Lugo AA, Guimarães KM, Foerstrom LP, Tessari JP, Colomé LM, Graça DL, Meurer L, Passos EP, Pippi NL, Cotesini EA, Lima EOC. Utilização de células tronco autólogas de medula óssea na regeneração do nervo tibial de coelhos mediante técnica de tubulização com prótese de silicone. *Ciência Rural*. 2008; 38(9):2529-34.
- Cowan SM, Bennell KL, Hodges PW, Crossley KA, McConnell J. Delayed onset of electromyographic activity of vastus medialis obliquus relative to vastus lateralis in subjects with patellofemoral pain syndrome. *Arch Phys Med Rehabil*. 2001; 82:183-9.
- Da-Silva C. *Biologia Celular e Molecular da regeneração do sistema nervoso periférico*. *Atual Neurociênc*. 1995; 19:1-16.
- Dellon AL, Ferreira MC, Williams EH, Rosson GD. Which End is Up? Terminology for Terminolateral (End-to-Side) Nerve Repair: A Review. *J Reconstr Microsurg*. 2010; 26(5):295-301
- Dellon AL, Mackinnon SE. Selection of the appropriate parameter to measure neural regeneration. *Ann Plast Surg*. 1989; 23:197–202.
- Dellon ES, Dellon AL. Functional assessment of neurologic impairment: track analysis in diabetic and compression neuropathies. *Plast Reconstr Surg*. 1991; 88:686–694.
- De Medinaceli L, Freed W, Wyatt RJ. An index of the functional condition of rat sciatic nerve based on measurements made from walking tracks. *Exp Neurol*. 1982; 77:634-43.
- De Sá JMR, Mazzer N, Barbieri CH, Barreira AA. The end-to-side peripheral nerve repair functional and morphometric study using the peroneal nerve of rats. *J Neurosci Methods*. 2004; 136(1):45-53.
- Doucette SA, Child DD. The effect of open and closed exercise and knee joint position on patellar tracking in lateral patellar compression syndrome. *J Orthop Sports Phys Ther*. 1996; 23:104-10.
- Dow DE, Cederna PS, Hassett CA, Kostrominova TY, Faulkner JA, Dennis RG. Number of contractions to maintain mass and force of denervated rat muscle. *Muscle Nerve*. 2004; 30:77–86.

Du J, et al. Optimal electrical stimulation boosts stem cell therapy in nerve regeneration. *Biomaterials*. 2018 October ; 181: 347–359.

Durigan JLQ, Cancelliero KM, Dias CKN, Silva CA, Guirro RRJ, Polacow MLO. Efeitos da estimulação elétrica neuromuscular sobre o membro posterior imobilizado de ratos durante 15 dias: análises metabólicas e morfométricas. *Rev Bras Fisioter*. 2006; 10(3):297-302.

Ellis JC, McCaffrey TV. Animal model for peripheral nerve grafting. *Otolaryngol Head Neck Sur*. 1984; 92(5):546-50.

Elzing K, Tyreman N, Ladak A, Savaryn B, Olson J, Gordon T. Brief electrical stimulation improves nerve regeneration after delayed repair in Sprague Dawley rats. *Experimental Neurology* 2015; 269; 142–153.

Elsberg CA. Experiments on motor nerve regeneration and the direct neurotization of paralyzed muscles by their own and by foreign nerves. *Science*. 1917; 45:318-20.

Enoka RM. *Bases neuromecânicas da cinesiologia*. 2ed. São Paulo: Manole, 2000.

Evans PJ, Bain JR, Mackinnon SE, Makino AP, Hunter DA. Selective reinnervation: a comparison of recovery following microsuture and conduit nerve repair. *Brain Res*. 1991; 559(2):315-21.

Fansa H, Keilhoff G, Altmann S, Plogmeier K, Wolf G, Chneider W. The effect of the immunosuppressant FK506 on peripheral nerve regeneration following nerve grafting. *J Hand Surg Br*. 1999; 24(1):38-42.

Fonseca ST, Cruz ABC, Lima SS, Seixas AFAM. Análise eletromiográfica dos músculos vasto medial oblíquo e vasto lateral em exercícios usados no tratamento da síndrome da dor patelofemoral. *Rev Fisiot Univers São Paulo*. 2001; 8(1):1-10.

Fox TA. Dysplasia of the quadriceps mechanism: hypoplasia of the vastus medialis muscle as related to the hypermobile patella syndrome. *Surg Clin North Am*. 1975; 55:199-206.

Franco RG. *Estudo Comparativo com diferentes números de pontes na neurorrafia látero-terminal em ratos*. [Dissertação de Mestrado]. Botucatu: Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina, 2010.

Fu SY, Gordon T. The cellular and molecular basis of peripheral nerve regeneration. *Mol Neurobiol*. 1997; 14:67-116.

Galli SK, Valauri F, Komisar A. Facial reanimation by cross-facial nerve grafting: report of five cases. *Ear Nose Throat J*. 2002; 81(1):25-9.

Gaster M, Handberg A, Beck-Nielsen H, Schroder HD. Glucose transporter expression in human skeletal muscle fibers. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2000; 279(3):E529-38.

Gatta R. Sulla anastomosi latero-terminale dei tronchi nervosi. *Arch Ital Chir.* 1938; 48:155-71.

Gigo-Benato D, Geuna S, Castro RA, Tos P, Fornaro M, Boux E, Battiston B, Giacobini-Robecchi MG, et al. Low-power laser biostimulation enhances nerve repair after end-to-side neurorrhaphy: a double-blind randomized study in the rat median nerve model. *Lasers in Medical Science* (2004) 19: 57–65.

Gigo-Benato D, Russo TL, Geuna S, Domingues NR, Salvini TF, Parizzoto NA. Electrical stimulation impairs early functional recovery and accentuates skeletal muscle atrophy after sciatic nerve crush injury in rats. *Muscle Nerve.* 2010a; 41(5):685-93.

Gigo-Benato D, Russo TL, Tanaka EH, Assis L, Salvini TF Parizzoto NA. Effects of 660 and 780nm Low-Level Laser Therapy on Neuromuscular Recovery After Crush Injury in Rat Sciatic Nerve. *Lasers in Surgery and Medicine* 2010b; 42:673–682.

Giovanoli P, Koller R, Meuli-Simmen C, Rab M, Haslik W, Mittlbo M, Meyer VE, Frey M. Functional and Morphometric Evaluation of End-to-Side Neurorrhaphy for Muscle Reinnervation. *Plast Reconstr Surg.* 2000; 106(2):388-92.

Girolami U, Anthony DC, Frosch MP. Nervo periférico e músculo esquelético. In: Cotran RS, Kuman V, Collins T. *Robbins Patologia Estrutural e Funcional.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p.1135-54.

Goheen-Robillard B, Myckatyn TM, Mackinnon SE, Hunter DA. End-to-side neurorrhaphy and lateral axonal sprouting in a long graft rat model. *Laryngoscope.* 2002; 112(5):899-905.

Gordon T. Electrical Stimulation to Enhance Axon Regeneration After Peripheral Nerve Injuries in Animal Models and Humans. *Neurotherapeutics.* 2016; 13:295–310.

Grabb WC, Bement SL, Koepke GH, Green RA. Comparison of methods of peripheral nerve suturing in monkeys. *Plast Reconstr Surg.* 1970; 46:31-8.

Gregory CM, Bickel CS. Recruitment patterns in human skeletal muscle during electrical stimulation. *Phys Ther.* 2005; 85:358-64.

Guirro RRJ, Silva CA, Forti F, Cancelliero KM. Análise do músculo esquelético desnervado tratado com metformina e/ou estimulação elétrica de baixa frequência. *Rev Bras Fisioter.* 2004; 8(1):21-7.

Guyton AC, *Tratado de fisiologia médica.* 6a.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1986.

Haninec P, Ámal FS, Tomas R, Houstava L, Dubovy P. Direct repair (nerve grafting), neurotization, end-to-side neurorrhaphy in the treatment of brachial plexus injury. *J Neurosurg.* 2007; 106:391-99.

Hala AZA. Efeito da irradiação laser e da irradiação infra vermelha em músculo tibial anterior de ratos submetido ao processo de fadiga muscular. [Dissertação de Mestrado]. São José dos Campos: Universidade do Vale do Paraíba, Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, 2003.

Harris ME, Tindall SC. Techniques of peripheral nerve repair. *Neurosurg Clin N Am.* 1991; 2:93-104.

Hayashi A, Yanai A, Komuro Y, Nishida M, Inoue M, Seki T. Collateral sprouting occurs following end-to-side neurorrhaphy. *Plast Reconstr Surg.* 2004; 114(1):129-137.

Henneman E, Olson CB. Relations between structure and function in the design of skeletal muscles. *J Neurophysiol.* 1965; 28:581-598.

Hentz VR, Rosen JM, Xiao SJ *et al.* A comparison of suture and tubulization nerve repair techniques in a primate. *J Hand Surg Am.* 1991; 16:251-61.

Huang J, Zhang Y, Lu L, Hu X, Luo Z. Electrical stimulation accelerates nerve regeneration and functional recovery in delayed peripheral nerve injury in rats. *European Journal of Neuroscience.* 2013; 38; 3691–3701.

Huckhagel T1, Nüchtern J2, Regelsberger J3, Gelderblom M4, Lefering R5; TraumaRegister DGU. Nerve trauma of the lower extremity: evaluation of 60,422 leg injured patients from the TraumaRegister DGU® between 2002 and 2015. *Scand J Trauma Resusc Emerg Med.* 2018 May 15;26(1):40.

Iñigo PR. Estimulación con corrientes de alta frecuencia para la cicatrización de la ruptura de meniscos en las lesiones en zona vascular y avascular, reporte preliminar de un nuevo abordaje terapéutico. *Rev Mex Ortop Traumatol.* 1998; 12(5):421-4.

Isaacs J, Allen D, Chen LE, Nunley J. Reverse End-to-Side Neurotization. *J Reconstr Microsurg.* 2005; 21(1):43-48.

Ito T, Hirotsu H, Yamamoto K. Peripheral nerve repairs by the funicular suture technique. *Acta Orthop Scand.* 1976; 47:283-9.

Jaberi FM, Abbas BP, Nezhad ST, Tanideh N. End-to-side neurorrhaphy: an experimental study in rabbits. *Microsurgery.* 2003; 23(4):359-62.

James DE, Strube M, Mucckler M. Molecular cloning and characterization of an insulin-regulatable glucose transporter. *Nature;* 1989; 338:83-7.

Jia X, Chen C, Yang J, Yu C. End-to-side neurotization with the phrenic nerve in restoring the function of toe extension: an experimental study in a rat model. *Journal of Plastic Surgery and Hand Surgery.* 2017; 1-4.

Junqueira LC, Carneiro C. *Histologia básica.* 9 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999, p427.

Kanaya F, Tajima T. Effect of electrostimulation on denervated muscle. *Clin Orthop Relat Res.* 1992; (283):296-301.

Karu T. Photobiological fundamentals of low-power laser therapy. *IEEE J. Quant. Elec.* 1987; QE-23; 10: 1703-1717.

Kisner C, Colby LA. *Exercícios Terapêuticos: Fundamentos e Técnicas*. 4 ed. Barueri: Manole, 2005.

Kleinert HE, Griffin JM. Technique of nerve anastomosis. *Orthop Clin North Am.* 1973; 4:907-15.

Koh KS, Kim JK, Kim CJ, Kwun BD, Kim SY. Hypoglossal-facial crossover in facial-nerve palsy: pure end-to-side anastomosis technique. *Br J Plast Surg.* 2002; 55(1):25-31.

Kotwal A, Schmidt CE. Electrical stimulation alters absorption and nerve cell interactions with electrically conducting biomaterials. *Biomaterials.* 2001; 22(10):1055-64.

Kumar PA, Hassan KM. Cross-face nerve graft with free-muscle transfer for reanimation of the paralysed face: a comparative study of the single stage and two-stage procedures. *Plast Reconstr Surg.* 2002; 109(2):451-62.

Kurze T. Microtechniques in neurological surgery. *Clin Neurosurg.* 1964; 11:128.

Langley NN, Hashimoto M. On the suture of separate nerve bundles in a nerve trunk and on internal plexuses. *J Physiol.* 1917; 51:318.

Liao WC, Chen JR, Wang YJ, Tseng GF. The efficacy of end-to-end and end-to-side nerve repair (neurorrhaphy) in the rat brachial plexus. *J Anat.* 2009; 215(5):506-21.

Lincoln GA, Short RV. Seasonal breeding nature's contraceptive. *Recent Prog Horm Res.* 1980; 36:1-52.

Liu K, Chen LE, Seaber AV, Goldner RV, Urbaniak JR. Motor functional and morphological findings following end-to-side neurorrhaphy in the rat model. *J Orthop Res.* 1999; 17(2):293-300.

Lohman R, Bullock F, McNaughton T, Siemionow M. End-to-end vs. end-to-side neurorrhaphy. *J Reconstr Microsurg.* 1997; 13:135-6.

Low J, Reed A. *Eletroterapia explicada: princípios e prática*. 3 ed. Barueri: Manole, 2001.

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

Lundborg G, Dhalin LB, Danielsen N, Nachemson AK. Tissue specificity in nerve regeneration. *Scand J Plast Reconstr Surg.* 1986; 20:279-83.

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

Lundborg G, Zhao Q, Kanje M, Danielsen N, Kerns JM. Can sensory and motor collateral sprouting be induced from intact peripheral nerve by end-to-side anastomosis? *J Hand Surg Br.* 1994; 19B:277-82.

Lutz BS, Chuang DCC, Hsu JC, Ma SF, Wei FC. Selection of donor nerve an important factor in end-to-side neurorrhaphy. *Br J Plast Surg.* 2000a; 53:149-54.

Lutz BS, Ma SF, Chuang DC, Wei FC. Role of the target in end-to-side neurorrhaphy: reinnervation of a single muscle vs. multiple muscles. *J Reconstr Microsurg.* 2000b; 16(6):443-8.

Maciel FO. Efeitos da corrente russa no ganho de força muscular. *Fisioterapia Ser.* 2010; 5(4):226-9.

Maciel F O, Viterbo F, Chinaque LFC, Souza BM. Effect of electrical stimulation of the cranial tibial muscle after end-to-side neurorrhaphy of the peroneal nerve in rats. *Acta Cir. Bras.* 2012; 28 (1): 39-47.

Majno G. *The healing hand man and wound in the ancient world.* Cambridge: Harvard University Press, 1975.

MacGregor K, Gerlach S, Mellor R, Hodges PW. Cutaneous stimulation from patella tape causes a differential increase in vasti muscle activity in people with patellofemoral pain. *J Orthop Res.* 2004; 23:351–8.

Mandelbaum-Livnat MM1, Almog M1, Nissan M1, Loeb E2, Shapira Y1, Rochkind S. Photobiomodulation Triple Treatment in Peripheral Nerve Injury: Nerve and Muscle Response. *Photomed Laser Surg.* 2016 Dec;34(12):638-645.

Marcos RL. Avaliação do efeito da irradiação laser AsGaAl (630-680 nm) no modelo experimental de fadiga muscular induzida por estimulação elétrica em ratos. [Dissertação de Mestrado]. São José dos Campos: Universidade do Vale do Paraíba, Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, 2002.

Matsuda K, Kakibuchi M, Kubo T, Tomita K, Fujiwara T, Hattori R, Yano K, Hosokawa K. A new model of end-to-side nerve graft for multiple branch reconstruction: end-to-side cross-face nerve graft in rats. *J Plast Reconstr Aesthet Surg.* 61(11):1357-67. 2008.

McCallister WV, Tang P, Trumble TE. Is end-to-side neurorrhaphy effective? A study of axonal sprouting stimulated from intact nerves. *J Reconstr Microsurg.* 1999; 15(8):597-604.

McIntyre DL, Robertson GE. Quadriceps muscle activity in women runners with and without patellofemoral pain syndrome. *Arch Phys Med Rehabil.* 1992; 7(10):14.

Mcquarrie IG. *Peripheral Nerve Surgery.* *Neurol Clin.* 1985; 3:453-66.

Mennen U. End-to-side nerve suture in primate (Chacma Baboon). *J Hand Surg.* 1998; 3:1-6.

Millesi H, Meissl G, Berger A. The interfascicular nerve-grafting of the median and ulnar nerves. *J Bone Joint Surg Am.* 1972; 54:727-50.

Millesi H. Peripheral nerve injuries. Nerve sutures and nerve injuries. *Scand J Plast Reconstr Surg Suppl.* 1982; 19:25-37.

Millesi H. Peripheral nerve repair: terminology, questions, and facts. *J Reconstr Microsurg.* 1985; 2(1):21-31.

Millesi H, Zöch G, Reihnsner R. Mechanical properties of peripheral nerves. *Clin Orthop Relat Res.* 1995; 314:76-83.

Millesi H, Hausner T, Schmidhammer R, Trattinig S, Tschabitscher M. Anatomical structures to provide passive motility of peripheral nerve trunks and fascicles. *Acta Neurochir Suppl.* 2007; 100:133-5.

Monte-Raso VV, Barbieri CH, Mazzer N, Yamasita AC, Barbieri G. Is the sciatic functional index always reliable and reproducible? *J Neurosc Methods.* 2008; 170:255-61.

Müller SF. Estudo Morfológico da regeneração axonal na síntese látero-terminal de nervo periférico de ratos com adesivo de fibrina e micro-sutura. [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo, Faculdade de Medicina, 2001.

Murray JA, Willins M, Mountain RE. A comparison of epineurial and perineurial sutures for the repair of a divided rat sciatic nerve. *Clin Otolaryngol Allied Sci.* 1994;19(2):95-7.

Myckatyn TM, Mackinnon SE, Hunter DA, Brakefield D, Parsadonian A. A novel model for the study of peripheral-nerve regeneration following common nerve injury paradigms. *J Reconstr Microsurg.* 2004; 20(7):533-44.

Narakas A. Les greffes nerveuses, expérience clinique. *Ann Chir Main.* 1989; 8:302-11.

Nelson RM, Hayes KW; Currier DP. *Eletroterapia Clínica.* 3 ed. Barueri: Manole, 2003.

Nemeth PM. Electrical stimulation of denervated muscle prevents decreases in oxidative enzymes. *Muscle Nerve.* 1982; 5(2):134-9.

Neto AG. Comparação entre estimulação elétrica funcional e contração voluntária máxima no treinamento de força muscular da preensão palmar. [Dissertação de Mestrado]. Brasília: Universidade Católica de Brasília, Programa de Pós Graduação em Educação Física, 2007.

Nissan M. et al. HeNe Laser irradiation delivered transcutaneously: its effect on the sciatic nerve of rats. *Laser Surg. Med.* 1986; 6:435-438.

Núñez SC, Garces AS, Suzuki SS, Ribeiro MS. Management of Mouth Opening in Patients with Temporomandibular Disorders through Low-Level Laser Therapy and Transcutaneous Electrical Neural Stimulation. *Photomedicine and Laser Surgery.* 2006; 24(1): 45–49.

Ögün TC, Özdemir M, Senaran H, Üstün ME. End-to-side neurorrhaphy as a salvage procedure for irreparable nerve injuries. *J Neurosurg.* 2003; 99(1):180-5.

Orgel MG, Terzis JK. Epineural vs. perineurial repair. An ultrastructural and electrophysiological study of nerve regeneration. *Plast Reconstr Surg.* 1977; 60:80-91.  
Papalia I, Geuna S, Tos PL, Boux E, Battiston B, Stagno D'Alcontres F. Morphologic and functional study of rat median nerve repair by terminolateral neurorrhaphy of the ulnar nerve. *J Reconstr Microsurg.* 2003; 19(4):257-64.

Papalia I, Lacrois C, Brunelli F, D'Alcontres FS. Direct neurotization after end-to-side neurorrhaphy. *J Reconstr Microsurg.* 2001; 17(4):237-46.

Pardini Jr AG, Freitas AD, Plentz EG. Avaliação da sensibilidade após neurorrafia látero-terminal de nervos digitais: nota prévia. *Rev Bras Ortop.* 2005; 40(9):543-54.

Patel NP, Lyon KA, Huang JH. An update—tissue engineered nerve grafts for the repair of peripheral nerve injuries. *Neural Regen Res.* 2018 May;13(5):764-774.

Pereira CEM, Silva JDM, Romeiro VR. Aspectos éticos da experimentação animal. *Acta Cir Bras.* 1998; 13(2):123-128.

Pette D, Staron RS. Mammalian skeletal muscle fiber type transitions. *Int Rev Cytol.* 1997; 170:143-223.

Politis MJ, Ederle K, Spencer PS. Tropism in nerve regeneration in vivo. Attraction of regenerating axons by diffusible factors derived from cells in distal nerve stumps of transected peripheral nerves. *Brain Res.* 1982; 253:1-12.

Polônio JT, Mazzer M, Barbieri CH, Mattiello-Sverzut AC. Eletroestimulação seletiva mantém estrutura e função do tibial anterior desnervado de ratos. *Acta Ortop Bras.* 2010; 18(2):85-9.

Qin L, Appell HJ, Chan KM, Maffulli N. Electrical stimulation prevents immobilization atrophy in skeletal muscle of rabbits. *Arch Phys Med Rehabil.* 1997; 78:512-7.

Reddy GK, Stehno-Bittel L, Enwemwka CS. Laser photostimulation accelerates wound healing in diabetic rats. *Wound Rep. Regen.* 2001; 9,3: 248-255.

Rezazadeh F., Hajian K., Shahidi sh., Piroozi S. Comparison of the Effects of Transcutaneous Electrical Nerve Stimulation and Low-Level Laser Therapy on Drug-Resistant Temporomandibular Disorders. *J Dent Shiraz Univ Med Sci.*, 2017 September; 18(3): 187-192.

Robinson AJ, Snyder-Mackler L. Eletrofisiologia clínica. 2 ed. Porto Alegre: Artmed, 2001.

Rochkind S, et al. Stimulatory effect of He-Ne low dose laser on injured sciatic nerves of rats. *Neurosurg.* 1987; 20, 6:843-847.

Rochkind S. Central Nervous System Transplantation Benefitted by Low-power Laser Irradiation. *Lasers in Medical Science* 1992.7:143-151.

Rochkind S. Photobiomodulation in Neuroscience: A Summary of Personal Experience. *Photomed Laser Surg.* 2017 Nov;35(11):604-615.

Rodrigues AC, Silva MD. Inside-out versus standard artery graft to repair a sensory nerve in rats. *Microsurgery.* 2001; 21:102-7.

Romão AM, Viterbo F, Stipp E, Garbino JA, Rodrigues JA. Eletroestimulação do músculo tibial cranial após esmagamento do nervo fibular comum: estudo neurofisiológico e morfométrico no rato. *Rev Bras Ortop.* 2007; 42(3):41-6.

Rouleau M, Crepeau J, Tetreault L, Lamarche J. Facial nerve sutures: epineural versus perineural sutures. *J Otolaryngol.* 1981; 10:338-42.

Rovak JM, Cederna PS, Kuzon WM. Terminolateral neurorrhaphy: a review of the literature. *J Reconstr Microsurg.* 2001; 17(8):615-24.

Ruffin MT, Kningham RB. Anterior knee pain: the challenge of patellofemoral syndrome. *Am Fam Physician.* 1993; 47(1):185-94.

Russo TL, Peviani SM, Durigan JLQ, Salvini TF. Electrical stimulation increases matrix metalloproteinase-2 gene expression but does not change its activity in denervated rat muscle. *Muscle Nerve.* 2008; 37:593–600.

Rutherford OM, Jones DA. The role of learning and coordination in strength training. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol.* 1986; 55(1):100-5.

Saito S, Shimizu N. Stimulatory effects of low -power laser irradiation on bone regeneration in midpalatal suture during expansion in the rat. *Am. J. Orthod. Dentofac. Orthop.* 1997; 111:525-532.

Sato KM. Comparação de neurorrafias término-terminais e término-laterais na reconstrução do nervo mediano: pesquisa experimental em ratos Wistar adultos [TCC Graduação Medicina]. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

Schmidhammer R, Redl H, Hopf R, Van der Nest DG, Millesi H. Synergistic terminal motor end-to-side nerve graft repair: investigation in a non-human primate model. *Acta Neurochir Suppl.* 2007; 100:97-101.

Seddon HJ. Three types of nerve injury. *Brain.* 1943; 66:237-88.

Seddon HJ. Nerve grafting. *J Bone Joint Surg Br.* 1963; 45:447-61.

Shaller O. *Nomenclatura anatômica veterinária ilustrada.* Barueri: Manole, 1999. 614p.

Seifi M, Ebadifar A, Kabiri S, Badiie MR, Abdolazimi Z, Amdjadi P. Comparative effectiveness of low level laser therapy and transcutaneous electric nerve stimulation on temporomandibular joint disorders. *J Lasers Med Sci.* 2017;8(Suppl 1):S27-S31.

Shen CC, Yang YC, Huang TB, Chan SC, Liu BS. Neural regeneration in a novel nerve conduit across a large gap of the transected sciatic nerve in rats with low-level laser phototherapy. *J Biomed Mater Res A.* 2013; 101:2763–2777.

Souza TD, Del Carlo RJ, Vilorio MIV. Eletroterapia no processo de reparação da superfície articular de coelhos. *Ciência Rural.* 2001; 31(5):819-24.

Souza LG, Marcolino AM, Kuriki HU, Gonçalves ECD, Fonseca MCR, Barbosa RN. Comparative effect of photobiomodulation associated with dexamethasone after sciatic nerve injury model. *Lasers in Medical Science.* 2018; 1-9.

Smith JW. Microsurgery of peripheral nerves. *Plast Reconstr Surg.* 1964; 33:317.

Snyder-Mackler L, Delitto A, Stralka SW, Bailey SL. Use of electrical stimulation to enhance recovery of quadriceps femoris muscle force production in patients following anterior cruciate ligament reconstruction. *Phys Ther.* 1994; 74:901-7.

Soo CL, Currier DP, Therelked AJ. Augmenting Voluntary Torque of Healthy Muscle by Optimization of Electrical Stimulation. *Phys Ther.* 1988; 68:333-7.

Sperandei S. The myth of the selective activation of the vastus medialis. *R bras Ci e Mov.* 2005; 13(1):109-16.

Starkey C. *Recursos terapêuticos em fisioterapia.* Barueri: Manole, 2001.

Stiene HA, Brosky T, Reiking MF, Nyland J, Mason MB. A comparison of closed kinetic chain and isokinetic joint isolation exercise in patients with patellofemoral dysfunction. *J Orthop Sports Phys Ther.* 1996; 24:136-41.

Stookey B. Artificial nerve branches for innervation of paralyzed muscles. *Arch Surg.* 1923; 6:731-8.

Sunderland, S. *Nerves and nerves injuries.* Baltimore: Williams and Wilkins Co., 1968. p.5, 26, 58,200-202.

Sunderland S. *Nerve injuries and their repair: a critical appraisal.* NY:Churchill Livingstone, 1991.

Sunderland S. *Nervios perifericos y sus lesiones.* 2a ed. Barcelona: Salvat, 1985.

Sunderland S. The intraneural topography of the radial, median and ulnar nerves. *Brain.* 1945; 68:243.

Sundine MJ, Quan EE, Saglam O, Dhawan V, Quesada PM, Ogden L, Harralson TG, Gossman MD, Maldonado CJ, Barker JH. The use of end-to-side nerve grafts to reinervate the paralyzed orbicularis oculi muscle. *Plast Reconstr Surg.* 2003; 111(7):2255-64.

Tagami Y, Kurimoto T, Miyoshi T, Morimoto T, Sawai H, Mimura O. Axonal Regeneration Induced by Repetitive Electrical Stimulation of Crushed Optic Nerve in Adult Rats. *Jpn J Ophthalmol.* 2009; 53:257-66.

Takhtfooladi MA, Jahanbakhsh F, Takhtfooladi HA, Yousefi K, Allahverdi A. Effect of low-level laser therapy (685 nm, 3 J/cm<sup>2</sup>) on functional recovery of the sciatic nerve in rats following crushing lesion. *Lasers Med Sci.* 2015 Apr;30(3):1047-52.

Takano Y, Haneda Y, Maeda T, Sakai Y, Matsuse H, Kawaguchi T, Tagawa Y, Shiba N. Increasing muscle strength and mass of thigh in elderly people with the hybrid-training method of electrical stimulation and volitional contraction. *Tohoku J Exp Med.* 2010; 221(1):77-85.

Tang JB. Vein conduits with interposition of nerve tissue for peripheral nerve defects. *J Reconstr Microsurg* 11:21-26, 1995.

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

Terzis JK, Sun DD, Thanos PK. Histological and basic science review; past, present, and future of nerve repairs. *J Reconstr Microsurg.* 1997; 13:215-25.

Tessitore A, Pflsticker LN, Paschoal JR. Aspectos neurofisiológicos da musculatura facial visando a reabilitação na paralisia facial. *Rev CEFAC.* 2008; 10(1):68-75.

Thomeé R, Restrom P, Karlsson J, Grimby G. Patellofemoral pain syndrome in young women. Part II – Muscle function in patients and healthy controls. *Scand J Med Sci Sports.* 1995; 5:245-51.

Valent F, Eleopra R, Manganotti P, Passadore P. A population-based study of injuries to the brachial plexus and to the peripheral nerves of the shoulder girdle and upper limb in the Italian region Friuli Venezia Giulia. *Neurosurg Rev.* 2018 Apr;41(2):519-523.

Van Dulken H, Thomeer TWM. Recent developments in peripheral nerve surgery. Management of open traumatic peripheral nerve lesions. *Arch Chir Neerl.* 1978; 30:91-9.

Vieira S, Hossne WS. Metodologia científica para a área de saúde. Rio de Janeiro: Campus, 2001. 192p.

Viterbo F. A new method for treatment of facial palsy: the cross-face nerve transplantation with end-to-side neurorraphy. *Rev Soc Bras Cir Plast Reconst Est.* 1993; 8:29-35.

Viterbo F. Neurorrafia Látero-Terminal, estudo experimental no rato. [Tese de Doutorado]. Botucatu: Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina, 1992.

Viterbo F, Teixeira E, Hoshino K, Padovani CR. End-to-side neurorraphy with and without perineurium. *Revista Paulista de Medicina.* 1998; 116:1808-14.

Viterbo F, Trindade JC, Hoshino K, Mazzoni Neto A. Latero-terminal neurorraphy without removal of the epineural sheath: experimental study in rats. *Rev Paul Med.* 1992; 110:267-75.

Viterbo F, Trindade JC, Hoshino K, Mazzoni Neto A. End-to-side neurorraphy with removal of the epineural sheath: an experimental study in rats. *Plast Reconstr Surg.* 1994a; 94:1038-47.

Viterbo F, Trindade JC, Hoshino K, Mazzoni Neto A. Two end-to side neurorraphies and nerve graft with removal of the epineural sheath: experimental study in rats. *Br J Plast Surg.* 1994b; 47:75-80.

Viterbo F, Brock RS, Maciel F, Ayestaray B, Garbino JA, Rodrigues CP. End-to-side versus end-to-end neurorrhaphy at the peroneal nerve in rats. *Acta Cir Bras.* 2017;32(9):697-705.

Wang CZ, Chen YJ, Wang YH, Yeh ML, Huang MH, et al. Low-Level Laser Irradiation Improves Functional Recovery and Nerve Regeneration in Sciatic Nerve Crush Rat Injury Model. *PLoS ONE.* 2014; 9(8):1-11.

Ward AR, Shkuratova N. Russian Electrical Stimulation: the early experiments. *Phys Ther.* 2002; 82:1019-30.

Ward AR. Electrical stimulation using kilohertz-frequency alternating current. *Phys Ther.* 2009; 89:181-190.

Wilk KE, Reinold MM. Principles of patellofemoral rehabilitation. *Sports Med Arthrosc.* 2001; 9:325-36.

Willand MP, Nguyen MA, Borschel GH, Gordon T. Electrical Stimulation to Promote Peripheral Nerve Regeneration. *Neurorehabilitation and Neural Repair.* 2015; 1-7.

Williams HB. The value of continuous electrical muscle stimulation using a completely implantable system in the preservation of muscle function following motor nerve injury and repair: an experimental study. *Microsurgery.* 1996; 17(11):589-96.

Wong AYC, Scott JJA. Functional recovery following direct or graft repair of nerve gaps in the rat. *Exp Neurol.* 1991; 114:364-6.

Yamamoto Y, Sasaki S, Sekido M, Yokoyama T, Tsutsumida A, Furukawa H, Sawamura Y, Sugihara T. Alternative approach using the combined technique of nerve crossover and cross-nerve grafting for reanimation of facial palsy. *Microsurgery*. 2003; 23:251-6.

Yamamoto Y, Sasaki S, Sekido M, Yokoyama T, Tsutsumida A, Furukawa H, Sawamura Y, Sugihara T. Alternative approach using the combined technique of nerve crossover and cross-nerve grafting for reanimation of facial palsy. *Microsurgery*. 2003; 23:251-6.

Yoleri L, Songur E, Yoleri O, Vural T, Cagdas A. Reanimation of early facial paralysis with hypoglossal/facial end-to-side neurotomy: a new approach. *J Reconstr Microsurg*. 2000; 16(5):347-55.

Zhao Q, Dahlin LB, Kanje M, Lundborg G, Lu SB. Axonal projections and functional recovery following fascicular repair of the rat sciatic nerve with Y-tunneled silicone chambers. *Restor Neurol Neurosci*. 1992; 4(1):13-19.

Zhao J, Chen Z, Chen T. Nerve regeneration after termino-lateral neurotomy: experimental study in rats. *J Reconstr Microsurg*. 1997; 13:31-7.