



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

CARLOS HENRIQUE FACHIN BORTOLUCI

ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA COM CORRENTES DE MÉDIA
FREQUÊNCIA NA REGENERAÇÃO NERVOSA PERIFÉRICA APÓS
NEURORRAFIA LÁTERO-TERMINAL DO NERVO FIBULAR
COMUM DE RATOS

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

Orientador: Prof. Adjunto Fausto Viterbo

Coorientador: Prof. Dr. Geraldo Marco Rosa Junior

Botucatu
2017

CARLOS HENRIQUE FACHIN BORTOLUCI

ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA COM CORRENTES DE MÉDIA
FREQUÊNCIA NA REGENERAÇÃO NERVOSA PERIFÉRICA APÓS
NEURORRAFIA LÁTERO-TERMINAL DO NERVO FIBULAR COMUM
DE RATOS

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

Orientador: Prof. Adjunto Fausto Viterbo

Coorientador: Prof. Dr. Geraldo Marco Rosa Junior

Botucatu
2017

Ficha Catalográfica

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Bortoluci, Carlos Henrique Fachin.

Estimulação elétrica com correntes de média frequência na regeneração nervosa periférica após neurorrafia látero-terminal do nervo fibular comum de ratos / Carlos Henrique Fachin Bortoluci. - Botucatu, 2017

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

Orientador: Fausto Viterbo

Coorientador: Geraldo Marco Rosa Junior

Capes: 40102009

1. Estimulação elétrica. 2. Nervos periféricos - Cirurgia. 3. Nervo fibular. 4. Sistema nervoso - Regeneração. 5. Rato como animal de laboratório.

Palavras-chave: Estimulação elétrica; Nervo fibular; Neurorrafia látero-terminal; Ratos.

Folha de aprovação
Carlos Henrique Fachin Bortoluci

ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA COM CORRENTES DE MÉDIA
FREQUÊNCIA NA RÉGENERAÇÃO NERVOSA PERIFÉRICA APÓS
NEURORRAFIA LÁTERO-TERMINAL DO NERVO FIBULAR COMUM DE RATOS

Orientador: Prof. Adjunto Fausto Viterbo
Faculdade de Medicina de Botucatu – FMB/UNESP

Comissão examinadora

Prof. Dr. Antonio de Castro Rodrigues
Faculdade de Odontologia de Bauru – FOB/USP

Prof. Dr. José de Anchieta de Castro e Horta Junior
Departamento de Anatomia – IB/Botucatu

Prof. Dr. Rogério Leone Buchaim
Faculdade de Odontologia de Bauru – FOB/USP

Profa. Dra. Valéria Paula Sassoli Fazan
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - SP

Profa. Dra. Geruza Rezende Paiva
Hospital e Maternidade Santa Paula - MG

Profa. Dra. Maria Inês Meira Dolfini
Faculdade de Medicina de Presidente Prudente - UNOESTE

Prof. Dr. Eduardo José Danza Vicente
Universidade Federal de Juiz de Fora - MG

Botucatu
2017

CURRICULUM

Carlos Henrique Fachin Bortoluci, graduado em Fisioterapia, 1997, pela Universidade do Sagrado Coração (USC), Bauru/SP.

Especialista em Reabilitação em Neurologia Infantil pela UNICAMP, 2004.

Mestre em Biologia Oral pela Universidade do Sagrado Coração. Dissertação: Morfometria e Histoquímica das Fibras Musculares do Músculo Bíceps Braquial do Macaco-Prego (*Cebus apella Linnaeus - 1758*). Ano de Obtenção: 2004. Orientador: Prof. Dr. Jesus Carlos Andreo.

Professor do curso de Fisioterapia na Universidade do Sagrado Coração (USC) desde 2001.

Coordenador do Curso de Fisioterapia da Universidade do Sagrado Coração desde 2014.

Dedicatória

Dedico este trabalho à pessoa que me proporcionou todas as possibilidades de crescimento, meu pai, Dr. Rony.

...quando eu cair no chão
segura a minha mão
me ajuda a levantar
para lutar

se o medo da loucura
nessa estrada escura
me afastar da luz
que me conduz

se eu me sentir sozinho
ou sair do caminho
e a dor vier de noite
me assustar

e se eu perder coragem
pra seguir viagem
a fé que me faltar
eu vou buscar com você meu pai...

Ofereço também a uma pessoa inefável, minha mãe, Marilene (*in memoriam*).

...bastou o teu olhar
pra me calar a voz
de onde está você
rogai por nós
minha mãe me ensina
a segurar a barra
de te amar

segura a minha mão
quando ela fraquejar
e não deixe a solidão
me assustar...

Agradecimentos

Ao Prof. Adjunto Fausto Viterbo pela habilidade e destreza na orientação e também pela oportunidade de crescimento profissional.

Ao Prof. Dr. Geraldo Marco Rosa Junior, que idealizou e tornou possível a realização deste trabalho.

Ao meu amigo Prof. Me. Luis Henrique Simionato e sua esposa Eliane pelo incentivo e companheirismo em mais essa trajetório juntos.

À Universidade do Sagrado Coração pelo apoio e incentivo pela busca do conhecimento.

Aos meus pais Dr. Rony e Marilene (*in memoriam*), que sempre estão em meus pensamentos e por me guiarem sempre pelo caminho do bem como também a meus irmãos.

À secretária do programa de pós-graduação Márcia, sempre muito atenciosa.

Aos funcionários da Cirurgia Experimental.

Epígrafe

Veja!
Não diga que a canção está perdida
Tenha fé em Deus, tenha fé na vida
Tente outra vez!

Beba! (Beba!), pois a água viva
Ainda tá na fonte
Você tem dois pés para cruzar a ponte
Nada acabou!
Não! Não! Não!

Tente, levante sua mão sedenta
E recomece a andar
Não pense que a cabeça aguenta
Se você parar
Não! Não! Não!
Não! Não! Não!

Há uma voz que canta, uma voz que dança
Uma voz que gira, bailando no ar
Uh! Uh! Uh!

Queira! (Queira!)
Basta ser sincero e desejar profundo
Você será capaz de sacudir o mundo
Vai, tente outra vez!

Tente! (Tente!)
E não diga que a vitória está perdida
Se é de batalhas que se vive a vida
TENTE OUTRA VEZ!!!!

Resumo

BORTOLUCI CHF. Estimulação elétrica com correntes de média frequência na regeneração nervosa periférica após neurorrafia látero-terminal do nervo fibular comum de ratos. Tese – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2017.

INTRODUÇÃO: lesões nervosas periféricas podem levar à perda funcional importante para o paciente. Assim, muitas pesquisas buscam aprimorar técnicas cirúrgicas e tratamentos pós-cirúrgicos com a finalidade de minimizar a perda funcional do paciente. Os nervos periféricos estão sujeitos as doenças inflamatórias, traumáticas, metabólicas, tóxicas, genéticas e neoplásicas. Essas doenças levam a diferentes tipos e graus de lesões. **OBJETIVO:** comparar a eficiência da estimulação elétrica com correntes de média frequência (Russa e Aussie) na regeneração nervosa periférica após neurorrafia látero-terminal do nervo fibular comum de ratos. **METODOLOGIA:** os 120 animais foram divididos em 11 grupos experimentais, subdivididos em dois grandes grupos, um de 45 dias e outro de 90 dias: Grupo Controle Inicial (GCI) com 8 animais; Grupo Neurorrafia Látero-Terminal (GNLT45) com 8 animais; Grupo Estimulação Aussie (GEA45) com 16 animais; Grupo Estimulação Russa (GER45) com 16 animais; Grupo Desnervado (GD45) com 8 animais; Grupo Controle Final (GCF45) com 8 animais; Grupo Neurorrafia Látero-Terminal (GNLT90) com 8 animais; Grupo Estimulação Aussie (GEA90) com 16 animais; Grupo Estimulação Russa (GER90) com 16 animais; Grupo Desnervado (GD90) com 8 animais; Grupo Controle Final (GCF90) com 8 animais. A estimulação elétrica com Corrente Aussie e Russa teve início com cinco dias de pós-operatório. Os animais dos grupos (GEA45, GEA90, GER45 e GER90) foram submetidos a três sessões semanais, com dias alternados, durante os 45 e 90 dias, totalizando 18 e 36. As correntes foram moduladas em 30 e 100Hz, para recrutarem os dois tipos de fibras musculares (I e II) respectivamente. **RESULTADOS:** os grupos eletroestimulados tiveram resultados estatisticamente significantes quando comparados aos grupos que não receberam estimulação elétrica, tanto nos aspectos morfológicos, como no aspecto funcional. **CONCLUSÃO:** a estimulação elétrica utilizada no presente estudo foi eficiente na regeneração do nervo fibular comum de ratos após neurorrafia látero-terminal, mas sem diferença significativa entre ambas as correntes utilizadas (Aussie *versus* Russa). Porém, houve diferença significativa em relação ao tempo de eletroestimulação (45 *versus* 90 dias), mostrando que um maior tempo de tratamento promove melhores resultados.

Palavras-Chave: Neurorrafia látero-terminal. Estimulação elétrica. Nervo fibular. Ratos.

Abstract

BORTOLUCI CHF. Electrical stimulation with medium-frequency currents in peripheral nerve regeneration after end-to-side neurorrhaphy of the common fibular nerve in rats. Tese – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2017.

INTRODUCTION: peripheral nerve damage can lead to significant functional loss for the patient. Thus, many researchers have sought to improve surgical techniques and post-surgical treatments in order to minimize the patient's functional loss. Peripheral nerves are subject to inflammatory, traumatic, metabolic, toxic, genetic and neoplastic diseases. These diseases lead to different types and degrees of injury. **OBJECTIVE:** to compare the efficiency of the electrical stimulation with medium frequency currents in peripheral nerve regeneration after end-to-side neurorrhaphy of the common fibular nerve in rats. **METHODOLOGY:** 120 animals were allocated into 11 experimental groups, subdivided into two big groups, the first one consisting of 45 days and the second one with 90 days: Initial Control Group (ICG) with 8 animals; End-to-Side Neurorrhaphy Group (GNLT45) with 8 animals; Aussie Stimulation Group (GEA45) with 16 animals; Russian Stimulation Group (GER45) with 16 animals; Denervated Group (GD45) with 8 animals; Final Control Group (GCF45) with 8 animals; End-to-Side Neurorrhaphy Group (GNLT90) with 8 animals; Aussie Stimulation Group (GEA90) with 16 animals; Russian Stimulation Group (GER90) with 16 animals; Denervated Group (GD90) with 8 animals; Final Control Group (GCF 90) with 8 animals. Electrical stimulation by Aussie and Russian currents started with five post-operative days. The animals of the groups (GEA45, GEA90, GER45 and GER90) were treated three times a week in alternating days, during 45 and 90 days, totaling 18 and 36 sessions, respectively. The electrical currents were modulated in 30 and 100Hz to recruit both types of fibers (I and II), respectively. **RESULTS:** the treated groups had statistical significant results when compared to groups that did not receive electrical stimulation regarding both morphological and functional aspects. **CONCLUSION:** the electrical stimulation used in this present study was efficient in regeneration of the common fibular nerve in rats after end-to-side neurorrhaphy, but without a significant difference between both currents used (Aussie *versus* Russian). However, there was a significant difference related to the time of electrical stimulation (45 *versus* 90 days), showing that long periods of treatment promote better results.

Key-words: End-to-side neurorrhaphy. Electric stimulation. Peroneal nerve. Rats.

Lista de abreviaturas

GCI – grupo controle inicial.

GNLT45 – grupo neurorrafia látero-terminal 45 dias.

GEA45 – grupo estimulação Aussie 45 dias.

GER45 – grupo estimulação Russa 45 dias.

GCF45 – grupo controle final 45 dias.

GD45 – grupo desnervado 45 dias.

GNLT90 – grupo neurorrafia látero-terminal 90 dias.

GEA90 – grupo estimulação Aussie 90 dias.

GER90 – grupo estimulação Russa 90 dias.

GCF90 – grupo controle final 90 dias.

GD90 – grupo desnervado 90 dias.

Hz – hertz.

ms – milissegundos.

COBEA - Colégio Brasileiro de Experimentação Animal.

IFF – índice funcional do fibular.

μ s – microssegundos.

μ m – micrômetro.

°C – graus centígrados.

mA – miliamperes.

NLT – neurorrafia látero-terminal.

Lista de ilustrações

Figura 1- Foto da desnervação, sutura do coto proximal na musculatura adjacente e do coto distal na tela subcutânea.	25
Figura 2- Foto da neurografia látero-terminal, sutura do nervo fibular comum na face lateral do nervo tibial.	25
Figura 3 – Foto do Neurodyn – Corrente Aussie.	28
Figura 4 – Foto do Endophasys – Corrente Russa.	29
Figura 5 – Foto dos animais encapsulados para estimulação elétrica.	29
Figura 6 – Foto do CatWalk.	30
Figura 7 – Foto do registro da caminhada do animal no CatWalk.	31
Figura 8 – Foto do eletroneuromiógrafo.	32
Figura 9 – Foto do teste eletroneurofisiológico.	32
Figura 10 – Foto do microscópio Nikon Eclipse 80i, com câmera Quimaging Micropublisher 3.3 RTV.	34
Figura 11 – Gráfico dos resultados do índice funcional, após aplicação das correntes elétricas nos grupos 45 dias. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes ($p \leq 0,05$).	36
Figura 12 - Gráfico dos resultados do índice funcional, após aplicação das correntes nos grupos 90 dias. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes ($p \leq 0,05$).	37
Figura 13 - Comparação do índice funcional dos animais após 45 e 90 dias de aplicação das correntes dos grupos GEA45 e GEA90, GER45 e GER90. Letras diferentes entre si indicam diferenças estatisticamente significativas ($p \leq 0,05$).	38
Figura 14 - Gráfico dos valores da massa corporal inicial dos animais (em gramas) dos grupos 45 dias. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes ($p \leq 0,05$).	39
Figura 15 - Gráfico dos valores da massa corporal final dos animais (em gramas) dos grupos 45 dias. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes ($p \leq 0,05$).	40
Figura 16 - Gráfico dos valores da massa corporal inicial dos animais (em gramas) dos grupos 90 dias. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes ($p \leq 0,05$).	41
Figura 17 - Gráfico dos valores da massa corporal final dos animais (em gramas) dos grupos 90 dias. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes ($p \leq 0,05$).	42
Figura 18 – Gráfico dos resultados da medida da amplitude (mV) dos animais dos grupos 45 dias. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes ($p \leq 0,05$).	43
Figura 19 – Gráfico dos resultados da medida da latência (ms) dos animais dos grupos 45 dias. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes ($p \leq 0,05$).	44
Figura 20 – Gráfico dos resultados da medida da amplitude (mV) dos animais dos grupos 90 dias. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes ($p \leq 0,05$).	45
Figura 21 – Gráfico dos resultados da medida da latência (ms) dos animais dos grupos 90 dias. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes ($p \leq 0,05$).	46

Figura 22 - Gráfico de comparação dos valores da amplitude, entre os grupos GNLT 45, GNLT90, GEA45, GER45, GEA90 e GER90 dias, média e desvio padrão.	47
Figura 23 – Gráfico de Comparação dos valores da latência, entre os grupos GNLT 45, GNLT90, GEA45, GER45, GEA90 e GER90 dias, média e desvio padrão.	48
Figura 24 – Gráfico dos resultados da medida da área das fibras nervosas (μm^2) dos animais dos grupos 45 dias. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes ($p \leq 0,05$).	49
Figura 25 – Gráfico dos resultados da medida do diâmetro das fibras nervosas (μm) dos animais dos grupos 45 dias. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes ($p \leq 0,05$).	50
Figura 26 – Gráfico dos resultados da medida da área dos axônios (μm^2) dos animais dos grupos 45 dias. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes ($p \leq 0,05$).	51
Figura 27 – Gráfico dos resultados da medida do diâmetro dos axônios (μm) dos animais dos grupos 45 dias. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes ($p \leq 0,05$).	52
Figura 28 – Gráfico dos resultados da medida da área da bainha de mielina (μm^2) dos animais dos grupos 45 dias. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes ($p \leq 0,05$).	53
Figura 29 – Gráfico dos resultados da medida da espessura da bainha de mielina (μm) dos animais dos grupos 45 dias. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes ($p \leq 0,05$).	54
Figura 30 – Gráfico dos resultados da medida da área da fibra nervosa (μm^2) dos animais dos grupos 90 dias. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes ($p \leq 0,05$).	55
Figura 31 – Gráfico dos resultados da medida do diâmetro da fibra nervosa (μm) dos animais dos grupos 90 dias. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes ($p \leq 0,05$).	56
Figura 32 – Gráfico dos resultados da medida da área do axônio (μm^2) dos animais dos grupos 90 dias. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes ($p \leq 0,05$).	57
Figura 33 – Gráfico dos resultados da medida do diâmetro do axônio (μm) dos animais dos grupos 90 dias. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes ($p \leq 0,05$).	58
Figura 34 – Gráfico dos resultados da medida da área da bainha de mielina (μm^2) dos animais dos grupos 90 dias. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes ($p \leq 0,05$).	59
Figura 35 – Gráfico dos resultados da medida da espessura da bainha de mielina (μm) dos animais dos grupos 90 dias. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes ($p \leq 0,05$).	60
Figura 36 – Gráfico de comparação dos valores da área da fibra nervosa, entre os grupos GNLT 45, GNLT90, GEA45, GER45, GEA90 e GER90 dias, média e desvio padrão.	61
Figura 37 – Gráfico de comparação dos valores do diâmetro da fibra nervosa, entre os grupos GNLT 45, GNLT90, GEA45, GER45, GEA90 e GER90 dias, média e desvio padrão.	62
Figura 38 – Gráfico de comparação dos valores da área do axônio, entre os grupos GNLT 45, GNLT90, GEA45, GER45, GEA90 e GER90 dias, média e desvio padrão.	63

Figura 39 – Gráfico de comparação dos valores do diâmetro do axônio, entre os grupos GNLT 45, GNLT90, GEA45, GER45, GEA90 e GER90 dias, média e desvio padrão.	64
Figura 40 – Gráfico de comparação dos valores da área da bainha de mielina, entre os grupos GNLT 45, GNLT90, GEA45, GER45, GEA90 e GER90 dias, média e desvio padrão.	65
Figura 41 – Gráfico de comparação dos valores da espessura da bainha de mielina, entre os grupos GNLT 45, GNLT90, GEA45, GER45, GEA90 e GER90 dias, média e desvio padrão.	66
Figura 42 – Gráfico dos resultados da medida da razão G dos animais dos grupos 45 dias. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes ($p \leq 0,05$).	67
Figura 43 – Gráfico dos resultados da medida da razão G dos animais dos grupos 90 dias. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes ($p \leq 0,05$).	68
Figura 44 – Gráfico de comparação dos valores da razão G, entre os grupos GNLT 45, GNLT90, GEA45, GER45, GEA90 e GER90 dias, média e desvio padrão.	69
Figura 45 – Gráfico dos resultados da contagem total de fibras nervosas dos animais dos grupos 45 dias. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes ($p \leq 0,05$).	70
Figura 46 – Gráfico da contagem total de fibras nervosas dos grupos 90 dias. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes ($p \leq 0,05$).	71
Figura 47 – Gráfico de comparação dos valores da contagem total de fibras nervosas, entre os grupos GNLT 45, GNLT90, GEA45, GER45, GEA90 e GER90 dias, média e desvio padrão.	72
Figura 48 – A- grupo controle inicial (GCI); B- grupo neurorrafia látero-terminal (GNLT45); C- grupo estimulação Aussie (GEA45); D- grupo estimulação Russa (GER45); E- grupo controle final (GCF45); F- grupo desnervado (GD45).	73
Figura 49 – A- grupo controle inicial (GCI); B- grupo neurorrafia látero-terminal (GNLT90); C- grupo estimulação Aussie (GEA90) ; D- grupo estimulação Russa (GER90); E- grupo controle final (GCF90); F- grupo desnervado (GD90).	74

Lista de tabelas

Tabela 1 – Resultados da média e desvio padrão do índice funcional após aplicação das correntes, nos grupos 45 dias.	36
Tabela 2 – Resultados da média e desvio padrão do índice funcional após aplicação das correntes, nos grupos 90 dias.	37
Tabela 3 – Comparação dos valores do índice funcional, na avaliação da marcha, entre os grupos GNLT 45, GNLT90, GEA45, GEA90, GER45 e GER90 dias, média e desvio padrão.	38
Tabela 4 – Média e desvio padrão da massa corporal inicial dos animais (em gramas) dos grupos 45 dias	39
Tabela 5 – Média e desvio padrão da massa corporal final dos animais (em gramas) dos grupos 45 dias.	40
Tabela 6 – Média e desvio padrão da massa corporal inicial dos animais (em gramas) dos grupos 90 dias.	41
Tabela 7 – Média e desvio padrão da massa corporal final dos animais (em gramas) dos grupos 90 dias.	42
Tabela 8 – Média e desvio padrão da amplitude (mV) dos grupos 45 dias.	43
Tabela 9 – Média e desvio padrão da latência (ms) dos grupos 45 dias.	44
Tabela 10 – Média e desvio padrão da amplitude (mV) dos grupos 90 dias.	45
Tabela 11 – Média e desvio padrão da latência (ms) dos grupos 90 dias.	46
Tabela 12 – Comparação dos valores da amplitude, entre os grupos GNLT 45, GNLT90, GEA45, GER45, GEA90 e GER90 dias, média e desvio padrão.	47
Tabela 13 – Comparação dos valores da latência, entre os grupos GNLT 45, GNLT90, GEA45, GER45, GEA90 e GER90 dias, média e desvio padrão.	48
Tabela 14 – Média e desvio padrão da área das fibras nervosas (μm^2) dos grupos 45 dias.	49
Tabela 15 – Média e desvio padrão do diâmetro das fibras nervosas (μm) dos grupos 45 dias.	50
Tabela 16 – Média e desvio padrão da medida da área dos axônios (μm^2) dos grupos 45 dias.	51
Tabela 17 – Média e desvio padrão da medida do diâmetro dos axônios (μm) dos grupos 45 dias.	52
Tabela 18 – Média e desvio padrão da medida da área da bainha de mielina (μm^2) dos grupos 45 dias.	53
Tabela 19 – Média e desvio padrão da medida da espessura da bainha de mielina (μm) dos grupos 45 dias.	54
Tabela 20 – Média e desvio padrão da medida da área da fibra nervosa (μm^2) dos grupos 90 dias.	55
Tabela 21 – Média e desvio padrão da medida do diâmetro da fibra nervosa (μm) dos grupos 90 dias.	56
Tabela 22 – Média e desvio padrão da medida da área do axônio (μm^2) dos grupos 90 dias.	57

Tabela 23 – Média e desvio padrão da medida do diâmetro do axônio (μm) dos grupos 90 dias.	58
Tabela 24 – Média e desvio padrão da medida da área da bainha de mielina (μm^2) dos grupos 90 dias.	56
Tabela 25 – Média e desvio padrão da medida da espessura da bainha de mielina (μm) dos grupos 90 dias.	60
Tabela 26 – Comparação dos valores da área da fibra nervosa, entre os grupos GNLT 45, GNLT90, GEA45, GER45, GEA90 e GER90 dias, média e desvio padrão.	61
Tabela 27 – Comparação dos valores do diâmetro da fibra nervosa, entre os grupos GNLT 45, GNLT90, GEA45, GER45, GEA90 e GER90 dias, média e desvio padrão.	62
Tabela 28 – Comparação dos valores da área do axônio, entre os grupos GNLT 45, GNLT90, GEA45, GER45, GEA90 e GER90 dias, média e desvio padrão.	63
Tabela 29 – Comparação dos valores do diâmetro do axônio, entre os grupos GNLT 45, GNLT90, GEA45, GER45, GEA90 e GER90 dias, média e desvio padrão.	64
Tabela 30 – Comparação dos valores da área da bainha de mielina, entre os grupos GNLT 45, GNLT90, GEA45, GER45, GEA90 e GER90 dias, média e desvio padrão.	65
Tabela 31 – Comparação dos valores da espessura da bainha de mielina, entre os grupos GNLT 45, GNLT90, GEA45, GER45, GEA90 e GER90 dias, média e desvio padrão.	66
Tabela 32 – Média e desvio padrão da medida da razão G dos grupos 45 dias.	67
Tabela 33 – Média e desvio padrão da medida da razão G dos grupos 90 dias.	68
Tabela 34 – Comparação dos valores da razão G, entre os grupos GNLT 45, GNLT90, GEA45, GER45, GEA90 e GER90 dias, média e desvio padrão.	69
Tabela 35 – Média e desvio padrão da contagem total de fibras nervosas dos grupos 45 dias.	70
Tabela 36 – Média e desvio padrão da contagem total de fibras nervosas dos grupos 90 dias.	71
Tabela 37 – Comparação dos valores da contagem total de fibras nervosas, entre os grupos GNLT 45, GNLT90, GEA45, GER45, GEA90 e GER90 dias, média e desvio padrão.	72
Tabela 38 – Visão geral das médias dos resultados obtidos. IF = índice funcional; MCI = massa corporal inicial; MCF = massa corporal final; AM = amplitude; LA = latência; AFN = área da fibra nervosa; DFN = diâmetro da fibra nervosa; AAX = área do axônio; DAX = diâmetro do axônio; ABM = área da bainha de mielina; EBM = espessura da bainha de mielina; CTFN = contagem total das fibras nervosas; RG = razão G.	75

Sumário

1 INTRODUÇÃO	18
2 OBJETIVOS.....	23
2.1 Objetivo geral	23
3 METODOLOGIA	24
3.1. Animais	24
3.2. Grupos experimentais	24
3.3. Cirurgia	26
3.4. Estimulação elétrica	27
3.5. Análise da marcha – CatWalk	30
3.6. Eletroneuromiografia.....	31
3.7. Peças histológicas e eutanásia	33
3.8. Processamento histológico dos nervos	33
3.9. Digitalização das imagens das lâminas	34
3.10. Morfometria dos nervos	34
3.11. Análise estatística.....	35
4 RESULTADOS.....	36
5 DISCUSSÃO	76
6 CONCLUSÃO.....	81
7 REFERÊNCIAS.....	82
8 ANEXOS.....	90

1 INTRODUÇÃO

A lesão dos nervos periféricos permite um determinado grau de regeneração, em contraste com os axônios do sistema nervoso central, que não conseguem se regenerar. As células de Schwann no coto desnervado distalmente à lesão, fornecem o apoio essencial para a regeneração das fibras nervosas do sistema nervoso periférico em contraste com as células gliais do sistema nervoso central, os oligodendrócitos, que não conseguem fornecer este apoio (FENRICH & GORDON, 2004). No entanto, a recuperação da função após lesões de nervos periféricos em humanos é frequentemente decepcionante (FU & GORDON, 1997).

A degeneração crônica das células de Schwann, durante a regeneração do nervo em relação à distância e o tempo de recuperação, é um dos principais contribuintes para os resultados funcionais escassos nas lesões dos nervos periféricos (SULAIMAN *et al.*, 2011). A suplementação exógena de drogas neurotróficas pode restaurar a capacidade regenerativa dos nervos cronicamente desnervados. No entanto, esses efeitos são dose-dependentes, e precisam ser mais investigados (BOYD & GORDON, 2002; WOOD *et al.*, 2012).

Lesões nervosas periféricas podem levar a perda funcional importante para o paciente. Assim, muitas pesquisas buscam aprimorar técnicas cirúrgicas e tratamentos pós-cirúrgicos com a finalidade de otimizar a função do paciente (SATO, 2005).

Os nervos periféricos estão sujeitos a doenças inflamatórias, traumáticas, metabólicas, tóxicas, genéticas e neoplásicas (GIROLAMI, 2000) e essas doenças levam a diferentes tipos e graus de lesões (POLITIS, 1982; LUNDBORG, 2000).

Nos ambientes clínicos, as lesões dos nervos periféricos são bastante comuns (SUNDERLAND, 1978; TAYLOR *et al.*, 2008). Apesar de técnicas cirúrgicas meticulosas e muitos métodos de reparação, o resultado funcional completo, especialmente no que diz respeito à função motora, raramente é conseguido. Esses resultados funcionais pobres após o reparo de lesões nervosas têm sido atribuídos a dois fatores principais: em primeiro lugar, o coto proximal do nervo lesado cresce lentamente entre os locais de coaptação e, em segundo lugar, existe um período de

tempo relativamente curto para os axônios em regeneração poderem se recuperar (GORDON, *et al.*, 2009).

As lesões nervosas periféricas foram classificadas por Seddon (1943) em três tipos: a neuropraxia, axonotmese e neurotmese. A neuropraxia é caracterizada unicamente por interrupção da condução nervosa por uma lesão da bainha de mielina do nervo (DOURADO *et al.*, 2003). Envolve um bloqueio fisiológico da condução nervosa, com ou sem anormalidades histológicas presentes, que podem incluir a desmielinização segmentar sem anormalidades axonais, com recuperação rápida e completa (MAZZER *et al.*, 2006). A axonotmese é caracterizada por um bloqueio da condução nervosa devido à perda de continuidade do axônio (DOURADO *et al.*, 2003). A lesão do axônio envolve a presença do processo de degeneração Walleriana distal à lesão, sendo a recuperação funcional associada com o crescimento axonal no interior do endoneuro individual intacto (MAZZER *et al.*, 2006). A axonotmese ocorre mais comumente associada a lesões por esmagamento e fraturas ósseas por deslocamento e a recuperação total é menos provável. Ocorre degeneração Walleriana e regeneração, cujo processo é dependente, em parte, da preservação do tecido conjuntivo. Na neurotmese há perda total da função axonal, com rompimento do tubo neural. Nesta lesão ocorre interrupção total da condução nervosa, não podendo, no entanto, realizar o teste de velocidade de condução, pois não pode ser promovida uma resposta evocada (MURRAY, 2005).

Diferentemente da classificação de Seddon (1943), descrita anteriormente, a classificação de Sunderland (1978) é dividida em 5 tipos de lesão: lesão de primeiro grau (bloqueio de condução = neuropraxia), lesão de segundo grau (lesão axonal, com endoneuro intacto = axonotmese), lesão de terceiro grau – subdividida em 3 (lesão axonal, com ruptura do endoneuro e preservação do perineuro e epineuro; lesão axonal, com ruptura do perineuro e preservação do epineuro; ruptura de todo tronco nervoso = neurotmese).

No reparo de lesões de nervos periféricos, quando se dispõem dos cotos proximais e distais, a neurorrafia término-terminal é, frequentemente, utilizada para fazer a união dos cotos do nervo lesado por meio de uma sutura (ROVAK, 2001).

Estratégias alternativas têm dado apoio endógeno às células de Schwann desnervadas no coto do nervo distal, usando axônios de um nervo doador ileso. Foi demonstrado que vários isoenxertos nervosos, chamados de pontes “lado-a-lado, permitiram aos axônios se regenerarem através de janelas no epineuro de um nervo doador intacto, melhorando a função motora e sensorial (LADAK *et al.*, 2011; HENDRY *et al.*, 2015).

Viterbo e Viterbo (1992) propuseram a neurorrafia látero-terminal sem lesão no nervo doador e, até mesmo, sem a remoção do epineuro (VITERBO *et al.*, 1994a,b). Com trabalho experimental em ratos (VITERBO, 1992), realizou a secção do nervo fibular, que inerva o músculo tibial cranial 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. Foi grande a contribuição desta técnica, pois, a partir dela, qualquer nervo pode ser utilizado como nervo doador sem prejuízos para este ou para as estruturas por ele inervadas. Em nervos mais espessos, é recomendado que a janela epiperineural seja realizada (VITERBO *et al.*, 1998).

As fibras musculares atrofiam com mais intensidade nos períodos iniciais de desnervação. Nos primeiros 60 dias, a área de secção transversal média de uma fibra pode sofrer redução de até 70%. Durante o processo de desnervação, a percentagem de diminuição do diâmetro da fibra muscular supera a percentagem da perda de peso de todo o músculo. Esta diferença entre redução de peso e de calibre se explica por um aumento relativo no volume de tecido conjuntivo, que compensa de alguma forma a maior atrofia das fibras (SUNDERLAND, 1950).

A estimulação elétrica com finalidade regenerativa, embora controvertida (NEMETH, 1982; WILLIAMS, 1996; IÑIGO, 1998; SOUZA, 2001; KOTWAL, 2001; CARVALHO, 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.

Majed *et al.*, (2000b) relataram que estimulação elétrica acelerou a regeneração nervosa após o reparo imediato do nervo. Esta constatação foi confirmada muitas vezes em roedores, e em vários dos estudos foi demonstrado

também que a reinervação do alvo permitiu o retorno funcional em membros posteriores e em músculos faciais (NIX & HOPF, 1983; AL-MAJED *et al.*, 2000a, 2000b; BRUSHART *et al.*, 2005; FRANZ *et al.*, 2005; EBERHARDT *et al.*, 2006; AHLBORN *et al.*, 2007; ENGLISH *et al.*, 2007; GEREMIA *et al.*, 2007; LU *et al.*, 2008; HETZLER *et al.*, 2008; ASENSIO-PINILLA *et al.*, 2009; HUANG *et al.*, 2009, 2010, 2013; SHARMA *et al.*, 2009, 2010b; ALRASHDAN *et al.*, 2010; SINGH *et al.*, 2012). Mais recentemente, a estimulação elétrica foi usada para acelerar a reinervação muscular da mão humana (GORDON *et al.*, 2010).

Atualmente, já é aceita e demonstrada em estudos experimentais e clínicos o uso da estimulação elétrica para aumentar o desempenho do músculo esquelético (SOO, 1988; RUFFIN, 1993; SNYDER-MACKLER, 1994).

A estimulação elétrica é usada intensamente na fisioterapia, e a Corrente Russa tem sido indicada para o aumento da força muscular. Corrente Russa é uma corrente alternada com uma frequência de 2500Hz, com *burst* de 4 milissegundos e com ciclo de trabalho de 50%. O estímulo foi aplicado por 10 segundos de contração, seguido por 50 segundos de relaxamento ou descanso, com um tempo de tratamento recomendado de 10 minutos por sessão de estimulação. Este regime de aplicação da corrente é conhecido como “10/50/10” (SELKOWITZ, 1989).

A Corrente Aussie, é uma corrente elétrica, alternada com frequência de 1000Hz, semelhante à Corrente Russa. A diferença está no valor da corrente portadora (*carrier*), bem como no formato da onda. A Corrente Russa é formada a partir de *burst* longo (4 milissegundo). Já a Corrente Aussie apresenta duração de *burst* curto (2 milissegundos). Estudos sugerem que para uma estimulação motora intensa e eficiente, com desconforto mínimo, a frequência de 1000Hz deve ser utilizada combinada com a modulação em *burst* com duração de 2 ms (WARD, 2007). A decisão de se utilizar corrente de média frequência se deve ao fato de que elas não sofrem tanto com a impedância da pele para atingir o tecido muscular, enquanto que, as correntes de baixa frequência têm maior dificuldade para atingir tecidos mais profundos.

Pesquisas com o nervo isquiático de ratos, em que o animal é submetido à análise da marcha, 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 (DE MEDINACELLI, 1982; BAIN, 1989; SATO, 2005).

A complexidade dos processos envolvidos na regeneração de lesões nervosas periféricas compõe um verdadeiro desafio para a ciência. Os pesquisadores atuais têm se empenhado no aprofundamento dos conhecimentos fisiológicos, anatômicos, celulares e moleculares que interagem neste processo, com vistas a aumentar a probabilidade de resultados clínicos satisfatórios e alcançar a completa recuperação funcional (SILVA & CAMARGO, 2010).

Considerando que a estimulação elétrica está sendo considerada uma modalidade de tratamento promissora, e que no mercado atual existem duas correntes elétricas diferentes (Corrente Aussie e Corrente Russa) que realizam contração muscular, levantamos a seguinte questão: Qual das correntes tem maior eficiência na regeneração nervosa?

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo

- Comparar a eficiência da estimulação elétrica com correntes de média frequência (Corrente Russa e Corrente Aussie) na regeneração nervosa periférica após neurografia látero-terminal do nervo fibular comum de ratos.

3 METODOLOGIA

Este trabalho foi realizado no Laboratório Experimental da Faculdade de Medicina de Botucatu (eutanásia dos animais, coleta das amostras de tecido, confecção das peças histológicas, análise da marcha com *CatWalk* e eletroneuromiografia) e na Universidade Sagrado do Coração – Bauru (seleção dos animais, cirurgia, aplicação da estimulação elétrica, confecção das lâminas e morfometria).

3.1. Animais

Todos os procedimentos realizados foram de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), que foi aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Medicina de Botucatu, sob o número 1043/2013.

Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade do Sagrado Coração – USC/BAURU. Foram utilizados 120 ratos (*Rattus norvegicus*) da linhagem *Wistar*, machos, com 80 dias de vida. Os animais foram distribuídos em 11 grupos.

3.2. Grupos experimentais

Os ratos foram agrupados em: Grupo Controle Inicial (GCI) com 8 animais; Grupo Neurografia Látero-Terminal 45 (GNLT45) com 8 animais; Grupo Neurografia Látero-Terminal com Estimulação Aussie 45 dias (GEA45) com 16 animais; Grupo Neurografia Látero-Terminal com Estimulação Russa 45 dias (GER45) com 16 animais; Grupo Desnervado 45 dias (GD45) com 8 animais; Grupo Controle Final 45 (GCF45) com 8 animais; Grupo Neurografia Látero-Terminal 90 (GNLT90) com 8 animais; Grupo Neurografia Látero-Terminal com Estimulação Aussie 90 dias (GEA90) com 16 animais; Grupo Neurografia Látero-Terminal com Estimulação Russa 90 dias (GER90) com 16 animais; Grupo Desnervado 90 dias (GD90) com 8 animais; Grupo Controle Final 90 (GCF90) com 8 animais.

Nos Grupos (GD45 e GD90), com 8 animais, o nervo fibular foi seccionado e seus cotos 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 reinervação motora (Fig 1).

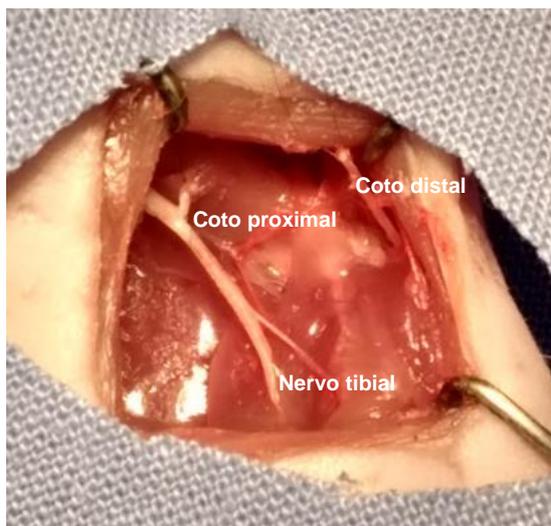


Figura 1- Foto da desnervação, sutura do coto proximal na musculatura adjacente e do coto distal na tela subcutânea.

Nos Grupos (GEA45 e GEA90) e (GER45 e GER90) com 16 animais cada, o nervo fibular foi seccionado e seu coto proximal encurvado medialmente 100 graus. A musculatura adjacente foi transfixada e suturada na face superficial dessa musculatura, impedindo dessa forma, a regeneração espontânea. O coto distal do nervo fibular foi encurvado, aproximadamente 80 graus, e suturado lateralmente ao nervo tibial. Após a cirurgia, os animais foram estimulados com as Correntes Aussie e Russa, no músculo tibial cranial (Fig. 2).

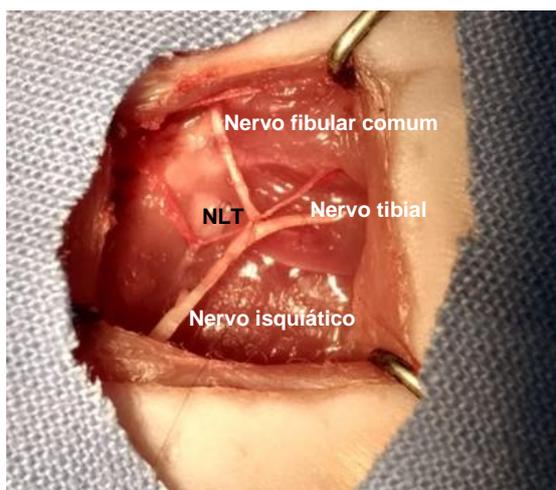


Figura 2- Foto da Neurorrafia látero-terminal, sutura do nervo fibular comum na face lateral do nervo tibial.

3.3. Cirurgia

Todos os procedimentos cirúrgicos e de coleta foram realizados pelo pesquisador, padronizando-se dessa forma, o método. Para cada procedimento cirúrgico, os animais foram anestesiados com ketamina (80mg/Kg) e xilasina (30mg/Kg) intramuscular.

A xilazina provoca nos animais um estado de sedação e um alto grau de analgesia, cuja profundidade depende da dose utilizada. Também produz um acentuado relaxamento muscular generalizado. É uma droga pré-anestésica alfa-2-agonista, usada frequentemente na medicina veterinária, com efeito similar quando administrada por via endovenosa ou intramuscular e induz rapidamente à sedação. A analgesia é produzida por estimulação dos alfarreceptores periféricos e centrais. A xilazina não produz excitação e apresenta grande poder anestésico reversível que se caracteriza pelo bloqueio do impulso nervoso (FILHO *et al.*, 2000).

A ketamina promove um estado de inconsciência denominado de anestesia “dissociativa”, na qual, há uma aparente interrupção seletiva na condução de alguns estímulos ao cérebro, levando a uma diminuição da resposta ao sistema nervoso central. A analgesia da ketamina é atribuída ao bloqueio da transmissão do impulso doloroso ao tálamo e centros dolorosos localizados em áreas corticais. É referida na literatura como “anestésico dissociativo”, devido a uma perda sensorial marcante e analgesia, assim como amnésia e paralisia do movimento, sem perda real da consciência, ocorrendo intensa sensação de dissociação do meio (RANG *et al.*, 2004; MORGAN *et al.*, 2004).

Foi realizada uma incisão de 2 a 3 cm longitudinalmente ao maior eixo do membro, comprometendo pele e tecido subcutâneo com posterior divulsão da musculatura. Após, foi realizado o procedimento, de acordo com cada grupo experimental.

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

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. 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 quatro animais cada, em temperatura controlada ($25 \pm 2^{\circ}$ C), ciclo claro-escuro de 12 horas, com ração e água *ad libitum*, até o momento da eutanásia.

No pós-operatório os animais foram observados quanto à dor, considerando os seguintes sinais: vocalização, piloereção, postura encurvada, hipotermia, descarga ocular, ato de lambe-se, maior agressividade, relutância em interagir, alteração no consumo de água e alimentos e por último, a perda de peso. A analgesia pós-operatória foi feita com acetaminofenol (paracetamol) 2 mg/mL de água, na água do bebedouro a cada 4 horas na água oferecida, durante uma semana.

3.4. Protocolo de estimulação elétrica

A estimulação elétrica com Corrente Aussie teve início com cinco dias de pós-operatório. Os animais dos grupos (GEA45 e GEA90) foram submetidos a três sessões semanais, com dias alternados (segunda, quarta e sexta-feira), no período da tarde, durante os 45 e 90 dias, totalizando 18 e 36 sessões respectivamente. Receberam estimulação elétrica no músculo tibial cranial, com Corrente Aussie, com frequência portadora (carrier) de 1000 Hz, sincronizada, modulação em 30 Hz (fibras musculares do tipo I) e 100 Hz (fibras musculares do tipo II), com duração do pulso de 2 milissegundos, tempo de contração de 10 segundos com 20 segundos de relaxamento, durante 10 minutos cada modulação. A intensidade da corrente elétrica foi aquela suficiente para promover a contração muscular, sendo padronizada em 40 miliamperes (mA). Foi utilizado estimulador elétrico Neurodyn® 4 canais da empresa Ibramed (Fig. 3).



Figura 3 – Foto do Neurodyn – Corrente Aussie.

A estimulação elétrica com Corrente Russa teve início com cinco dias de pós-operatório. Os animais dos grupos (GER45 e GER90) foram submetidos a três sessões semanais, com dias alternados (segunda, quarta e sexta-feira), no período da tarde, durante os 45 e 90 dias, totalizando 18 e 36 sessões respectivamente. Receberam estimulação elétrica no músculo tibial cranial com Corrente Russa, com frequência portadora (carrier) de 2500 Hz, sincronizada, modulação em 30 Hz (fibras musculares tipo I) e 100 Hz (fibras musculares tipo II) com duração de *burst* de 4 milissegundos, tempo de contração de 10 segundos com 20 segundos de relaxamento, durante 10 minutos cada modulação. A corrente inicial foi aquela suficiente para promover a contração muscular, sendo padronizada em 40 miliampères (mA). Foi utilizado estimulador elétrico Endophasys® da empresa KLD (Fig. 4).



Figura 4 – Foto do Endophasys – Corrente Russa.

Os animais foram estimulados acordados e sem anestesia. Para isso foi utilizada uma cápsula metálica com abertura posterior para a cauda e duas aberturas laterais para fixação dos membros posteriores. Após essa imobilização, os eletrodos de um centímetro quadrado de área foram fixados sobre o ventre do músculo tibial cranial. Estas cápsulas foram utilizadas para evitar anestesia de repetição. Para aplicação da estimulação elétrica foram utilizados eletrodos autoadesivos (Fig. 5).

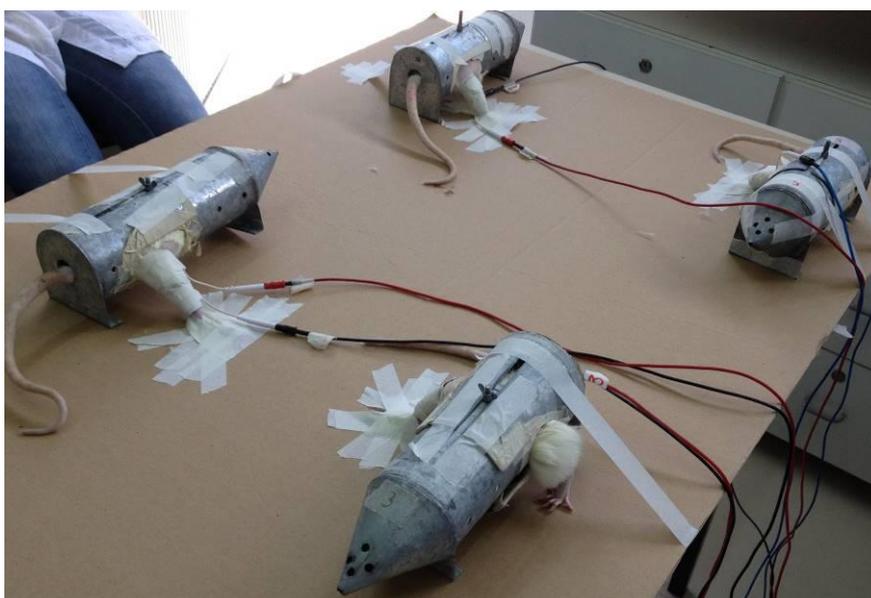


Figura 5 – Foto dos animais encapsulados para estimulação elétrica.

3.5. Análise da marcha – *CatWalk*

Para o teste *CatWalk*, os animais foram colocados sobre uma plataforma de vidro iluminada, de maneira que nos locais de contato das patas com a plataforma é refletido um sinal luminoso de área e intensidade proporcionais à área de contato e à pressão exercida pela pata. A plataforma esteve monitorada com uma câmara de vídeo colocada sob a mesma e conectada a um computador equipado com um programa de aquisição de imagem.



Figura 6 – Foto do *CatWalk*.

Por meio do *CatWalk* realizou-se o estudo da marcha do animal, de forma estática e dinâmica, baseadas em duração, orientação e coordenação dos movimentos entre as patas.

Os critérios adotados para que uma caminhada fosse considerada adequada para o experimento foram:

1. que a caminhada durasse ao menos 5 segundos;
2. que a caminhada não excedesse 10 segundos em tempo;
3. que o número mínimo de pegadas fosse de quatro, completas;
4. pegadas incompletas nesse tempo e nesse percurso foram descartadas;
5. a variação na velocidade permitida foi de 60%.

Esses critérios são pré-estabelecidos no programa do *CatWalk* e podem ser mudados conforme a conveniência de cada experimento. A intensidade do sinal

depende da área do contato plantar em contato com a plataforma e aumenta com a pressão aplicada pela pegada.

Para o cálculo do índice funcional do nervo fibular (IFF), nas pegadas foram medidos os parâmetros: E: experimental; N: normal; PL: comprimento da pata; TS: espalhar total dos dedos; IT: espalhar total dos dedos intermediários. Esses mesmos dados foram lançados na fórmula de Bain *et al.*, (1989), os quais forneceram o índice funcional do fibular (IFF):

$$\text{IFF} = 174,9 \times (\text{EPL} - \text{NPL} + 80,3 / \text{NPL}) \times (\text{ETS} - \text{NTS} - 13,4 / \text{NTS})$$

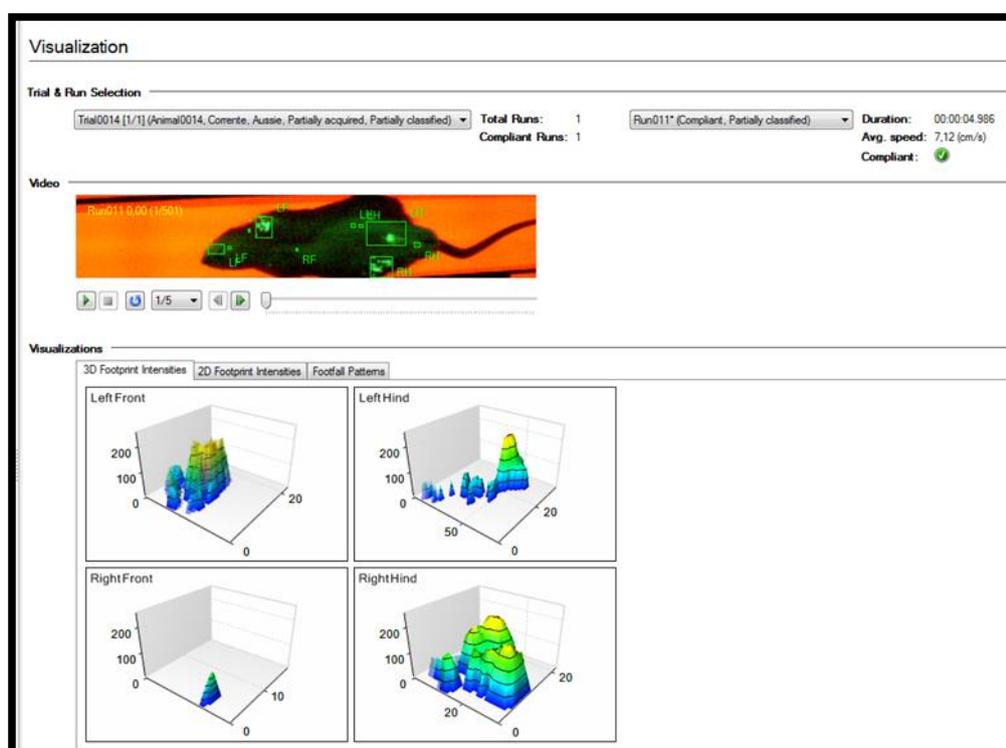


Figura 7 – Foto do registro da caminhada do animal no CatWalk.

3.6. Eletroneuromiografia

Para a realização do teste eletrofisiológico, a temperatura ambiente foi mantida em torno de 25° C. O teste eletrofisiológico foi realizado antes da eutanásia dos animais.

Após anestesia com ketamina (80mg/Kg) e xilasina (30mg/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.



Figura 8 – Foto do eletroneuromiógrafo.

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



Figura 9 – Foto do teste eletroneurofisiológico.

Os eletrodos registraram a amplitude e a latência do potencial de ação da fibra nervosa. Foram realizados três conjuntos de medidas para cada animal com o nervo tibial intacto e mais três com a porção do nervo tibial seccionado distalmente à NTL, sendo escolhido um conjunto com o nervo tibial intacto e um conjunto com o nervo tibial seccionado, aquele que apresentava a maior amplitude registrada.

A avaliação das propriedades funcionais do músculo foi feita por meio de estímulos elétricos deflagrados por um eletrodo bipolar, especialmente desenvolvido para este propósito, cujo cátodo e ânodo estavam distantes 2 milímetros. 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 μ s. A intensidade de estímulo utilizada, constante em todos os animais, foi de 5,1 volts. Os dados de amplitude e latência foram comparados entre os grupos. Foi utilizado eletromiógrafo da marca Sapphire II 4ME.

3.7. Peças histológicas e eutanásia

Após a realização dos procedimentos cirúrgicos, os animais receberam dose letal de pentobarbital sódico (150mg/kg), administrado intraperitonealmente.

Os segmentos de nervo coletados foram fixados e mantidos em solução de Karnovisk e refrigerados a 4° C até o momento do processamento histológico.

3.8. Processamento histológico dos nervos

Após fixação por período superior a 24 horas em solução de Karnovisk, 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 (1:1) 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 historresina 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 historresina 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 1,6x, e lâmina Gillette®. Após o corte, a lâmina histológica foi aquecida sobre uma chapa a 45° C para secagem e pré-aderência. A seguir, a lâmina histológica permaneceu 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.

3.9. Digitalização das imagens das lâminas

As imagens foram capturadas por um *Scanner Image-Pró® Plus* versão 5.1.2 for Windows, microscópio Nikon Eclipse 80i, com câmera *Quimaging Micropublisher 3.3 RTV*.



Figura 10 – Foto do microscópio Nikon Eclipse 80i, com câmera Quimaging Micropublisher 3.3 RTV.

Foram selecionadas, aleatoriamente, 5 imagens de diferentes campos de um mesmo corte histológico (uma de cada quadrante, mais o centro) de cada lâmina e foi utilizado aumento de 400 vezes (ocular de 10x e objetiva de 40x) para a análise das fibras nervosas.

3.10. Morfometria dos nervos

As imagens digitalizadas e salvas foram analisadas por meio de medidas de área da fibra nervosa, diâmetro menor da fibra nervosa, área do axônio, diâmetro menor do axônio, e espessura e área da bainha de mielina, contagem total das fibras nervosas e a razão G. Foram contadas 220 fibras nervosas e marcadas da direita para a esquerda na linha horizontal.

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

Foram realizadas as medidas das áreas e diâmetros menores das fibras nervosas e dos axônios. As medidas das áreas das bainhas de mielina foram obtidas subtraindo-se a área axonal da área da fibra nervosa e a espessura da bainha de mielina foi obtida subtraindo-se o diâmetro menor do axônio do diâmetro menor da fibra.

3.11. Análise estatística

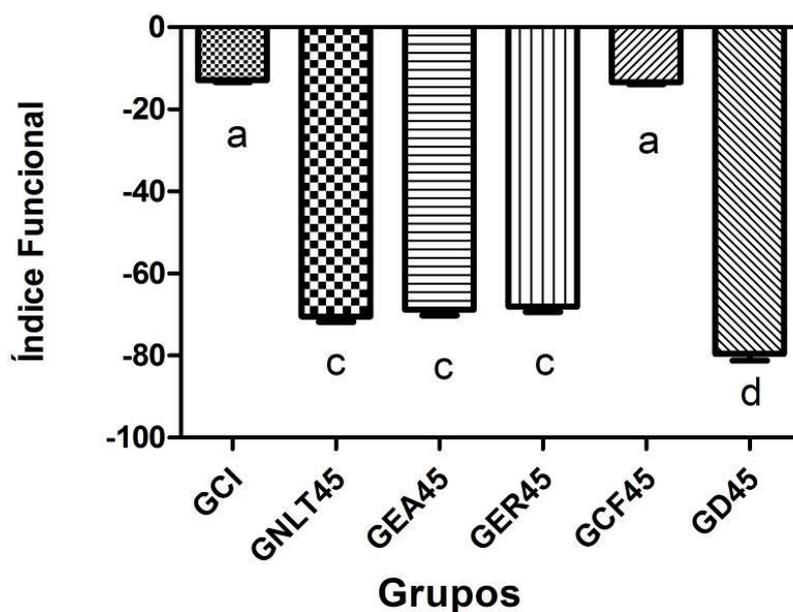
A análise estatística foi efetuada por meio do *software Prisma Pad* 5.1. A normalidade da distribuição dos dados foi feita pelo teste de *Shapiro-Wilk*. Para avaliação entre os grupos, aplicou-se o teste ANOVA *One-Way* com *post hoc* de *Tukey*, considerando a distribuição normal (média \pm desvio padrão). O nível de significância considerado foi de 5%.

4 RESULTADOS

4.1 Análise Funcional

Os resultados das avaliações realizadas por meio do *CatWalk*, para os grupos 45 dias estão apresentados no gráfico abaixo.

Figura 11 – Gráfico dos resultados do índice funcional, após aplicação das correntes elétricas nos grupos 45 dias. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes ($p \leq 0,05$).



GCI=GCF45>(GNLT45=GEA45=GER45) >GD45

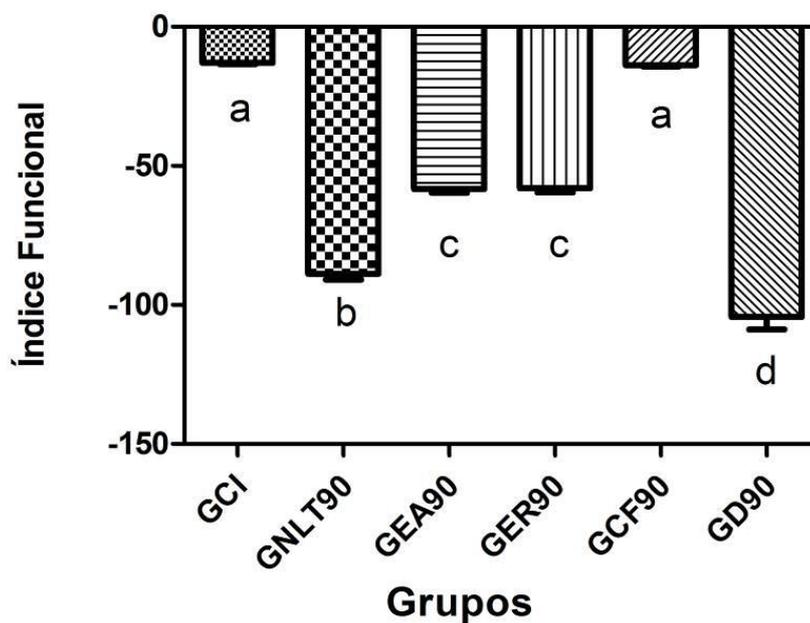
Tabela 1 – Resultados da média e desvio padrão do índice funcional após aplicação das correntes, nos grupos 45 dias.

Grupos	Média	DP
GCI	-12,91 ^a	±1,49
GNLT45	-70,50 ^c	±4,23
GEA45	-68,81 ^c	±4,37
GER45	-68,01 ^c	±4,23
GCF45	-13,40 ^a	±1,50
GD45	-79,58 ^d	±5,16

GCI=GCF45>(GNLT45=GEA45=GER45) >GD45

Na tabela 1, pode ser observado que os grupos GNLT45, GEA45 e GER45 foram os grupos que mais se aproximaram dos grupos GCI e GCF45, porém não apresentando diferenças estatisticamente significantes entre eles.

Figura 12 – Gráfico dos resultados do índice funcional, após aplicação das correntes nos grupos 90 dias. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes ($p \leq 0,05$).



GCI=GCF90>(GEA90=GER90) >GNLT90>GD90

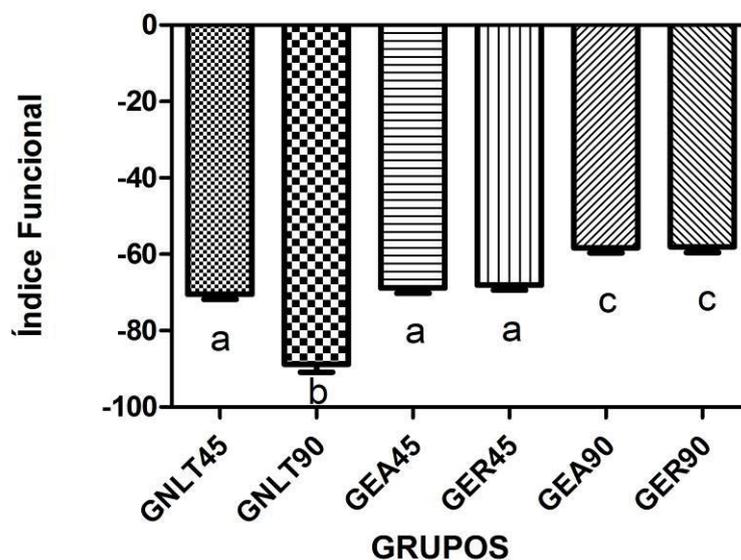
Tabela 2 – Resultados da média e desvio padrão do índice funcional após aplicação das correntes, nos grupos 90 dias.

Grupos	Média	DP
GCI	-12,91 ^a	±1,49
GNLT90	-88,81 ^b	±6,60
GEA90	-58,29 ^c	±4,23
GER90	-58,04 ^c	±4,69
GCF90	-13,84 ^a	±1,45
GD90	-104,32 ^d	±14,00

GCI=GCF90>(GEA90=GER90) >GNLT90>GD90

Observa-se na tabela 2, que os resultados do índice funcional dos grupos GEA90 e GER90 apresentaram diferenças estatisticamente significantes, quando comparados com os resultados do grupo GNLT90, GCI, GCF90 e GD90, no entanto, não houve diferença entre eles.

Figura 13 – Comparação do índice funcional dos animais após 45 e 90 dias de aplicação das correntes nos grupos GEA45 e GEA90, GER45 e GER90. Letras diferentes entre si indicam diferenças estatisticamente significativas ($p \leq 0,05$).



(GEA90=GER90)>(GNLT45=GEA45=GER45)>GNLT90

Tabela 3 – Comparação dos valores do índice funcional, na avaliação da marcha, entre os grupos GNLT 45, GNLT90, GEA45, GEA90, GER45 e GER90 dias, média e desvio padrão.

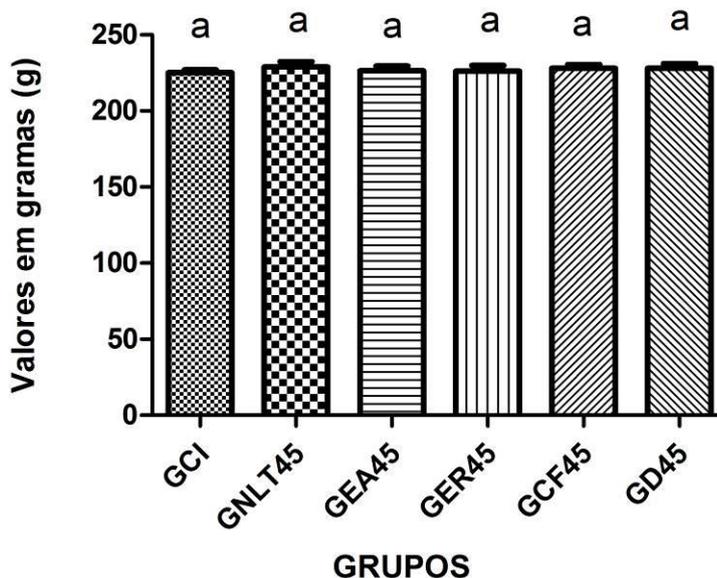
Grupos	Média	DP
GNLT45	-70,50 ^a	±4,23
GNLT90	-88,81 ^b	±6,60
GEA45	-68,81 ^a	±4,37
GER45	-68,01 ^a	±4,23
GEA90	-58,29 ^c	±4,23
GER90	-58,04 ^c	±4,69

(GEA45=GEA90)>(GEA45=GER45)

Observa-se na tabela 3 que houve diferença estatisticamente significativa, apenas quando se compara os momentos da pesquisa Grupo 45 com Grupo 90, não dependente dos tipos de correntes.

4.2 – Massa Corporal

Figura 14 – Gráfico dos valores da massa corporal inicial dos animais (em gramas) dos grupos 45 dias. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes ($p \leq 0,05$).



GCI=GNLT45=GEA45=GER45=GCF45=GD45

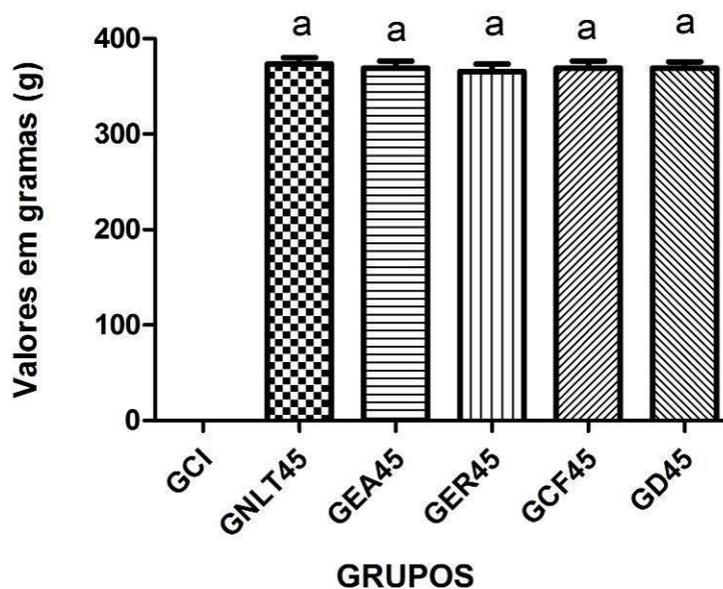
Tabela 4 – Média e desvio padrão da massa corporal inicial dos animais (em gramas) dos grupos 45 dias.

Grupos	Média	DP
GCI	225,00 ^a	±6,24
GNLT45	228,90 ^a	±11,17
GEA45	226,40 ^a	±10,00
GER45	226,10 ^a	±12,05
GCF45	228,00 ^a	±8,12
GD45	228,00 ^a	±9,82

GCI=GNLT45=GEA45=GER45=GCF45=GD45

Pode-se observar na tabela 4 que os resultados da massa corporal inicial, não apresentaram diferenças estatisticamente significantes entre os grupos estudados.

Figura 15 – Gráfico dos valores da massa corporal final dos animais (em gramas) dos grupos 45 dias. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes ($p \leq 0,05$).



GNLT45=GEA45=GER45=GCF45=GD45

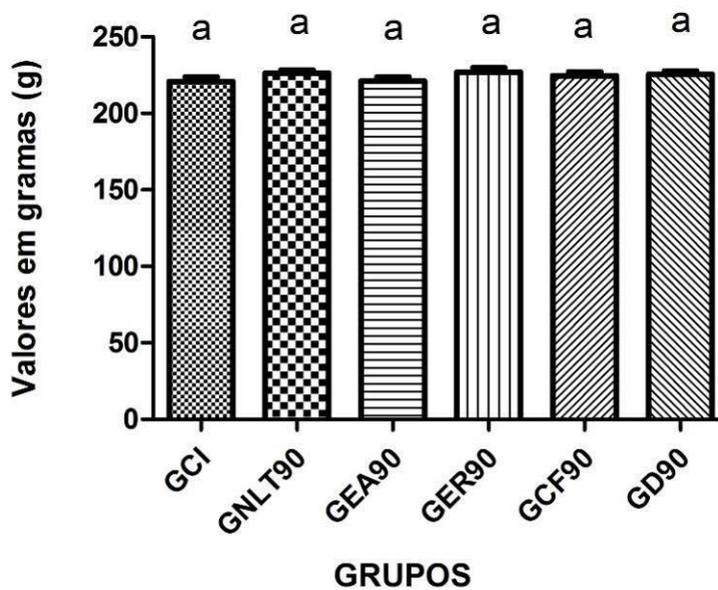
Tabela 5 – Média e desvio padrão da massa corporal final dos animais (em gramas) dos grupos 45 dias.

Grupos	Média	DP
GCI	0,00	±0,00
GNLT45	373,60 ^a	±20,90
GEA45	369,30 ^a	±23,29
GER45	365,40 ^a	±25,17
GCF45	369,00 ^a	±23,95
GD45	369,30 ^a	±21,07

GNLT45=GEA45=GER45=GCF45=GD45

Observa-se na tabela 5 que não houve diferença estatisticamente significantes entre os pesos finais dos animais dos grupos estudados.

Figura 16 – Gráfico dos valores da massa corporal inicial dos animais (em gramas) dos grupos 90 dias. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes ($p \leq 0,05$).



GCI=GNLT90=GEA90=GER90=GCF90=GD90

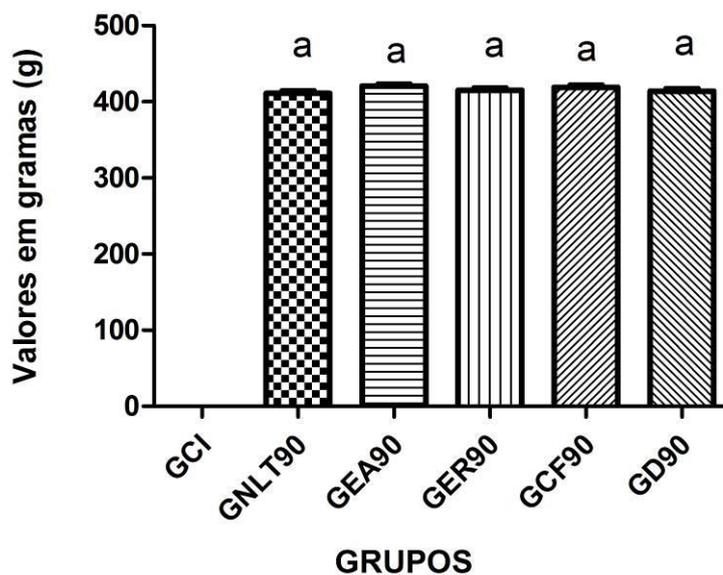
Tabela 6 – Média e desvio padrão da massa corporal inicial dos animais (em gramas) dos grupos 90 dias.

Grupos	Média	DP
GCI	225,00 ^a	±9,59
GNLT90	226,30 ^a	±6,62
GEA90	221,10 ^a	±8,88
GER90	226,90 ^a	±9,43
GCF90	224,60 ^a	±8,21
GD90	225,50 ^a	±7,03

GCI=GNLT90=GEA90=GER90=GCF90=GD90

Observa-se na tabela 6 que não houve diferença estatisticamente significantes entre os pesos iniciais dos animais dos grupos estudados.

Figura 17 – Gráfico dos valores da massa corporal final dos animais (em gramas) dos grupos 90 dias. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes ($p \leq 0,05$).



GNLT90=GEA90=GER90=GCF90=GD90

Tabela 7 – Média e desvio padrão da massa corporal final dos animais (em gramas) dos grupos 90 dias.

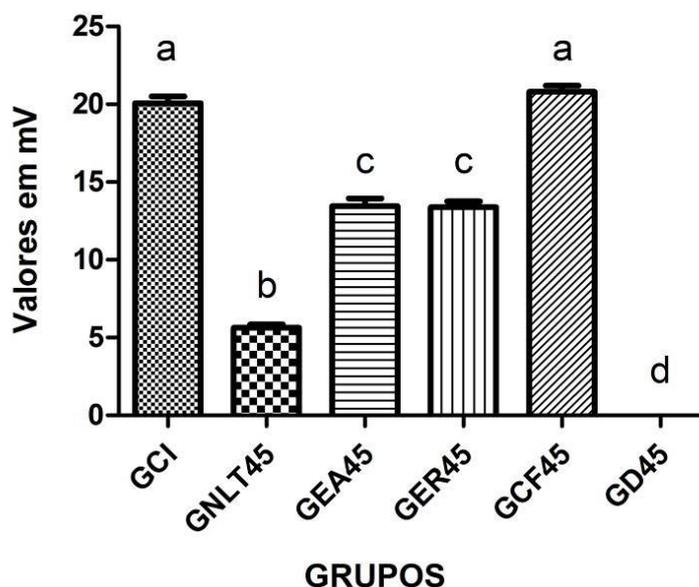
Grupos	Média	DP
GCI	0,00	±0,00
GNLT90	411,20 ^a	±10,44
GEA90	420,60 ^a	±8,53
GER90	415,10 ^a	±9,87
GCF90	419,00 ^a	±9,63
GD90	414,00 ^a	±9,85

GNLT90=GEA90=GER90=GCF90=GD90

Observa-se na tabela 7 que não houve diferença estatisticamente significantes entre os pesos finais dos animais dos grupos estudados.

4.3 Análise Eletroneuromiográfica

Figura 18 – Gráfico dos resultados da medida da amplitude (mV) dos animais dos grupos 45 dias. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes ($p \leq 0,05$).



GCI=GCF45>(GEA45=GER45) >GNLT45>GD45

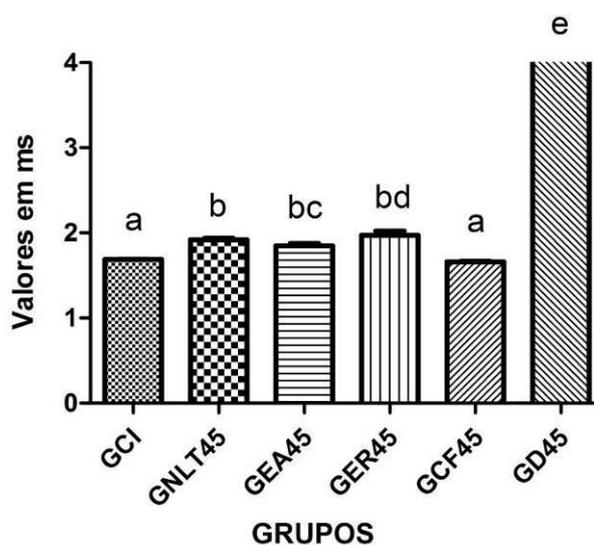
Tabela 8 – Média e desvio padrão da amplitude (mV) dos grupos 45 dias.

Grupos	Média	DP
GCI	20,08 ^a	±1,94
GNLT45	5,64 ^b	±0,89
GEA45	13,45 ^c	±2,14
GER45	13,38 ^c	±1,63
GCF45	18,08 ^a	±1,82
GD45	0,00 ^d	

GCI=GCF45>(GEA45=GER45) >GNLT45>GD45

Pode-se observar na tabela 8 que os resultados da amplitude (mV) dos grupos GEA45 e GER45 não apresentaram diferenças estatisticamente significantes entre si, no entanto, quando comparado com o grupo GNLT45, houve diferença estatisticamente significativa.

Figura 19 – Gráfico dos resultados da medida da latência (ms) dos animais dos grupos 45 dias. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes ($p \leq 0,05$).



(GCI=GCF45)<GEA45 / GNLT45=GEA45/GNLT45=GER45 / GEA45<GER45 /
GD45>GCI,GCF45,GEA45,GNLT45,GER45

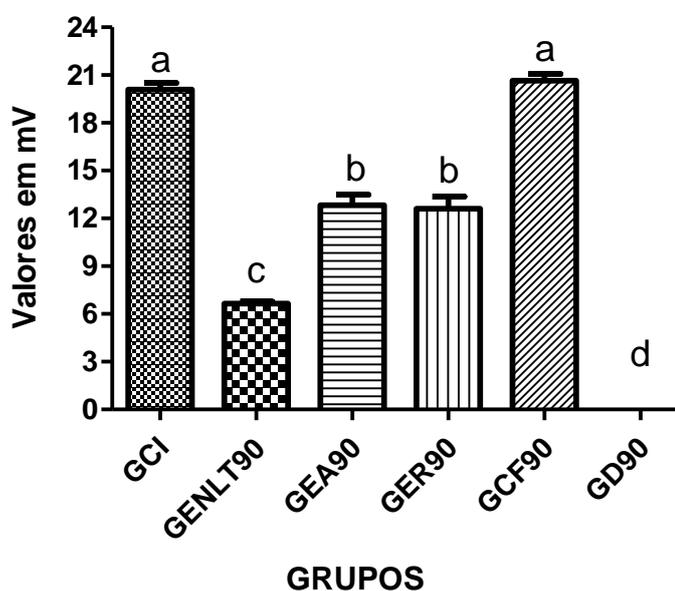
Tabela 9 – Média e desvio padrão da latência (ms) dos grupos 45 dias.

Grupos	Média	DP
GCI	1,69 ^a	±0,03
GNLT45	1,92 ^b	±0,08
GEA45	1,85 ^{bc}	±0,12
GER45	1,97 ^{bd}	±0,22
GCF45	1,66 ^a	±0,04
GD45	10,00 ^e	

(GCI=GCF45)<GEA45 / GNLT45=GEA45/GNLT45=GER45 / GEA45<GER45 /
GD45>GCI,GCF45,GEA45,GNLT45,GER45

Pode-se observar na tabela 9, que em relação a latência, o grupo GNLT 45 não apresentou diferença estatisticamente significativa quando comparado com o grupo GEA45 e GER45, mas quando se compara os grupos GEA45 com o grupo GER45, houve diferença estatisticamente significativa entre eles.

Figura 20 – Gráfico dos resultados da medida da amplitude (mV) dos animais dos grupos 90 dias. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes ($p \leq 0,05$).



GCI=GCF90>(GEA90=GER90)>GNLT90>GD90

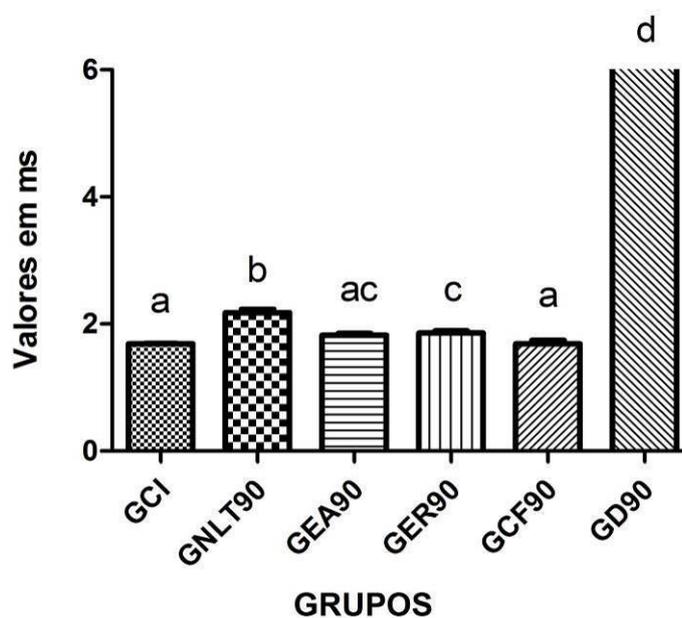
Tabela 10 – Média e desvio padrão da amplitude (mV) dos grupos 90 dias.

Grupos	Média	DP
GCI	20,08 ^a	±1,94
GNLT90	6,64 ^c	±0,55
GEA90	12,84 ^b	±3,22
GER90	12,62 ^b	±3,69
GCF90	20,65 ^a	±2,09
GD90	0,00 ^d	

GCI=GCF90>(GEA90=GER90)>GNLT90>GD90

Pode-se observar na tabela 10 que os resultados da amplitude dos grupos GEA90 e GER90 não apresentaram diferenças estatisticamente significantes entre eles, no entanto, houve diferença estatisticamente significativa quando comparados os resultados com os grupos GCI, GCF90, GNLT90 e GD90.

Figura 21 – Gráfico dos resultados da medida da latência (ms) dos animais dos grupos 90 dias. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes ($p \leq 0,05$).



GCI=GCF90=GEA90 / (GEA90=GER90)<GNLT90<GD90

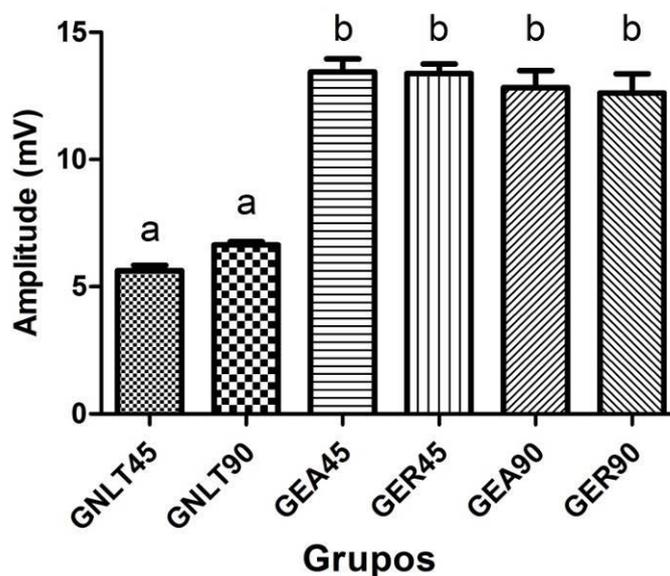
Tabela 11 – Média e desvio padrão da latência (ms) dos grupos 90 dias.

Grupos	Média	DP
GCI	1,69 ^a	±0,02
GNLT90	2,23 ^b	±0,23
GEA90	1,82 ^{ac}	±0,12
GER90	1,98 ^c	±0,05
GCF90	1,69 ^a	±0,04
GD90	10,00 ^d	

GCI=GCF90=GEA90 / (GEA90=GER90)<GNLT90<GD90

Observa-se na tabela 11 que não houve diferença estatisticamente significativa quando comparado os grupos GEA90 e GER90, entretanto, quando se compara os grupos GEA90 e GER90 com os grupos GCI, GNLT90, GCF90 e GD90, houve diferença estatisticamente significativa.

Figura 22 - Gráfico de comparação dos valores da amplitude, entre os grupos GNLT 45, GNLT90, GEA45, GER45, GEA90 e GER90 dias, média e desvio padrão.



(GEA45=GER45=GEA90=GER90)>(GNLT45=GNLT90)

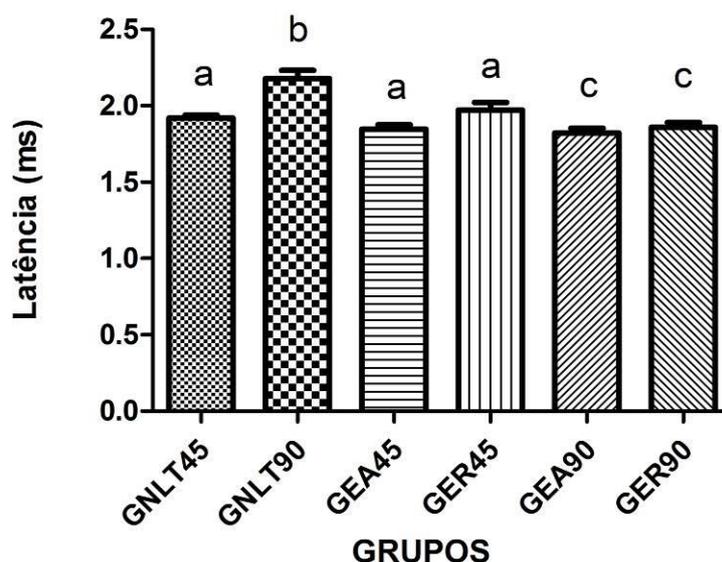
Tabela 12 – Comparação dos valores da amplitude, entre os grupos GNLT 45, GNLT90, GEA45, GER45, GEA90 e GER90 dias, média e desvio padrão.

Grupos	Média	DP
GNLT45	5,64 ^a	±0,89
GNLT90	6,64 ^a	±0,55
GEA45	13,45 ^b	±2,14
GER45	13,38 ^b	±1,63
GEA90	12,84 ^b	±3,22
GER90	12,62 ^b	±3,69

(GEA45=GER45=GEA90=GER90)>(GNLT45=GNLT90)

Pode-se observar na tabela 12 que houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos estimulados e não estimulados. No entanto, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos estimulados, independentemente dos tempos de estimulação.

Figura 23 – Gráfico de comparação dos valores da latência, entre os grupos GNLT 45, GNLT90, GEA45, GER45, GEA90 e GER90 dias, média e desvio padrão.



GNLT90>(GNLT45=GEA45=GER45)>(GEA90=GER90)

Tabela 13 – Comparação dos valores da latência, entre os grupos GNLT 45, GNLT90, GEA45, GER45, GEA90 e GER90 dias, média e desvio padrão.

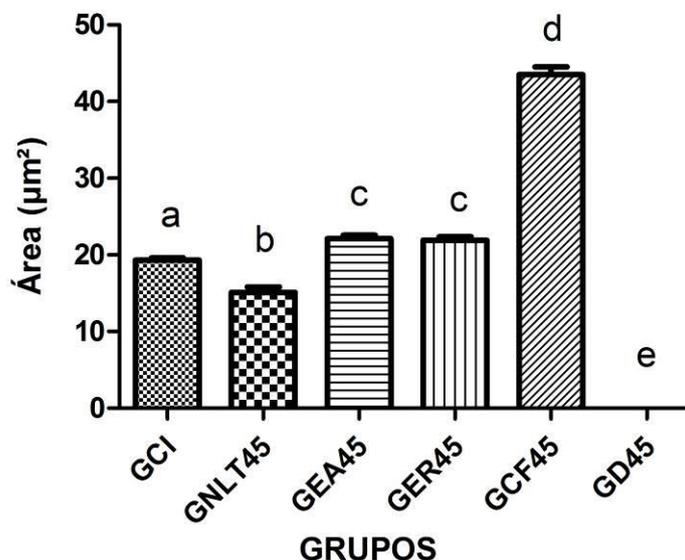
Grupos	Média	DP
GNLT45	1,92 ^a	±0,08
GNLT90	2,23 ^b	±0,23
GEA45	1,85 ^a	±0,11
GER45	1,97 ^a	±0,22
GEA90	1,82 ^c	±0,12
GER90	1,98 ^c	±0,05

GNLT90>(GNLT45=GEA45=GER45)>(GEA90=GER90)

Observa-se na tabela 13 que houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos que foram estimulados por mais tempo, porém, quando se compara a corrente utilizada, não houve diferença estatisticamente significativa, o mesmo acontecendo com o grupo não tratado, mostrando que o tempo foi o diferencial.

4.4 Análise Morfométrica

Figura 24 – Gráfico dos resultados da medida da área das fibras nervosas (μm^2) dos animais dos grupos 45 dias. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes ($p \leq 0,05$).



GCF45>(GEA45=GER45)>GCI>GNLT45>GD45

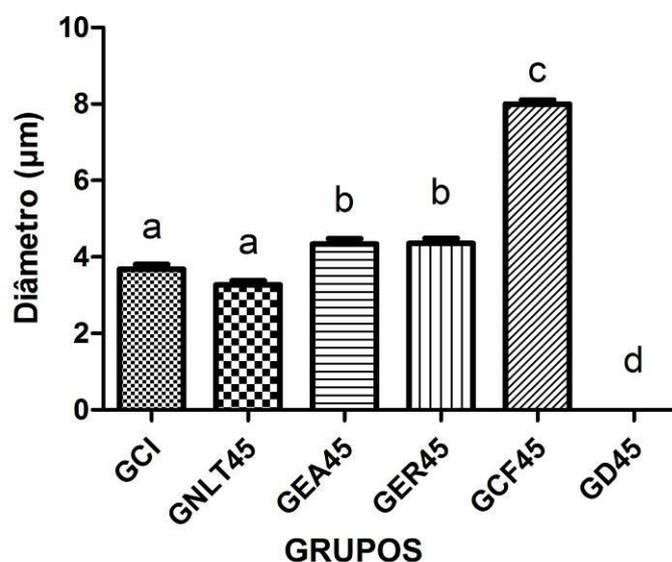
Tabela 14 – Média e desvio padrão da área das fibras nervosas (μm^2) dos grupos 45 dias.

Grupos	Média	DP
GCI	16,80 ^a	±6,47
GNLT45	13,68 ^b	±5,12
GEA45	19,88 ^c	±7,56
GER45	19,27 ^c	±7,33
GCF45	38,53 ^d	±14,66
GD45	0,00 ^e	0,00

GCF45>(GEA45=GER45)>GCI>GNLT45>GD45

Pode ser observado na tabela 14 que os resultados da área das fibras nervosas entre os grupos GEA45 e GER45 não apresentam diferenças estatisticamente significantes entre si, mas, quando comparados os resultados dos grupos GER45 e GER45 com os grupos GCI, GNLT45, GCF45 e GD45, houve diferenças estatisticamente significantes entre eles.

Figura 25 – Gráfico dos resultados da medida do diâmetro das fibras nervosas (μm) dos animais dos grupos 45 dias. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes ($p \leq 0,05$).



GCF45>(GEA45+GER45)>(GCI=GNLT45)>GD45

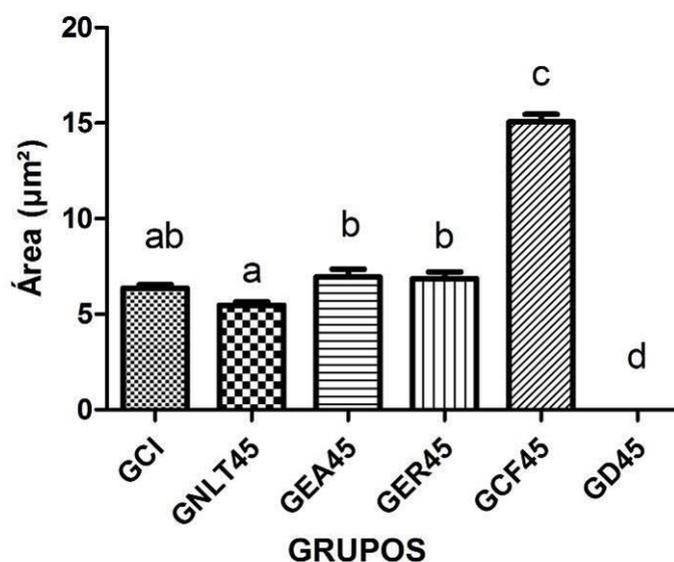
Tabela 15 – Média e desvio padrão do diâmetro das fibras nervosas (μm) dos grupos 45 dias.

Grupos	Média	DP
GCI	3,68 ^a	±0,39
GNLT45	3,27 ^a	±0,35
GEA45	4,34 ^b	±0,45
GER45	4,35 ^b	±0,41
GCF45	7,99 ^c	±0,37
GD45	0,00 ^d	±0,00

GCF45>(GEA45+GER45)>(GCI=GNLT45)>GD45

Observa-se na tabela 15 que os resultados do diâmetro das fibras nervosas entre os grupos GEA45 e GER45 não apresentam diferenças estatisticamente significantes entre si, mas, quando comparados os resultados dos grupos GER45 e GER45 com os grupos GCI, GNLT45, GCF45 e GD45, houve diferenças estatisticamente significantes entre eles.

Figura 26 – Gráfico dos resultados da medida da área dos axônios (μm^2) dos animais dos grupos 45 dias. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes ($p \leq 0,05$).



GCF45>(GEA45=GER45=GCI)>GNLT45>GD45

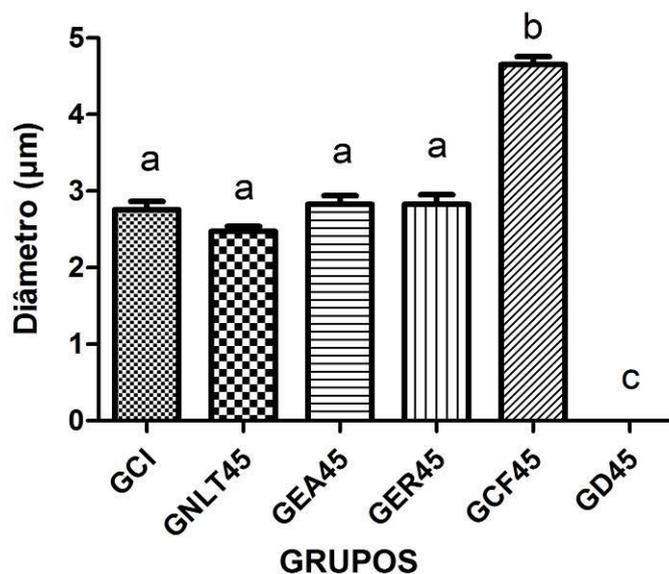
Tabela 16 – Média e desvio padrão da medida da área dos axônios (μm^2) dos grupos 45 dias.

Grupos	Média	DP
GCI	6,35 ^{ab}	±0,61
GNLT45	5,48 ^a	±0,50
GEA45	6,95 ^b	±1,29
GER45	6,87 ^b	±1,07
GCF45	15,06 ^c	±1,24
GD45	0,00 ^d	±0,00

GCF45>(GEA45=GER45=GCI)>GNLT45>GD45

Observa-se na tabela 16 que os resultados da medida da área dos axônios entre os grupos GEA45 e GER45 não apresentam diferenças estatisticamente significantes entre si, mas, quando comparados os resultados dos grupos GER45 e GER45 com os grupos GCI, GNLT45, GCF45 e GD45, houve diferenças estatisticamente significantes entre eles.

Figura 27 – Gráfico dos resultados da medida do diâmetro dos axônios (μm) dos animais dos grupos 45 dias. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes ($p \leq 0,05$).



GCF45>(GCI=GNLT45=GEA45=GER45)>GD45

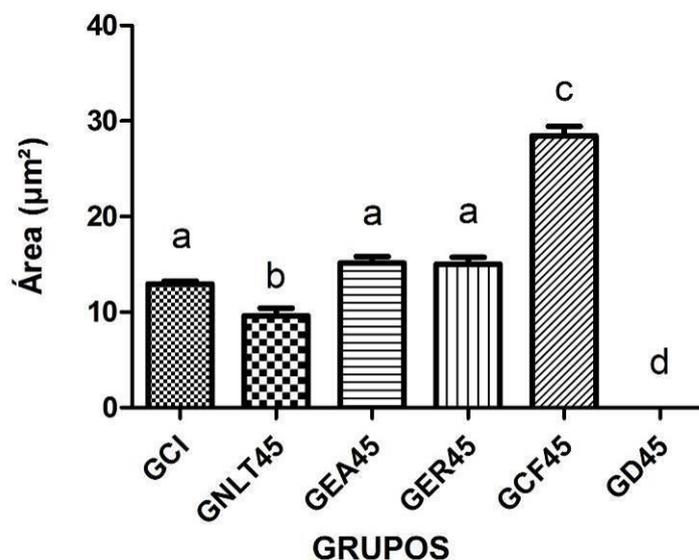
Tabela 17 – Média e desvio padrão da medida do diâmetro dos axônios (μm) dos grupos 45 dias.

Grupos	Média	DP
GCI	2,76 ^a	±0,34
GNLT45	2,48 ^a	±0,21
GEA45	2,83 ^a	±0,37
GER45	2,83 ^a	±0,39
GCF45	4,65 ^b	±0,32
GD45	0,00 ^c	±0,00

GCF45>(GCI=GNLT45=GEA45=GER45)>GD45

Observa-se na tabela 17 que os resultados da medida do diâmetro dos axônios entre os grupos GCI, GNLT45, GEA45, GER45 não apresentam diferenças estatisticamente significantes entre si, mas, quando comparados os resultados com os grupos GCF45 e GD45, houve diferenças estatisticamente significantes entre eles.

Figura 28 – Gráfico dos resultados da medida da área da bainha de mielina (μm^2) dos animais dos grupos 45 dias. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes ($p \leq 0,05$).



GCF45>(GCI=GEA45=GER45)>GNLT45>GD45

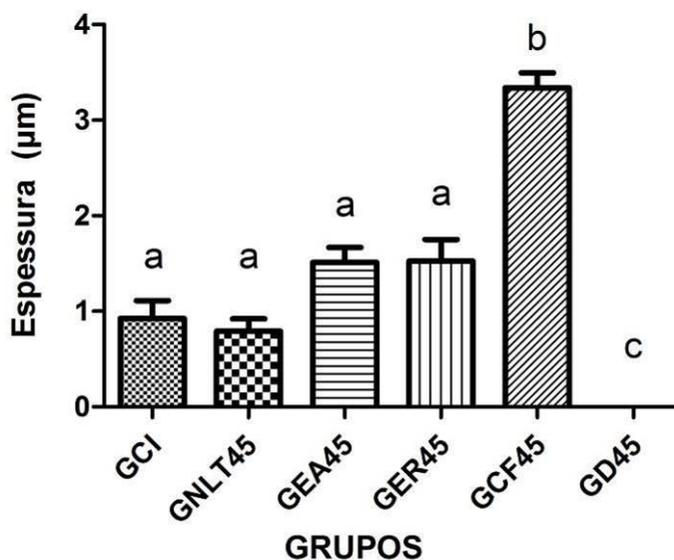
Tabela 18 – Média e desvio padrão da medida da área da bainha de mielina (μm^2) dos grupos 45 dias.

Grupos	Média	DP
GCI	12,94 ^a	±0,94
GNLT45	9,62 ^b	±2,47
GEA45	15,15 ^a	±2,14
GER45	15,03 ^a	±2,25
GCF45	28,44 ^c	±3,16
GD45	0,00 ^d	0,00

GCF45>(GCI=GEA45=GER45)>GNLT45>GD45

Pode-se observar na tabela 18 que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos GCI, GEA45 e GER45, mas quando se compara com os grupos GNLT45, GCF45 e GD45, houve diferença estatisticamente significativa.

Figura 29 – Gráfico dos resultados da medida da espessura da bainha de mielina (μm) dos animais dos grupos 45 dias. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes ($p \leq 0,05$).



GCF45 > (GCI = GNLT45 = GEA45 = GER45) > GD45

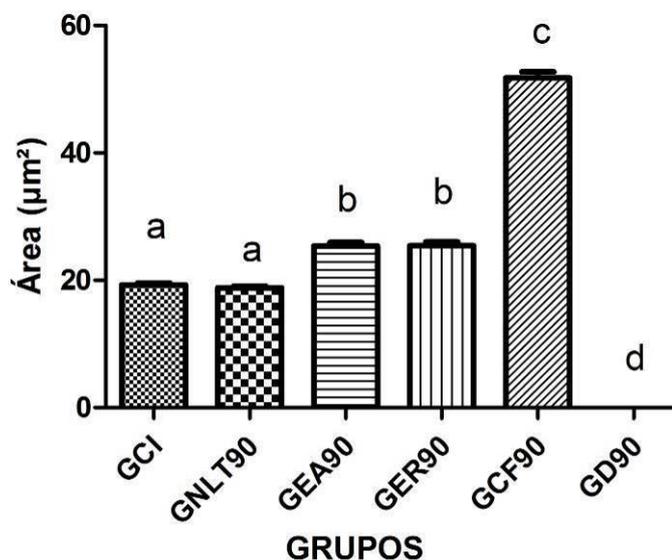
Tabela 19 – Média e desvio padrão da medida da espessura da bainha de mielina (μm) dos grupos 45 dias.

Grupos	Média	DP
GCI	0,93 ^a	±0,59
GNLT45	0,79 ^a	±0,41
GEA45	1,51 ^a	±0,49
GER45	1,53 ^a	±0,72
GCF45	3,34 ^b	±0,49
GD45	0,00 ^c	±0,00

GCF45 > (GCI = GNLT45 = GEA45 = GER45) > GD45

Pode ser observado na tabela 19 que não houve diferença estatisticamente entre os grupos GCI, GNLT90, GEA90 e GER90, mas houve diferença ao compará-los com os grupos GCF90 e GD90.

Figura 30 – Gráfico dos resultados da medida da área da fibra nervosa (μm^2) dos animais dos grupos 90 dias. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes ($p \leq 0,05$).



GCF90>(GEA90=GER90)>(GCI=GNLT90)>GD90

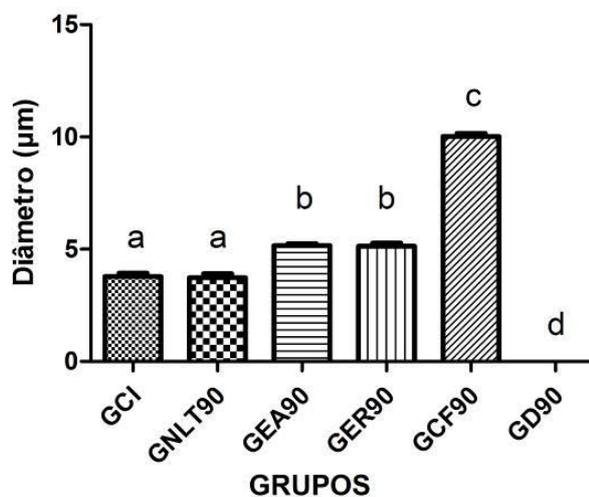
Tabela 20 – Média e desvio padrão da medida da área da fibra nervosa (μm^2) dos grupos 90 dias.

Grupos	Média	DP
GCI	19,29 ^a	±0,97
GNLT90	18,83 ^a	±0,77
GEA90	25,37 ^b	±1,81
GER90	25,41 ^b	±2,02
GCF90	51,76 ^c	±3,13
GD90	0,00 ^d	±0,00

GCF90>(GEA90=GER90)>(GCI=GNLT90)>GD90

Observa-se na tabela 20 que houve diferença estatisticamente significativa quando se compara os grupos GEA90 e GER90 com os grupos GCI, GNLT90, GCF90 e GF90, mas não houve diferença estatisticamente entre eles.

Figura 31 – Gráfico dos resultados da medida do diâmetro da fibra nervosa (μm) dos animais dos grupos 90 dias. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes ($p \leq 0,05$).



GCF90>(GEA90+GER90)>(GCI=GNLT90)>GD90

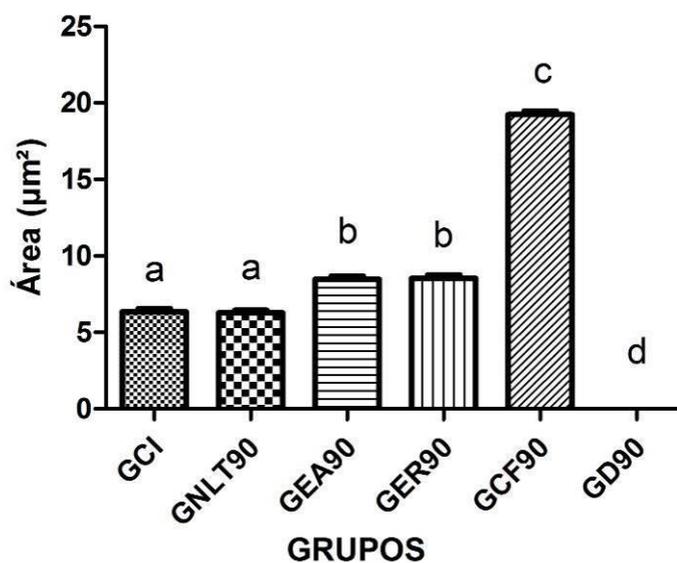
Tabela 21 – Média e desvio padrão da medida do diâmetro da fibra nervosa (μm) dos grupos 90 dias.

Grupos	Média	DP
GCI	3,78 ^a	±0,48
GNLT90	3,73 ^a	±0,54
GEA90	5,15 ^b	±0,30
GER90	5,13 ^b	±0,41
GCF90	10,02 ^c	±0,44
GD90	0,00 ^d	±0,00

GCF90>(GEA90+GER90)>(GCI=GNLT90)>GD90

Observa-se na tabela 21 que houve diferença estatisticamente significativa quando se compara os grupos GEA90 e GER90 com os grupos GCI, GNLT90, GCF90 e GF90, mas não houve diferença estatisticamente entre eles.

Figura 32 – Gráfico dos resultados da medida da área do axônio (μm^2) dos animais dos grupos 90 dias. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes ($p \leq 0,05$).



GCF90 > (GEA90 = GER90) > (GCI = GNLT90) > GD90

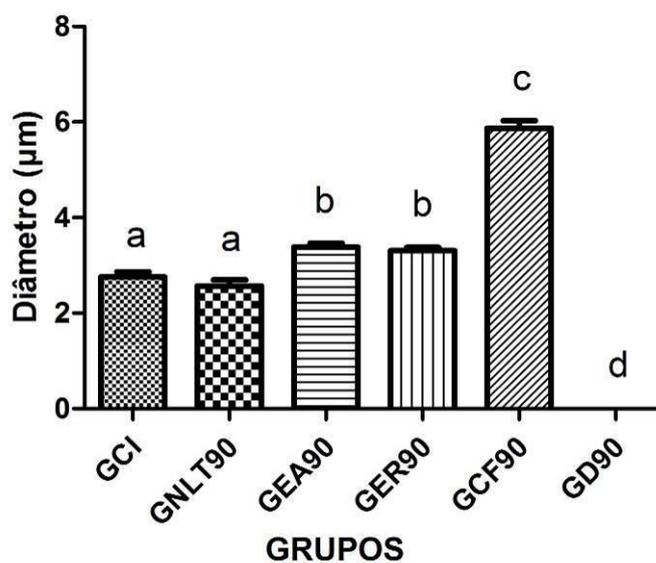
Tabela 22 – Média e desvio padrão da medida da área do axônio (μm^2) dos grupos 90 dias.

Grupos	Média	DP
GCI	6,35 ^a	±0,61
GNLT90	6,27 ^a	±0,53
GEA90	8,48 ^b	±0,61
GER90	8,52 ^b	±0,77
GCF90	19,24 ^c	±0,70
GD90	0,00 ^d	±0,00

GCF90 > (GEA90 = GER90) > (GCI = GNLT90) > GD90

Observa-se na tabela 22 que houve diferença estatisticamente significativa quando se compara os grupos GEA90 e GER90 com os grupos GCI, GNLT90, GCF90 e GF90, mas não houve diferença estatisticamente entre eles.

Figura 33 – Gráfico dos resultados da medida do diâmetro do axônio (μm) dos animais dos grupos 90 dias. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes ($p \leq 0,05$).



GCF90>(GEA90=GER90)>(GCI=GNLT90)>GD90

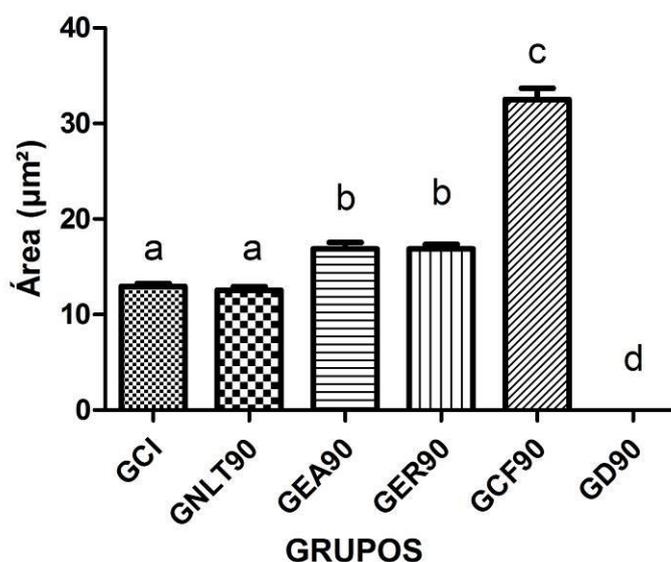
Tabela 23 – Média e desvio padrão da medida do diâmetro do axônio (μm) dos grupos 90 dias.

Grupos	Média	DP
GCI	2,76 ^a	$\pm 0,34$
GNLT90	2,57 ^a	$\pm 0,39$
GEA90	3,38 ^b	$\pm 0,27$
GER90	3,31 ^b	$\pm 0,22$
GCF90	5,87 ^c	$\pm 0,50$
GD90	0,00 ^d	$\pm 0,00$

GCF90>(GEA90=GER90)>(GCI=GNLT90)>GD90

Observa-se na tabela 23 que houve diferença estatisticamente significativa quando se compara os grupos GEA90 e GER90 com os grupos GCI, GNLT90, GCF90 e GF90, mas não houve diferença estatisticamente entre eles.

Figura 34 – Gráfico dos resultados da medida da área da bainha de mielina (μm^2) dos animais dos grupos 90 dias. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes ($p \leq 0,05$).



GCF90>(GEA90=GER90)>(GCI=GNLT90)>GD90

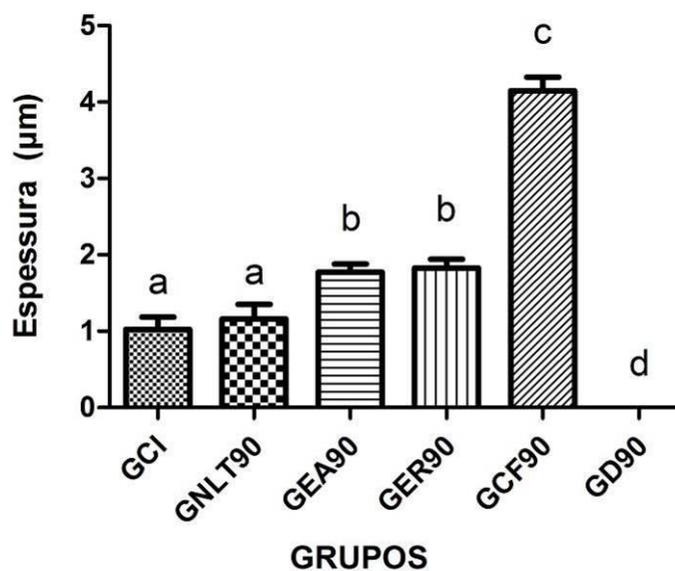
Tabela 24 – Média e desvio padrão da medida da área da bainha de mielina (μm^2) dos grupos 90 dias.

Grupos	Média	DP
GCI	12,94 ^a	±0,94
GNLT90	12,56 ^a	±1,11
GEA90	16,89 ^b	±2,09
GER90	16,89 ^b	±1,50
GCF90	32,51 ^c	±3,67
GD90	0,00 ^d	±0,00

GCF90>(GEA90=GER90)>(GCI=GNLT90)>GD90

Observa-se na tabela 24 que houve diferença estatisticamente significativa quando se compara os grupos GEA90 e GER90 com os grupos GCI, GNLT90, GCF90 e GF90, mas não houve diferença estatisticamente entre eles.

Figura 35 – Gráfico dos resultados da medida da espessura da bainha de mielina (μm) dos animais dos grupos 90 dias. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes ($p \leq 0,05$).



GCF90>(GEA90=GER90)>(GCI=GNLT90)>GD90

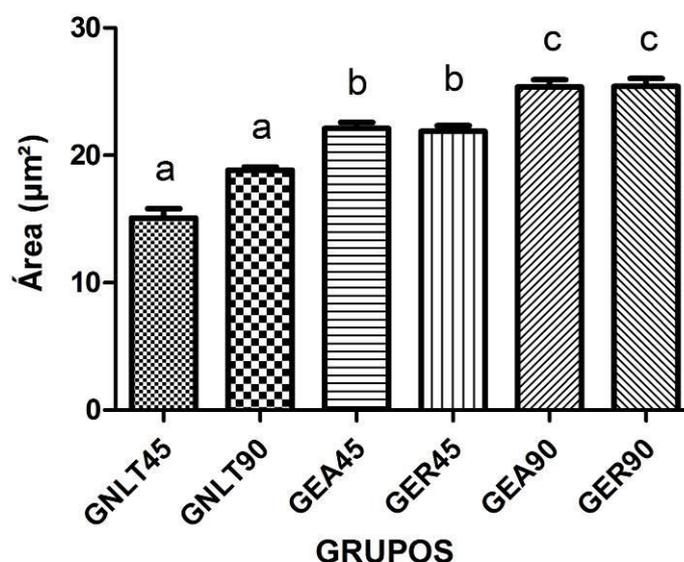
Tabela 25 – Média e desvio padrão da medida da espessura da bainha de mielina (μm) dos grupos 90 dias.

Grupos	Média	DP
GCI	1,03 ^a	±0,51
GNLT90	1,16 ^a	±0,61
GEA90	1,77 ^b	±0,34
GER90	1,83 ^b	±0,38
GCF90	4,15 ^c	±0,57
GD90	0,00 ^d	±0,00

GCF90>(GEA90=GER90)>(GCI=GNLT90)>GD90

Observa-se na tabela 25 que houve diferença estatisticamente significativa quando se compara os grupos GEA90 e GER90 com os grupos GCI, GNLT90, GCF90 e GF90, mas não houve diferença estatisticamente entre eles.

Figura 36 – Gráfico de comparação dos valores da área da fibra nervosa, entre os grupos GNLT 45, GNLT90, GEA45, GER45, GEA90 e GER90 dias, média e desvio padrão.



(GEA90=GER90)>(GEA45=GER45)>(GNLT45=GNLT90)

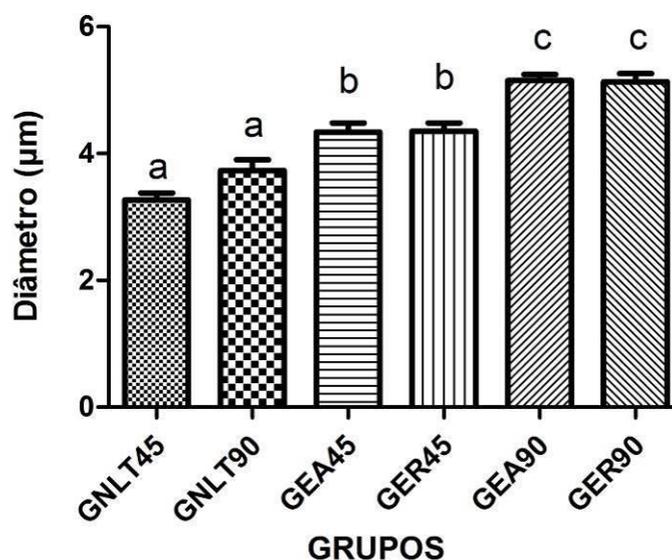
Tabela 26 – Comparação dos valores da área da fibra nervosa, entre os grupos GNLT 45, GNLT90, GEA45, GER45, GEA90 e GER90 dias, média e desvio padrão.

Grupos	Média	DP
GNLT45	15,10 ^a	±2,22
GNLT90	18,83 ^a	±0,77
GEA45	22,10 ^b	±1,52
GER45	21,90 ^b	±1,39
GEA90	25,37 ^c	±1,81
GER90	25,41 ^c	±2,02

(GEA90=GER90)>(GEA45=GER45)>(GNLT45=GNLT90)

Observa-se na tabela 26 que houve diferença estatisticamente significativa quando se compararam os grupos eletroestimulados com os grupos não estimulados. E quando se comparam os grupos eletroestimulados, houve diferença estatisticamente significativa em relação ao tempo de estimulação; não havendo, porém, entre as correntes.

Figura 37 – Gráfico de comparação dos valores do diâmetro da fibra nervosa, entre os grupos GNLT 45, GNLT90, GEA45, GER45, GEA90 e GER90 dias, média e desvio padrão.



(GEA90=GER90)>(GEA45=GER45)>(GNLT45=GNLT90)

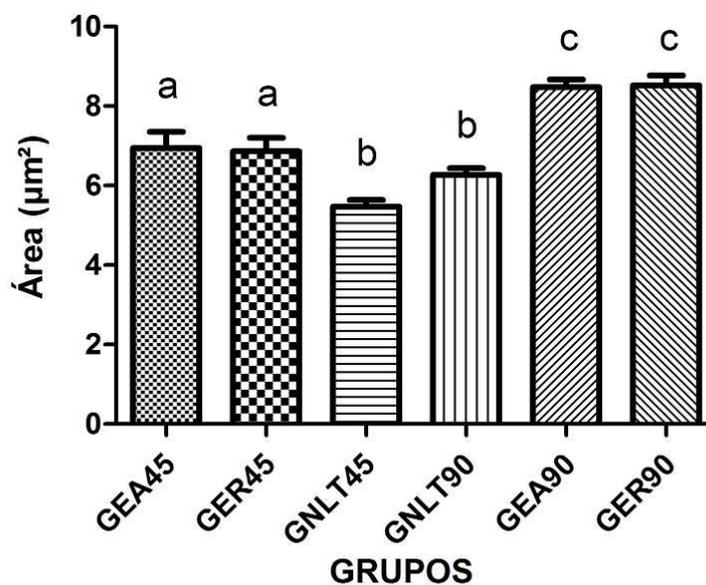
Tabela 27 – Comparação dos valores do diâmetro da fibra nervosa, entre os grupos GNLT 45, GNLT90, GEA45, GER45, GEA90 e GER90 dias, média e desvio padrão

Grupos	Média	DP
GNLT45	3,27 ^a	±0,35
GNLT90	3,73 ^a	±0,54
GEA45	4,34 ^b	±0,45
GER45	4,35 ^b	±0,41
GEA90	5,15 ^c	±0,3
GER90	5,13 ^c	±0,41

(GEA90=GER90)>(GEA45=GER45)>(GNLT45=GNLT90)

Observa-se na tabela 27 que em relação ao diâmetro da fibra nervosa houve diferença estatisticamente significante quando se compararam os grupos eletroestimulados com os grupos não estimulados. E quando se compararam os grupos eletroestimulados, houve diferença estatisticamente significante em relação ao tempo de estimulação, mas não houve entre as correntes.

Figura 38 – Gráfico de comparação dos valores da área do axônio, entre os grupos GNLT 45, GNLT90, GEA45, GER45, GEA90 e GER90 dias, média e desvio padrão.



(GEA90=GER90)>(GEA45=GER45)>(GNLT45=GNLT90)

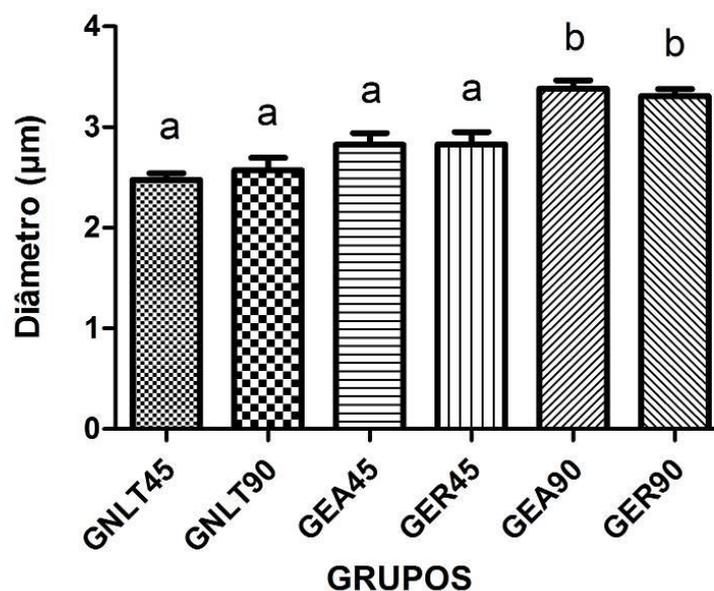
Tabela 28 – Comparação dos valores da área do axônio, entre os grupos GNLT 45, GNLT90, GEA45, GER45, GEA90 e GER90 dias, média e desvio padrão.

Grupos	Média	DP
GNLT45	5,48 ^a	±0,50
GNLT90	6,27 ^a	±0,53
GEA45	6,95 ^b	±1,29
GER45	6,87 ^b	±1,07
GEA90	8,48 ^c	±0,61
GER90	8,52 ^c	±0,77

(GEA90=GER90)>(GEA45=GER45)>(GNLT45=GNLT90)

Observa-se na tabela 28, que em relação à área do axônio houve diferença estatisticamente significativa quando se compararam os grupos eletroestimulados com os grupos não estimulados. E também, quando se compararam os grupos estimulados eletricamente, houve diferença estatisticamente significativa em relação ao tempo de estimulação, mas não houve entre as correntes.

Figura 39 – Gráfico de comparação dos valores do diâmetro do axônio, entre os grupos GNLT 45, GNLT90, GEA45, GER45, GEA90 e GER90 dias, média e desvio padrão.



(GEA90=GER90)>(GEA45=GER45=GNLT45=GNLT90)

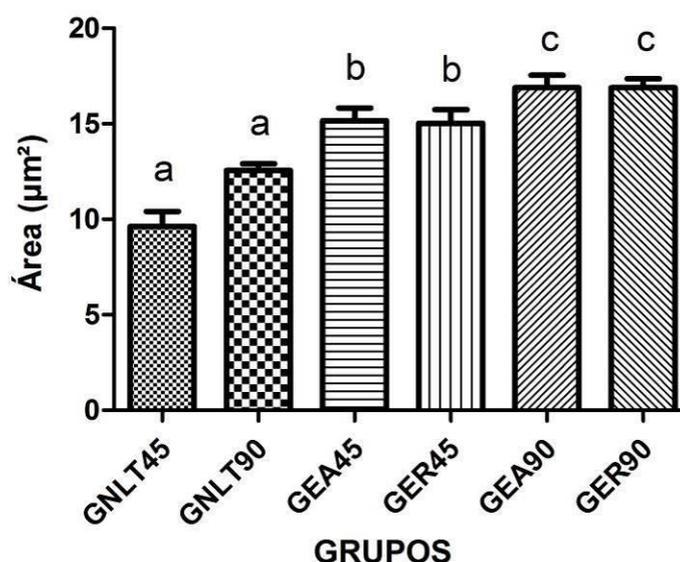
Tabela 29 – Comparação dos valores do diâmetro do axônio, entre os grupos GNLT 45, GNLT90, GEA45, GER45, GEA90 e GER90 dias, média e desvio padrão.

Grupos	Média	DP
GNLT45	2,48 ^a	±0,21
GNLT90	2,57 ^a	±0,39
GEA45	2,83 ^a	±0,37
GER45	2,83 ^a	±0,39
GEA90	3,38 ^b	±0,27
GER90	3,31 ^b	±0,22

(GEA90=GER90)>(GEA45=GER45=GNLT45=GNLT90)

Pode-se observar na tabela 29 que houve diferença estatisticamente significativa apenas quando se compararam os grupos eletroestimulados por 90 dias com os outros grupos, não havendo diferença estatisticamente significativa quando se compararam os grupos eletroestimulados por 45 dias com os grupos que realizaram somente a neurografia látero-terminal.

Figura 40 – Gráfico de comparação dos valores da área da bainha de mielina, entre os grupos GNLT 45, GNLT90, GEA45, GER45, GEA90 e GER90 dias, média e desvio padrão.



(GEA90=GER90)>(GEA45=GER45)>(GNLT45=GNLT90)

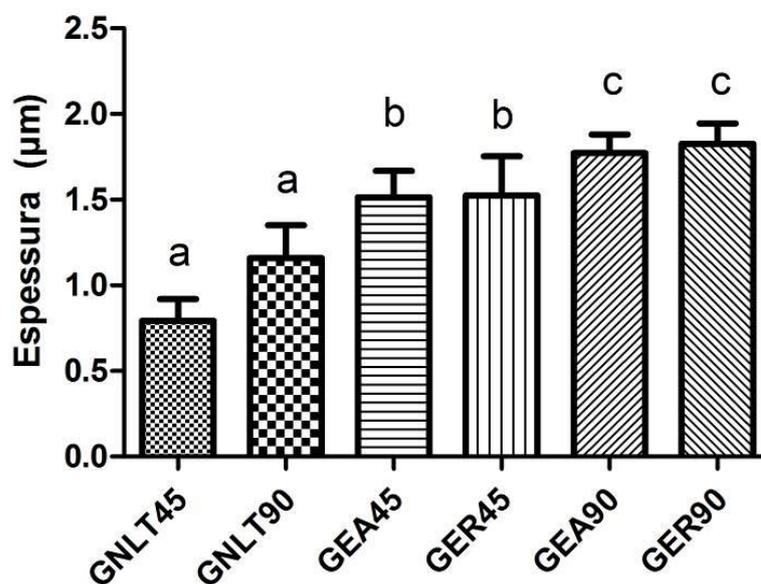
Tabela 30 – Comparação dos valores da área da bainha de mielina, entre os grupos GNLT 45, GNLT90, GEA45, GER45, GEA90 e GER90 dias, média e desvio padrão.

Grupos	Média	DP
GNLT45	9,62 ^a	±2,47
GNLT90	12,56 ^a	±1,11
GEA45	15,15 ^b	±2,14
GER45	15,03 ^b	±2,25
GEA90	16,89 ^c	±2,09
GER90	16,89 ^c	±1,50

(GEA90=GER90)>(GEA45=GER45)>(GNLT45=GNLT90)

Pode-se verificar na tabela 30, que em relação à área da bainha de mielina houve diferença estatisticamente significativa quando se compararam os grupos eletroestimulados com os grupos não estimulados. E quando se compararam os grupos estimulados eletricamente, houve diferença estatisticamente significativa em relação ao tempo de estimulação elétrica, mas não houve diferença entre as correntes utilizadas.

Figura 41 – Gráfico de comparação dos valores da espessura da bainha de mielina, entre os grupos GNLT 45, GNLT90, GEA45, GER45, GEA90 e GER90 dias, média e desvio padrão.



(GEA90=GER90)>(GEA45=GER45)>(GNLT45=GNLT90)

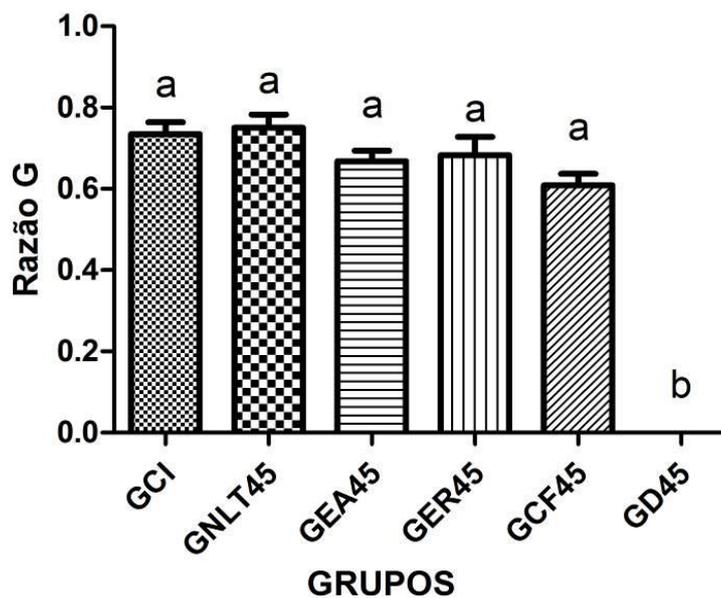
Tabela 31 – Comparação dos valores da espessura da bainha de mielina, entre os grupos GNLT 45, GNLT90, GEA45, GER45, GEA90 e GER90 dias, média e desvio padrão.

Grupos	Média	DP
GNLT45	0,79 ^a	±0,41
GNLT90	1,16 ^a	±0,61
GEA45	1,51 ^b	±0,49
GER45	1,53 ^b	±0,72
GEA90	1,77 ^c	±0,34
GER90	1,83 ^c	±0,38

(GEA90=GER90)>(GEA45=GER45)>(GNLT45=GNLT90)

Na tabela 30, pode-se observar que em relação à espessura da bainha de mielina houve diferença estatisticamente significativa quando se compararam os grupos eletroestimulados com os grupos não estimulados, e quando se compararam os grupos eletroestimulados, houve diferença estatisticamente significativa somente em relação ao tempo de estimulação elétrica, mas não houve diferença entre as correntes utilizadas.

Figura 42 – Gráfico dos resultados da medida da razão G dos animais dos grupos 45 dias. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes ($p \leq 0,05$).



(GCI=GNLT45=GEA45=GER45=GCF45)>GD45

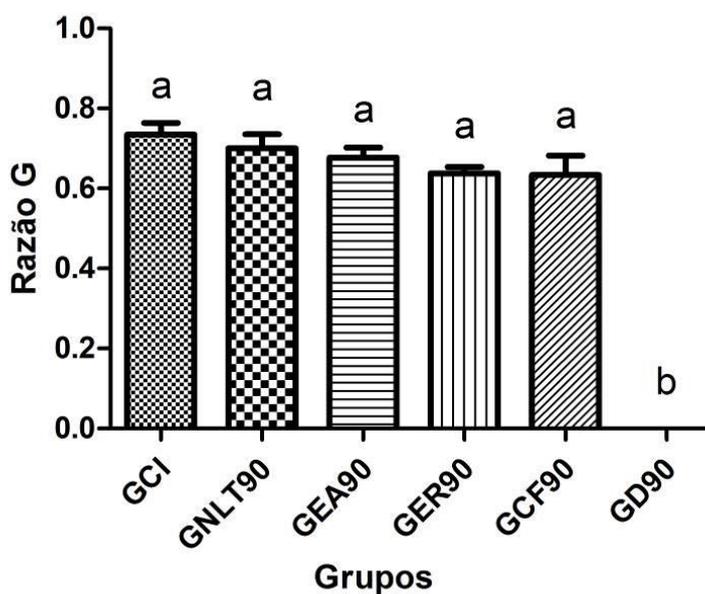
Tabela 32 – Média e desvio padrão da medida da razão G dos grupos 45 dias.

Grupos	Média	DP
GCI	0,73 ^a	±0,10
GNLT45	0,75 ^a	±0,11
GEA45	0,67 ^a	±0,09
GER45	0,68 ^a	±0,15
GCF45	0,61 ^a	±0,10
GCF45	0,00 ^b	±0,00

(GCI=GNLT45=GEA45=GER45=GCF45)>GD45

Observa-se na tabela 32 que em relação à razão G, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos estudados por 45 dias.

Figura 43 – Gráfico dos resultados da medida da razão G dos animais dos grupos 90 dias. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes ($p \leq 0,05$).



(GCI=GNLT45=GEA45=GER45=GCF45)>GD45

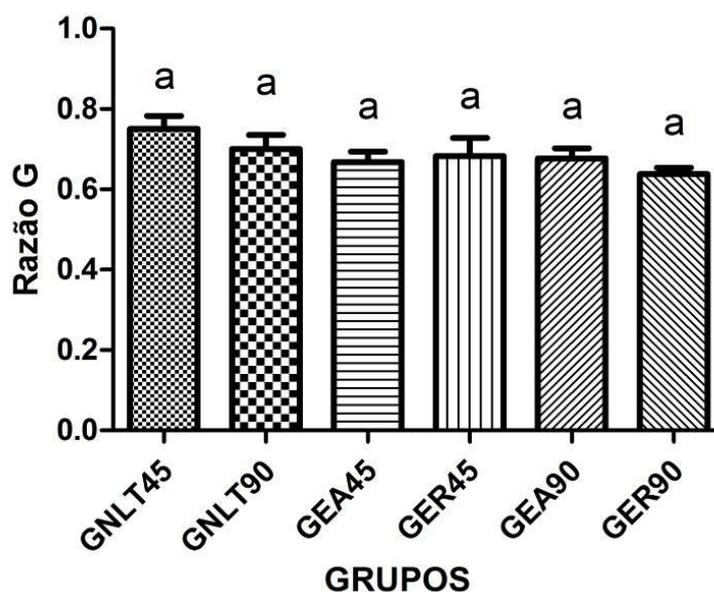
Tabela 33 – Média e desvio padrão da medida da razão G dos grupos 90 dias

Grupos	Média	DP
GCI	0,73 ^a	±0,10
GNLT90	0,70 ^a	±0,12
GEA90	0,68 ^a	±0,09
GER90	0,64 ^a	±0,06
GCF90	0,63 ^a	±0,17
GCF90	0,00 ^b	±0,00

(GCI=GNLT45=GEA45=GER45=GCF45)>GD45

Na tabela 33 pode-se notar que, em relação à razão G, não houve diferença estatisticamente entre os grupos eletroestimulados e não eletroestimulados com os grupos-controle inicial e final.

Figura 44 – Gráfico de comparação dos valores da razão G, entre os grupos GNLT 45, GNLT90, GEA45, GER45, GEA90 e GER90 dias, média e desvio padrão.



GNLT45=GNLT90=GEA45=GER45=GEA90=GER90

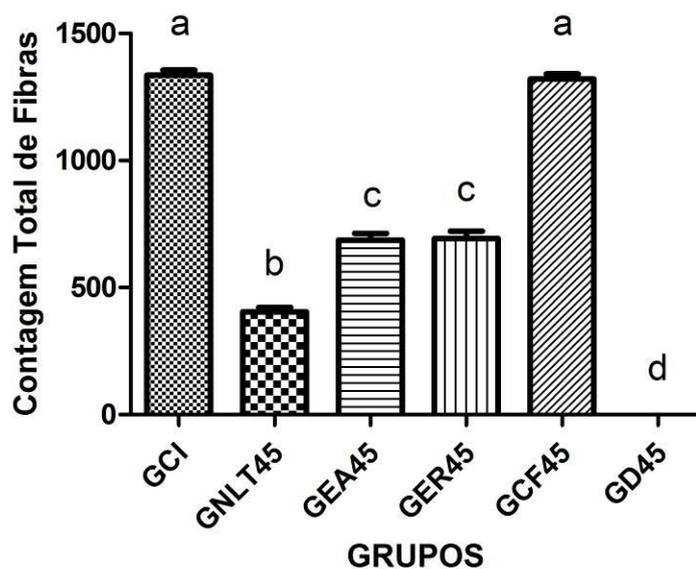
Tabela 34 – Comparação dos valores da razão G, entre os grupos GNLT 45, GNLT90, GEA45, GER45, GEA90 e GER90 dias, média e desvio padrão.

Grupos	Média	DP
GNLT45	0,75 ^a	±0,11
GNLT90	0,70 ^a	±0,12
GEA45	0,67 ^a	±0,09
GER45	0,68 ^a	±0,15
GEA90	0,68 ^a	±0,09
GER90	0,64 ^a	±0,06

GNLT45=GNLT90=GEA45=GER45=GEA90=GER90

Observa-se na tabela 34, que em relação à razão G, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos eletroestimulados com o grupo que realizou somente a neurorrafia látero-terminal, nem quando se compararam os tempos de eletroestimulação.

Figura 45 – Gráfico dos resultados da contagem total de fibras nervosas dos animais dos grupos 45 dias. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes ($p \leq 0,05$).



(GCI=GCF45)>(GEA45=GER45)>GNLT45>GD45

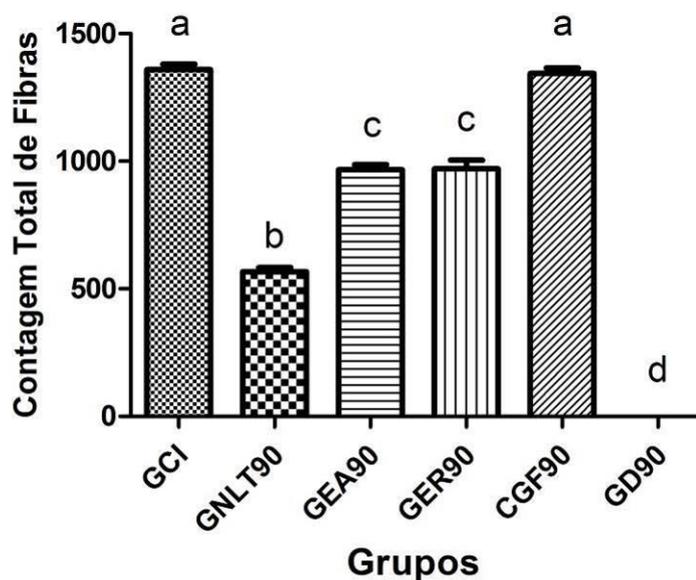
Tabela 35 – Média e desvio padrão da contagem total de fibras nervosas dos grupos 45 dias

Grupos	Média	DP
GCI	1336 ^a	±68
GNLT45	405 ^b	±59
GEA45	687 ^c	±89
GER45	693 ^c	±100
GCF45	1320 ^a	±69
GD45	0 ^d	±0

(GCI=GCF45)>(GEA45=GER45)>GNLT45>GD45

Pode-se observar na tabela 35, que em relação à contagem total de fibras nervosas, houve diferença estatisticamente entre os grupos eletroestimulados por 45 dias e não eletroestimulados que realizou somente a neurorrafia látero-terminal; e também houve diferença estatisticamente significativa quando se compara os grupos eletroestimulados com os grupos-controle inicial e final.

Figura 46 – Gráfico dos resultados da contagem total de fibras nervosas dos animais dos grupos 90 dias. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes ($p \leq 0,05$).



(GCI=GCF90)>(GEA90=GER90)>GNLT90>GD90

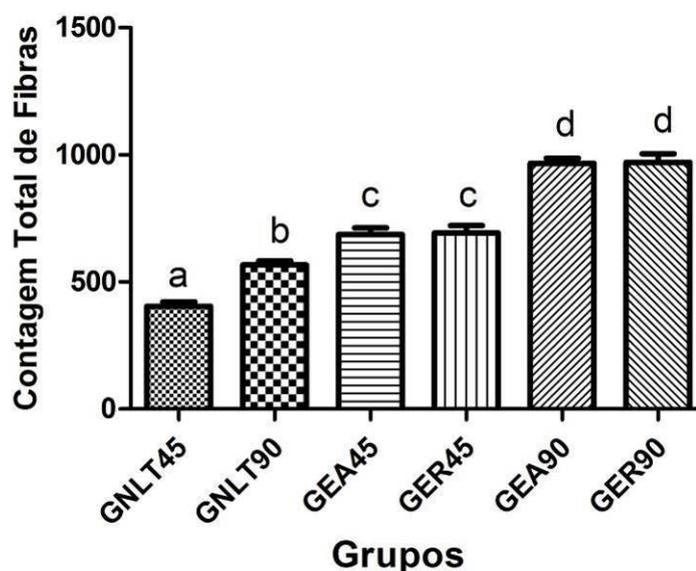
Tabela 36 – Média e desvio padrão da contagem total de fibras nervosas dos grupos 90 dias

Grupos	Média	DP
GCI	1359 ^a	±73
GNLT90	567 ^b	±57
GEA90	966 ^c	±71
GER90	971 ^c	±115
GCF90	1345 ^a	±72
GD90	0 ^d	±0

(GCI=GCF90)>(GEA90=GER90)>GNLT90>GD90

Na tabela 35, pode-se observar que, em relação à contagem total de fibras nervosas, houve diferença estatisticamente entre os grupos eletroestimulados por 90 dias e não eletroestimulados que realizou somente a neurorrafia látero-terminal; e também houve diferença estatisticamente significativa quando se compararam os grupos eletroestimulados por 90 dias com os grupos-controle inicial e final.

Figura 47 – Gráfico de comparação dos valores da contagem total de fibras nervosas, entre os grupos GNLT 45, GNLT90, GEA45, GER45, GEA90 e GER90 dias, média e desvio padrão.



(GEA90=GER90)>(GEA45=GER45)>GNLT90>GNLT45

Tabela 37 – Comparação dos valores da contagem total de fibras nervosas, entre os grupos GNLT 45, GNLT90, GEA45, GER45, GEA90 e GER90 dias, média e desvio padrão.

Grupos	Média	DP
GNLT45	405 ^a	±59
GNLT90	567 ^b	±57
GEA45	687 ^c	±89
GEA90	966 ^c	±71
GER45	693 ^d	±100
GER90	971 ^d	±115

(GEA90=GER90)>(GEA45=GER45)>GNLT90>GNLT45

Considerando a contagem total de fibras nervosas, pode-se notar, na tabela 37, que houve diferença estatisticamente significativa quando se compararam os grupos eletroestimulados com o grupo que realizou somente a neurografia látero-terminal. Também houve diferença estatisticamente significativa quando compararam-se os grupos eletroestimulados em relação apenas ao tempo, não mostrando diferenças em relação à corrente utilizada.

Secção transversal do nervo fibular comum dos grupos 45 dias

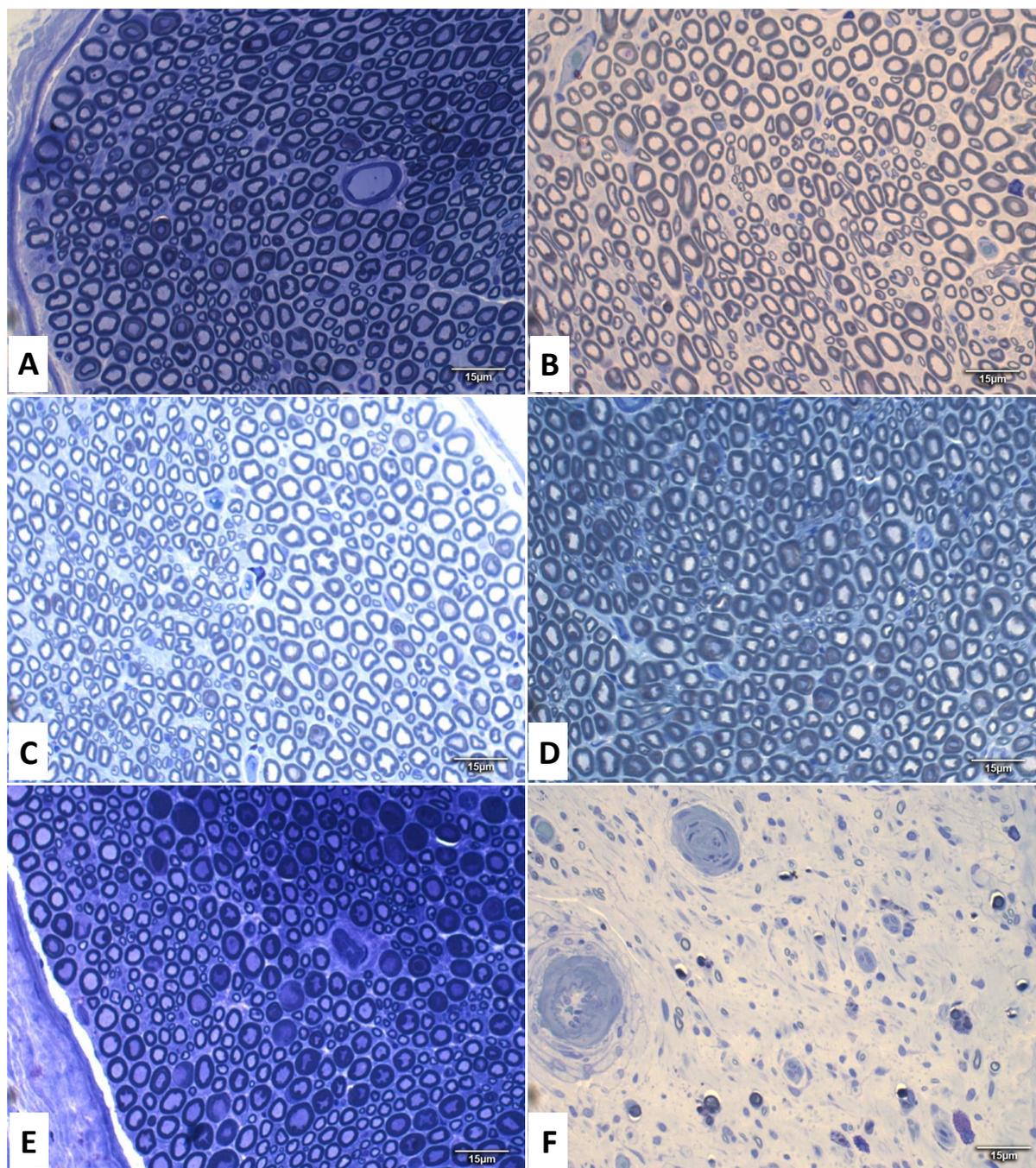


Figura 48 – **A-** grupo controle inicial (GCI); **B-** grupo neurorafia látero-terminal (GNLT45); **C-** grupo estimulação Aussie (GEA45); **D-** grupo estimulação Russa (GER45); **E-** Grupo controle final (GCF45); **F-** grupo desnervado (GD45).

Secção transversal do nervo fibular comum dos grupos 90 dias

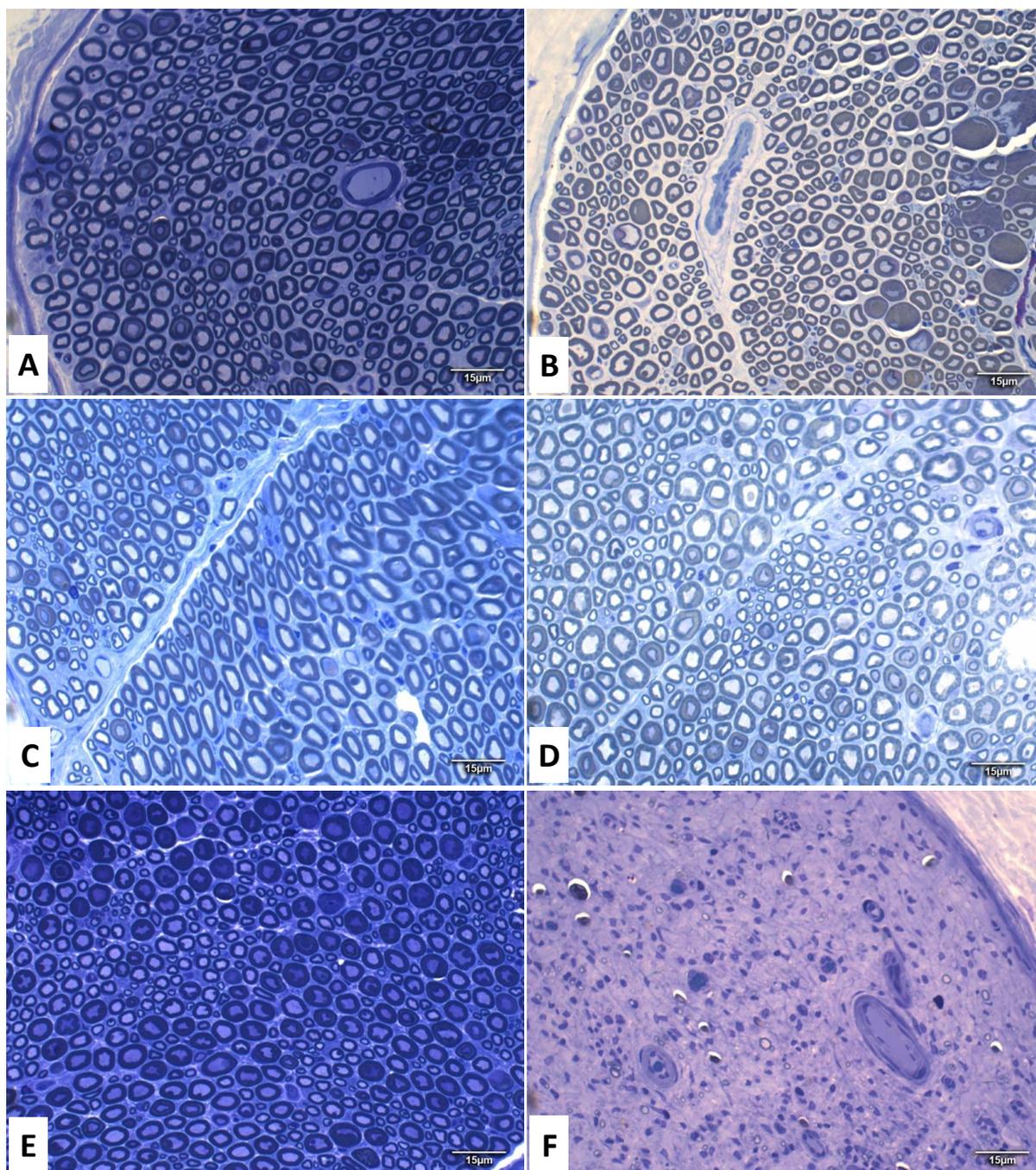


Figura 49 – **A-** grupo controle inicial (GCI); **B-** grupo neurorafia látero-terminal (GNLT90); **C-** grupo estimulação Aussie (GEA90); **D-** grupo estimulação Russa (GER90); **E-** grupo controle final (GCF90); **F-** grupo desnervado (GD90).

Tabela 38 – Visão geral das médias dos resultados obtidos. AF = avaliação funcional; MCI = massa corporal inicial; MCF = massa corporal final; AM = amplitude; LA = latência; AFN = área da fibra nervosa; DFN = diâmetro da fibra nervosa; AAX = área do axônio; DAX = diâmetro do axônio; ABM = área da bainha de mielina; EBM = espessura da bainha de mielina; CTFN = contagem total das fibras nervosas; RG = razão G.

GRUPO 45	AF	MCI	MCF	AM	LA	AFN	DFN	AAX	DAX	ABM	EBM	CTFN	RG
GCI	-12,91 ^a	225,00 ^a	-----	20,08 ^a	1,69 ^a	16,80 ^a	3,68 ^a	6,35 ^{ab}	2,76 ^a	12,94 ^a	0,93 ^a	1336 ^a	0,73 ^a
GHLT45	-70,50 ^c	228,90 ^a	373,60 ^a	5,64 ^b	1,92 ^b	13,68 ^b	3,27 ^a	5,48 ^a	2,48 ^a	9,62 ^b	0,79 ^a	405 ^b	0,75 ^a
GEA45	-68,81 ^c	226,40 ^a	369,30 ^a	13,45 ^c	1,85 ^{bc}	19,88 ^c	4,34 ^b	6,95 ^b	2,83 ^a	15,15 ^a	1,51 ^a	687 ^c	0,67 ^a
GER45	-68,01 ^c	226,10 ^a	365,40 ^a	13,38 ^c	1,97 ^{bd}	19,27 ^c	4,35 ^b	6,87 ^b	2,83 ^a	15,03 ^a	1,53 ^a	693 ^c	0,68 ^a
GCF45	-13,40 ^a	228,00 ^a	369,00 ^a	18,08 ^a	1,66 ^a	38,53 ^d	7,99 ^c	15,06 ^c	4,65 ^b	28,44 ^c	3,34 ^b	1320 ^a	0,61 ^a
GD45	-79,58 ^d	228,00 ^a	369,30 ^a	0,00 ^d	10,00 ^a	0,00 ^e	0,00 ^d	0,00 ^d	0,00 ^c	0,00 ^d	0,00 ^c	0 ^d	0,00 ^b
GRUPO 90	AF	MCI	MCF	AM	LA	AFN	DFN	AAX	DAX	ABM	EBM	CTFN	RG
GCI	-12,91 ^a	220,90 ^a	-----	20,08 ^a	1,69 ^a	16,80 ^a	3,78 ^a	6,35 ^a	2,76 ^a	12,94 ^a	1,03 ^a	1359 ^a	0,73 ^a
GHLT90	-88,81 ^b	226,30 ^a	411,20 ^a	6,64 ^c	2,23 ^b	16,47 ^a	3,73 ^a	6,27 ^a	2,57 ^a	12,56 ^a	1,16 ^a	567 ^b	0,70 ^a
GEA90	-58,29 ^c	221,10 ^a	420,60 ^a	12,84 ^b	1,82 ^{ac}	22,95 ^b	5,15 ^b	8,48 ^b	3,38 ^b	16,89 ^b	1,77 ^b	966 ^c	0,68 ^a
GER90	-58,04 ^c	226,90 ^a	415,10 ^a	12,62 ^b	1,98 ^c	22,46 ^b	5,13 ^b	8,52 ^b	3,31 ^b	16,89 ^b	1,83 ^b	971 ^c	0,64 ^a
GCF90	-13,84 ^a	224,60 ^a	419,00 ^a	20,65 ^a	1,69 ^a	45,27 ^c	10,02 ^c	19,24 ^c	5,87 ^c	32,51 ^c	4,15 ^c	1345 ^a	0,63 ^a
GD90	-104,32 ^d	225,50 ^a	414,00 ^a	0,00 ^d	10,00 ^d	0,00 ^d	0,00 ^d	0,00 ^d	0,00 ^d	0,00 ^d	0,00 ^d	0 ^d	0,00 ^b

5 DISCUSSÃO

Para realização desta pesquisa, foi escolhido o animal (*Rattus norvegicus*) da linhagem *Wistar* por ser relativamente fácil a obtenção, manutenção e de manejo simples; e também por se tratar do animal mais utilizado para este tipo de pesquisa, que inclui reparo nervoso e regeneração. Esta linhagem de animal tem semelhanças com a fisiopatologia nervosa do ser humano (AKGUL; GULSOY; GULCUR *et al.*, 2014; MOHAMMADI; SAADATI, 2014; GHAYEMI *et al.*, 2014).

De acordo com o estudo dos autores Salvini *et al.*, (2012), o uso da estimulação elétrica no músculo desnervado, há décadas tem sido objeto de controvérsias. De maneira geral, um conjunto de estudos preconiza que a estimulação elétrica seria capaz de manter a força e a massa muscular até que a reinervação ocorra, enquanto outros estudos mostram que a estimulação elétrica pode atrasar a recuperação neuromuscular, inibindo a reinervação e, por isso, não deveria ser utilizada no tratamento do músculo desnervado. O uso de modelos experimentais em animais, possibilita maior controle sobre as variáveis pesquisadas e evita questões éticas importantes envolvidas nesse tipo de estudo em humanos.

Carandente *et al.*, (1989), relataram que para evitar interferências hormonais, o uso do animal do gênero masculino é fundamental, pois essa influência já foi verificada em outros experimentos.

A frequência de 20Hz foi usada em vários outros estudos para demonstrar a regeneração do axônio e o alvo da reinervação em ratos após a reparação de nervos imediata (FRANZ *et al.*, 2008; ASENSIO-PINILLA *et al.*, 2009; HUANG *et al.*, 2009, 2010, 2013; ALRASHDAN *et al.*, 2010; SHARMA *et al.*, 2010a; WAN *et al.*, 2010; SINGH *et al.*, 2012; KOPPES *et al.*, 2014a) e em humanos após cirurgia de liberação do nervo mediano na síndrome do túnel do carpo (GORDON *et al.*, 2010).

Um aspecto importante a ser observado por pesquisadores e terapeutas ao avaliarem os efeitos da eletroestimulação sobre o músculo desnervado é considerar, além da eficácia do tratamento sobre a atrofia muscular, a segurança do estímulo elétrico sobre o processo de reinervação, e também se a estimulação elétrica afeta fatores envolvidos na reinervação das fibras musculares desnervadas. Recentemente, demonstrou-se que o uso da estimulação elétrica na fase inicial pós-

lesão nervosa por esmagamento em ratos foi prejudicial, levando a um atraso da recuperação funcional, hipoexcitabilidade muscular e uma atrofia muscular acentuada (GIGO-BENATO *et al.*, 2012).

Atualmente, os estudos com animais foram seguidos de reparo imediato do nervo. A maior parte das lesões dos nervos em humanos ocorre juntamente com politraumatismos severos com complicações potencialmente fatais. Conseqüentemente, o reparo do nervo foi invariavelmente tardio, levando, às vezes, meses para ser realizado. Os estudos em animais que avaliaram a regeneração após reparação tardia com estimulação elétrica de 1Hz e 20 Hz, mostraram que a estimulação elétrica acelerou a regeneração (HUANG *et al.*, 2013, ELZINGA *et al.*, 2015).

Em uma pesquisa, a estimulação elétrica com frequência de 20 Hz começou um dia após o tratamento do nervo facial lesionado por esmagamento, e foi repetida diariamente durante 30 minutos (Hetzler *et al.*, 2008). Resultados positivos também foram demonstrados após uma semana de estimulação elétrica por 15 minutos diariamente com frequência de 20Hz, após o reparo do nervo isquiático por meio de um tubo de silicone de 10 milímetros de comprimento (YEH *et al.*, 2010).

Al-Majed *et al.*, (2000b) demonstraram que a estimulação elétrica de baixa frequência (20 Hz) acelera a regeneração do axônio após transecção do nervo e reparo microcirúrgico, surgindo um interesse crescente em usar a eletroestimulação para melhorar a capacidade dos nervos periféricos lesionados em regenerar seus axônios e promover uma recuperação funcional. A comparação da eficácia da estimulação elétrica e exercício diário, foi descrito em detalhe por Asensio-Pinilla *et al.*, (2009) e Udina *et al.*, (2011). Posteriormente, aumentou seu interesse no exercício físico diário na promoção da regeneração nervosa periférica e na recuperação funcional. De particular interesse é que os protocolos de exercício necessários para a promoção bem-sucedida da regeneração do axônio são específicos ao sexo, fornecendo tanto as justificativas para o tratamento do paciente como para os mecanismos pelos quais a regeneração dos nervos pode ter melhores resultados funcionais.

Em humanos, a eficácia da estimulação elétrica na promoção de reinervação de músculos cronicamente desnervados tem sido demonstrada na

síndrome do túnel do carpo (Gordon *et al.*, 2010b). Esses achados demonstram que a estimulação elétrica também pode ser aplicada em modelos crônicos. Outra consideração importante é que nas neuropatias compressivas, resultando em desmielinização focal e axonal, as perdas são muito mais comuns em situações clínicas. McLean *et al.*, (2014) mostraram que a estimulação elétrica aumentou a expressão do neurofilamento e fosforilação, que é importante na proteção do axônio. Além disso, a estimulação elétrica também aumentou a expressão da proteína básica da mielina (MBP) e promoveu a reorganização dos nodos de Ranvier. Uma compreensão mais profunda dos efeitos da estimulação elétrica no comportamento das células de Schwann não só podem ser importantes nas neuropatias compressivas, mas também podem ser úteis nas condições desmielinizantes, tais como na Síndrome de Gullain-Barré (CHAN *et al.*, 2016).

Na pesquisa realizada por Maciel *et al.*, (2013), a frequência foi determinada de acordo com o tipo de fibra muscular do músculo tibial cranial, que possui uma mistura homogênea de fibras fásicas e tônicas, e que em estudos anteriores realizados no laboratório desses pesquisadores, ajudaram a determinar a frequência de modulação em 10 Hz, estimulando preferencialmente as fibras tônicas, e nesta pesquisa, o músculo foi estimulado com duas frequências (30 e 100Hz) para ativar os dois tipos de fibras musculares (tônicas e fásicas).

A eficácia da estimulação elétrica em promover a recuperação funcional tem imediata relevância clínica, especialmente à luz dos resultados positivos relatados em um estudo que prova, em princípio, a eficácia da estimulação elétrica em promover regeneração do nervo e do músculo após a cirurgia de liberação do nervo mediano na síndrome do túnel do carpo (GORDON *et al.*, 2010).

Oliveira *et al.*, (2008) realizaram estudo associando o exercício de natação com a eletroestimulação. Nesta pesquisa, realizaram a natação e a eletroestimulação no mesmo dia. Os resultados do grupo que realizou a natação e a eletroestimulação, quando comparados com os grupos isolados não apresentaram resultados positivos. Os autores apresentam a possibilidade da associação no mesmo dia ter propiciado uma sobrecarga na musculatura, gerando fadiga muscular.

Há uma série de potenciais aplicações clínicas futuras que vale a pena investigar. A reconstrução do nervo usando enxerto de nervo sural, popularizado na

década de 1960, é considerado o padrão-ouro do reparo nervoso. Contudo, um dos principais constrangimentos na prática é que os sucesso e resultados funcionais através de enxertos de nervos permanecem pobres. Até a data, apenas há dois estudos do mesmo grupo que examinaram o papel da estimulação elétrica em um modelo de enxerto de nervo (Huang *et al.*, 2009, 2010), embora o retorno acelerado da função nos ratos em que o nervo foi estimulado seja promissor, e existam diferenças importantes nos modelos utilizados nesses estudos em comparação com os encontrados na clínica. Por exemplo, nesses estudos com ratos, o espaço (GAP) nervoso foi atravessado usando segmentos de nervo ressecados do mesmo nervo contralateral, enquanto clinicamente, o uso de um nervo sensorial, tipicamente o sural, é necessário. Além disso, uma folga de 10-15 mm é bastante curta com o que normalmente se encontra no humano. Essas são as questões críticas que exigirão uma abordagem mais básica para avaliar plenamente o papel da estimulação elétrica na cirurgia de reconstrução de enxerto nervoso (CHAN *et al.*, 2016).

Segundo Gordon (2016), a estimulação elétrica acelera a expressão de fatores neurotróficos, o que justifica a ideia dessa pesquisa que a eletroestimulação por meio de correntes de média frequência com 1000Hz ou 2500Hz, podem trazer benefícios para os pacientes portadores de lesão nervosa periférica.

É importante ressaltar que trabalhos anteriores, utilizando a estimulação elétrica muscular por período de três meses seguintes à transecção e ao reparo imediato, demonstraram recuperação funcional melhorada em comparação com músculos não estimulados (WILLAND *et al.*, 2015) . A estimulação elétrica também aumentou reinervação muscular e recuperou a desnervação de longo prazo com posterior reparo nervoso (WILLAND *et al.*, 2011a).

Estudos anteriores têm abordado os efeitos da estimulação elétrica na regeneração nervosa após o reparo tardio. O nervo ciático dos ratos foi seccionado, e o reparo da lesão do nervo foi adiado por diferentes períodos (HUANG *et al.*, 2013). A estimulação elétrica foi aplicada para promover regeneração nervosa após reparos nervosos tardios, com mais de 24 semanas. No entanto, resultados atuais mostraram que o período mais efetivo para realizar a estimulação elétrica é fazendo o reparo nervoso em até um mês (WILLAND *et al.*, 2015).

As transferências de nervo distal têm aumentado ao longo da última década e estão agora em uso no lugar do reparo do enxerto de nervo. Contudo, se a estimulação elétrica pós-cirúrgica também tem efeito sobre as transferências distal de nervo, ainda não foi estabelecido. Num estudo recente com animais em ratos, Elzinga *et al.*, (2015) mostraram que a estimulação elétrica teve efeito positivo na aceleração da regeneração distal, mesmo quando a cirurgia estava atrasada. Esse cenário está intimamente relacionado com o que é comumente encontrado na prática clínica. Por isso, será de grande interesse verificar se os mesmos benefícios podem ser vistos em pacientes que fizeram transferência distal (CHAN *et al.*, 2016).

De acordo com Baptista *et al.*, (2008) a estimulação elétrica diretamente sobre o nervo esmagado de camundongos levou a sinais de atraso do processo de regeneração nervosa, como edema, menor organização da citoarquitetura axonal e menor número de fibras mielinizadas. Segundo os autores, estudos em humanos com o uso da estimulação elétrica no músculo com desnervação crônica também não evidenciou efeito protetor sobre a massa muscular e nenhuma recuperação funcional (KERN *et al.*, 2005).

A estimulação elétrica muscular tem se mostrado eficaz após o reparo de nervos, mas uma investigação mais aprofundada, usando um longo intervalo entre o reparo e a estimulação elétrica é necessária. Isso seria o mais próximo de imitar o cenário de uma clínica de reabilitação e poderia ajudar a definir se o uso da estimulação elétrica muscular pode proporcionar benefícios semelhantes aos observados em um modelo de reparo imediato (WILLAND *et al.*, 2015).

6 CONCLUSÃO

Com o modelo experimental, pôde-se concluir que a estimulação elétrica foi eficiente na regeneração do nervo fibular comum de ratos após a neurorrafia látero-terminal e que não houve diferença estatisticamente significativa entre as correntes utilizadas, e sim, em relação ao tempo de eletroestimulação, que mostrou que o tempo maior de tratamento resultou em melhores resultados.

7 REFERÊNCIAS

Ahlborn P, Schachner M, Irintchev A. One hour electrical stimulation accelerates functional recovery after femoral nerve repair. *Exp. Neurol.* 2007, 208, 137–144.

Akgul T, Gulsoy M, Gulcur HO. Effects of early and delayed laser application on nerve regeneration. *Lasers Med. Sci.*, 2014; 29, 351-57.

Al-Majed AA, Brushart TM, Gordon T. Electrical stimulation accelerates and increases expression of BDNF and trkB mRNA in regenerating rat femoral motoneurons. *Eur. J. Neurosci.* 2000a 12, 4381–4390.

Al-Majed AA, Neumann CM, Brushart TM, Gordon T. Brief electrical stimulation promotes the speed and accuracy of motor axonal regeneration. *J. Neurosci.* 2000b, 20, 2602–2608.

Alrashdan MS, Park JC, Sung MA, Yoo SB, Jahng JW, Lee TH, Kim SJ, Lee JH. Thirty minutes of low intensity electrical stimulation promotes nerve regeneration after sciatic nerve crush injury in a rat model. *Acta Neurol. Belg.* 2010, 110, 168–179,

Asensio-Pinilla E, Udina E, Jaramillo J, Navarro X. Electrical stimulation combined with exercise increase axonal regeneration after peripheral nerve injury. *Exp. Neurol.* 2009, 219, 258–265.

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.

Boyd JG, Gordon T. A dose-dependent facilitation and inhibition of peripheral nerve regeneration by brain-derived neurotrophic factor. *Eur J Neurosci* 2002;15:613–626.

Brushart TM, Jari R, Verge V, Rohde C, Gordon T. Electrical stimulation restores the specificity of sensory axon regeneration. *Exp. Neurol.* 2005, 194, 221–229.

Carandente F, Angeli A, Candiani GB, Crosignani PG, Dammacco F, DE CECCO L. Rhythms in the ovulatory cycle. 2nd: LH, FSH, estradiol and progesterone. *Chronobiologia*, 1989; 16(4): 353-63.

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.

Chan KM, Curran MWT, Gordon T. The use of brief post-surgical low frequency electrical stimulation to enhance nerve regeneration in clinical practice. *Physiol*. 2016 594.13, 3553–3559.

De Medinacelli L, Freed WJ, Wyatt RJ. Na index of the functional condition of rat sciatic nerve based on measurements made from walking tracks. *Exp. Neurol*. 1982, v.77, n.3:634-43

Dourado E. Técnicas microcirúrgicas de reparação nervosa: procedimentos convencionais e alternativos. *Rev. Cir. Traumatol. Buco-Maxilo-Fac*. 2003, v.3, n. 2: 49-54.

Eberhardt KA, Irintchev A, Al-Majed AA, Simova O, Brushart TM, Gordon T, English AW, Schwartz G, Meador W, Sabatier MJ, Mulligan A. Electrical stimulation promotes peripheral axon regeneration by enhanced neuronal neurotrophin signaling. *Dev. Neurobiol*. 2007 67, 158–172.

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

Fenrich K, Gordon T. Canadian Association of Neuroscience review: axonal regeneration in the peripheral and central nervous systems-current issues and advances. *Neurol Sci* 2004; 31:142–156.

Filho ORP, Steffens VA, Santos AB, Lukiantchuki LPA, Moreira RP. Xilazina como pré-medicação para anestesia com tiopental sódico em cães. *Acta Cir. Bras*. 2000 vol.15 n.2, 39-47.

Franz CK, Rutishauser U, Rafuse VF. Intrinsic neuronal properties control selective targeting of regenerating motoneurons. *Brain* 2008.131, 1492–1505,

Franz CK, Rutishauser U, Rafuse VF Polysialylated neural cell adhesionmolecule is necessary for selective targeting of regenerating motor neurons. *J. Neurosci*. 2005. 25, 2081–2091.

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

Ghayemi N, Haghghat A, Amini K, Mohammad R. Functional effect of local administration of glial derived neurotrophic factor combined with inside-out artery graft on sciatic nerve regeneration in rat. *Int. J. Surg.* 2014, v. 12, n. 5, p. 457-463.

Geremia NM, Gordon T, Brushart TM, Al-Majed AA, Verge VM. Electrical stimulation promotes sensory neuron regeneration and growth-associated gene expression. *Exp. Neurol.* 2007 205, 347–359.

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

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, 2000,1135-54.

Gordon T. Electrical stimulation to enhance axon regeneration after peripheral nerve injuries in animal models and humans. *Neurotherapeutics.* 2016, 13:295-310.

Gordon T, Sulaiman OA, Ladak A. Electrical stimulation for improving nerve regeneration: where do we stand? In: Geuna S, Tos P, Battiston B.eds. *Int Rev Neurobiol.* San Diego, CA: Academic Press, 2009, 87:433–444.

Gordon T, Amirjani N, Edwards DC, Chan KM. Brief post-surgical electrical stimulation accelerates axon regeneration and muscle reinnervation without affecting the functional measures in carpal tunnel syndrome patients. *Exp Neurol.* 2010b 223, 192–202.

Hendry JM, Alvarez-Veronesi MC, Snyder-Warwick. Side-to-side nerve bridges support donor axon regeneration into chronically denervated nerves and are associated with characteristic changes in Schwann cell phenotype. *Neurosurgery* 2015;77: 803–813.

Hetzler LE, Sharma N, Tanzer L, Wurster RD, Leonetti J, Marzo SJ, Jones KJ, Foecking EM. Accelerating functional recovery after rat facial nerve injury: effects of gonadal steroids and electrical stimulation. *Otolaryngol. Head Neck Surg.* 2008, 139, 62–67.

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. *Eur J Neurosci*. 2013 38(12):3691–701.

Huang J, Ye Z, Hu X, Lu L, Luo Z. Electrical stimulation induces calcium dependent release of NGF from cultured Schwann cells. *Glia* 2010 58, 622–631.

Huang J, Lu L, Hu X, Ye Z, Peng Y, Yan X, Geng D, Luo Z. Electrical stimulation accelerates motor functional recovery in the rat model of 15-mm sciatic nerve gap bridged by scaffolds with longitudinally oriented microchannels. *Neurorehabil Neural Repair*. 2010 24, 736–745.

Huang J, Hu X, Lu L, Ye Z, Wang Y, Luo Z. Electrical stimulation accelerates motor functional recovery in autograft-repaired 10 mm femoral nerve gap in rats. *J Neurotrauma*. 2009 26, 1805–1813.

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.

Kern H, Salmons S, Mayr W, Rossini K, Carraro U. Recovery of long-term denervated human muscles induced by electrical stimulation. *Muscle Nerve*. 2005;31(1):98-101.

Koppes AN, Nordberg AL, Paolillo GM, Goodsell NM, Darwish HA, Zhang L, Thompson DM. Electrical stimulation of Schwann cells promotes sustained increases in neurite outgrowth. *Tissue Eng*. 2014a A 20, 494–506.

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

Ladak A, Schembri P, Olson J. Side-to-side nerve grafts sustain chronically denervated peripheral nerve pathways during axon regeneration and result in improved functional reinnervation. *Neurosurgery* 2011; 68:1654–1666.

Lu MC, Ho CY, Hsu SF, Lee HC, Lin JH, Yao CH, Chen YS. Effects of electrical stimulation at different frequencies on regeneration of transected peripheral nerve. *Neurorehabil. Neural Repair* 2008, 22, 367–373.

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

Maciel FO, Viterbo F, Chinaque LFC, Souza BM. Effect of electrical stimulation of the cranial tibial muscle after end-to-side neuroorrhaphy of the peroneal nerve in rats. *Acta Cirúrgica Brasileira*. 2013 - v28 (1):39-47.

Mazzer PYCN. Avaliação qualitativa e quantitativa das lesões agudas por esmagamento do nervo isquiático do rato. *Acta Ortop. Bras.* 2006. São Paulo, v.14, nº4:220-225.

McLean NA, Popescu BF, Gordon T, Zochodne DW, Verge VM. Delayed nerve stimulation promotes axon-protective neurofilament phosphorylation, accelerates immune cell clearance and enhances remyelination in vivo in focally demyelinated nerves. *PLoS One*. 2014 9,160-174.

Morgan CJA, Mofeez A, Brandner B. Acute effects of ketamine on memory systems and psychotic symptoms in healthy volunteers. *Neuropsychopharmacology*. 2004 29:208-18.

Murray, B. Trauma of the nervous system: Pheripheral nerve trauma. In: Bradley WG (Ed.). *Neurology in Clinical Praticte: Principles of diagnosis and management*. 4. ed. London: Butterworth Heinemann, 2005. p. 1179-1198.

Mohammadi R, Saadati A. Influence of insulin-like growth factor I on nerve regeneration using allografts: a sciatic nerve model. *Journal of Craniofacial Surgery*. 2014; 25(4):1510-14.

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

Nix WA, Hopf HC. Electrical stimulation of regenerating nerve and its effect on motor recovery. *Brain Res*. 1983 272, 21–25.

Oliveira LS, Sobral LL, Takeda SY, Betini J, Guirro RR, Somazz MC, Teodori RM. Electrical stimulation and swimming in the acute phase of axonotmesis: their influence on nerve regeneration and functional recovery. *Rev Neurol*. 2008. v.47:11-15.

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

Rang HP, Dale MM, Ritter JM. Farmacologia. 5ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004.

Rovak JM, Cederna PS, Kuzon WM. End-to-side 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.

Salvini TF, Durigan JLQ, Peviani SM, Russo TL. Efeitos da eletroestimulação e do alongamento muscular sobre a adaptação do músculo desnervado – implicações para a fisioterapia. *Rev Bras Fisioter*. 2012 São Carlos, v. 16, 3,175-83.

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.

Schachner M. BDNF/TrkB signaling regulates HNK-1 carbohydrate expression. in regenerating motor nerves and promotes functional recovery after peripheral nerve repair. *Exp. Neurol*. 2006, 198, 500–510.

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

Selkowitz DM. High frequency electrical stimulation in muscle strengthening. *Am J Sports Med*. 1989; 17:103 –111.

Sharma N, Coughlin L, Porter RG, Tanzer L, Wurster RD, Marzo SJ, Jones KJ, Foeking EM. Effects of electrical stimulation and gonadal steroids on rat facial nerve regenerative properties. *Restor. Neurol. Neurosci*. 2009, 27, 633–644.

Sharma N, Marzo SJ, Jones KJ, Foeking EM. Electrical stimulation and testosterone differentially enhance expression of regeneration-associated genes. *Exp. Neurol*. 2010a, 223, 183–191.

Sharma N, Moeller CW, Marzo SJ, Jones KJ, Foeking EM. Combinatorial treatments enhance recovery following facial nerve crush. *Laryngoscope*, 2010b 120, 1523–1530.

Silva CK e Camargo EA. Mecanismos envolvidos na regeneração de lesões nervosas periféricas. *Revista Saúde e Pesquisa*, 2010, 3, 1, 93-98.

Singh B, Xu QG, Franz CK, Zhang R, Dalton C, Gordon T, Verge VM, Midha R, Zochodne DW. Accelerated axon outgrowth, guidance, and target reinnervation across nerve transection gaps following a brief electrical stimulation paradigm. *J. Neurosurg.* 2012, 116, 498–512.

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, Threlkeld AJ. Augmenting Voluntary Torque of Healthy Muscle by Optimization of Electrical Stimulation. *Phys Ther.* 1988; 68: 333-7.

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

Sulaiman OAR, Midha R, Gordon T. Pathophysiology of surgical nerve disorders. In: Winn HR, ed. *Youmans neurological surgery.* Philadelphia, PA: Saunders/Elsevier, 2011, 2368–2379.

Sunderland S. *Nerve and nerve injuries.* London: Churchill Livingstone, 1978.

Sunderland S, Ray LJ. Denervation changes in mammalian striated muscles. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1950, 13: 159–77.

Taylor CA, Braza D, Rice JB, Dillingham T. The incidence of peripheral nerve injury in extremity trauma. *Am J Phys Med Rehabil.* 2008, 87:381–385.

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

Viterbo F, Trindade JC, Hoshino K, Mazzoni Neto A. End-to-side neurorrhaphy with removal of the epineurial sheath: an experimental study in rats. *Plastic and Reconstructive Surgery.* 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 epineurial sheath: experimental study in rats. *British Journal of Plastic Surgery.* 1994b; 47:75-80.

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

Wan LD, Xia R, Ding WL. Electrical stimulation enhanced remyelination of injured sciatic nerves by increasing neurotrophins. *Neuroscience*. 2010, 169, 1029–1038.

Ward AR, Lucas-Toumbourou S. Lowering of sensory, motor and pain-tolerance thresholds with burst duration using kHz frequency alternating current electrical stimulation. *Archives of Physical Medicine and Rehabilitation*. 2007 88(8). 1036-1041.

Willand MP, Chiang CD, Zhang JJ, Kemp SWP, Borschel GH, Gordon T. Daily electrical muscle stimulation enhances functional recovery following nerve transection and repair in rats. *Neurorehabil Neural Repair*. 2015. 29:690–700.

Willand MP, Holmes M, Bain JR, Fahnestock M, De Bruin H. Determining the effects of electrical stimulation on functional recovery of denervated rat gastrocnemius muscle using motor unit number estimation. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc: 2011a*, 1977–1980.

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.

Wood MD, Kim H, Bilbily A. GDNF released from microspheres enhances nerve regeneration after delayed repair. *Muscle Nerve* 2012 46:122–124.

Yeh CC, Lin YC, Tsai FJ, Huang CY, Yao CH, Chen YS. Timing of applying electrical stimulation is an important factor deciding the success rate and maturity of regenerating rat sciatic nerves. *Neurorehabil. Neural Repair*. 2010 24, 730–735.

ANEXOS

Certificado de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE BOTUCATU
FACULDADE DE MEDICINA

unesp

FACULDADE DE MEDICINA
FMB
1963
BOTUCATU

Comitê de Ética no Uso de Animais

Criada através da Portaria CFM nº 611 de 13/12/2012



Certificado

CERTIFICAMOS que o (Protocolo CEUA 1043-2013) "Efeito da estimulação elétrica de média frequência na regeneração nervosa após neurotrafia término-lateral do nervo fibular de ratos", a ser conduzido por Carlos Henrique Fachin Bortoluci, orientado pelo Prof. Dr. Fausto Viterbo de Oliveira Neto, está de acordo com o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA, com a ressalva de que os "ratos" são provenientes de Biotério convencional, sem condições de atestar a Sanidade dos mesmos.

Projeto de Pesquisa aprovado em reunião da CEUA em 26/09/2013


Prof. Adjunto Katashi Okoshi
Presidente da CEUA


Alberto Sartos Capelluppi
Secretário da CEUA

Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu - S.P. CEP: 18.618-970 Fone: (14) 3880-1609/3890-1609 e-mail: secretaria_capelluppi@fmb.unesp.br

Planilhas estatística

Índice funcional 45 dias

DOCTORADO CARLOS.pzf: 1way ANOVA of Análise Funcional - Índice Funcional - 45 dias - Thu Jan 28 14:55:05 2017

1way ANOVA						
1	Table Analyzed	Análise Funcional - Índice Funcional - 45				
2						
3	One-way analysis of variance					
4	P value	< 0.0001				
5	P value summary	***				
6	Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes				
7	Number of groups	6				
8	F	650.6				
9	R squared	0.9837				
10						
11	Bartlett's test for equal variances					
12	Bartlett's statistic (corrected)	20.34				
13	P value	0.0011				
14	P value summary	**				
15	Do the variances differ signif. (P < 0.05)	Yes				
16						
17	ANOVA Table	SS	df	MS		
18	Treatment (between columns)	46590	5	9318		
19	Residual (within columns)	773.4	54	14.32		
20	Total	47360	59			
21						
22	Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	Significant	Summary	95% CI of diff
23	GCI vs GNLT45	57.58	48.12	Yes	***	52.58 to 62.59
24	GCI vs GEA45	55.90	46.71	Yes	***	50.89 to 60.91
25	GCI vs GER45	55.09	46.04	Yes	***	50.09 to 60.10
26	GCI vs GCF45	0.4910	0.4103	No	ns	-4.516 to 5.498
27	GCI vs GD45	66.67	55.71	Yes	***	61.66 to 71.68
28	GNLT45 vs GEA45	-1.685	1.408	No	ns	-6.692 to 3.322
29	GNLT45 vs GER45	-2.490	2.081	No	ns	-7.497 to 2.517
30	GNLT45 vs GCF45	-57.09	47.71	Yes	***	-62.10 to -52.08
31	GNLT45 vs GD45	9.085	7.591	Yes	***	4.078 to 14.09
32	GEA45 vs GER45	-0.8050	0.6727	No	ns	-5.812 to 4.202
33	GEA45 vs GCF45	-55.41	46.30	Yes	***	-60.41 to -50.41
34	GEA45 vs GD45	10.77	8.999	Yes	***	5.763 to 15.78

Índice funcional 90 dias

DOUTORADO CARLOS.pzf:1way ANOVA of Análise Funcional - Índice Funcional - 90 dias - Thu Jan 26 14:53:53 2017

1way ANOVA						
1	Table Analyzed	Análise Funcional - Índice Funcional - 90				
2						
3	One-way analysis of variance					
4	P value	< 0.0001				
5	P value summary	***				
6	Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes				
7	Number of groups	6				
8	F	298.3				
9	R squared	0.9651				
10						
11	Bartlett's test for equal variances					
12	Bartlett's statistic (corrected)	56.69				
13	P value	< 0.0001				
14	P value summary	***				
15	Do the variances differ signif. (P < 0.05)	Yes				
16						
17	ANOVA Table	SS	df	MS		
18	Treatment (between columns)	70550	5	14110		
19	Residual (within columns)	2554	54	47.30		
20	Total	73100	59			
21						
22	Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	Significant?	Summary	95% CI of diff
23	GCI vs GNLT90	75.90	34.90	Yes	***	66.80 to 85.00
24	GCI vs GEA90	45.38	20.87	Yes	***	36.28 to 54.48
25	GCI vs GER90	45.13	20.75	Yes	***	36.03 to 54.23
26	GCI vs GCF90	0.9310	0.428	No	ns	-8.168 to 10.03
27	GCI vs GD90	91.41	42.03	Yes	***	82.31 to 100.5
28	GNLT90 vs GEA90	-30.52	14.03	Yes	***	-39.62 to -21.4
29	GNLT90 vs GER90	-30.77	14.15	Yes	***	-39.87 to -21.6
30	GNLT90 vs GCF90	-74.97	34.47	Yes	***	-84.07 to -65.8
31	GNLT90 vs GD90	15.51	7.133	Yes	***	6.414 to 24.61
32	GEA90 vs GER90	-0.2500	0.1150	No	ns	-9.349 to 8.849
33	GEA90 vs GCF90	-44.45	20.44	Yes	***	-53.55 to -35.3
34	GEA90 vs GD90	46.03	21.17	Yes	***	36.93 to 55.13

Massa corporal inicial 45 dias

DOUTORADO CARLOS.pzf:1way ANOVA of Massa Inicial (g) - 45 dias - Thu Jan 28 14:50:55 2017

1way ANOVA						
1	Table Analyzed	Massa Inicial (g) - 45				
2						
3	One-way analysis of variance					
4	P value	0.9497				
5	P value summary	ns				
6	Are means signif. different? (P < 0.05)	No				
7	Number of groups	6				
8	F	0.2258				
9	R squared	0.02048				
10						
11	Bartlett's test for equal variances					
12	Bartlett's statistic (corrected)	4.382				
13	P value	0.4958				
14	P value summary	ns				
15	Do the variances differ signif. (P < 0.05)	No				
16						
17	ANOVA Table	SS	df	MS		
18	Treatment (between columns)	107.5	5	21.51		
19	Residual (within columns)	5142	54	95.23		
20	Total	5250	59			
21						
22	Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	Significant?	Summary	95% CI of diff
23	GCI vs GNLT45	-3.900	1.264	No	ns	-16.81 to 9.010
24	GCI vs GEA45	-1.400	0.4537	No	ns	-14.31 to 11.51
25	GCI vs GER45	-1.100	0.3565	No	ns	-14.01 to 11.81
26	GCI vs GCF45	-3.000	0.9722	No	ns	-15.91 to 9.910
27	GCI vs GD45	-3.000	0.9722	No	ns	-15.91 to 9.910
28	GNLT45 vs GEA45	2.500	0.8101	No	ns	-10.41 to 15.41
29	GNLT45 vs GER45	2.800	0.9074	No	ns	-10.11 to 15.71
30	GNLT45 vs GCF45	0.9000	0.2917	No	ns	-12.01 to 13.81
31	GNLT45 vs GD45	0.9000	0.2917	No	ns	-12.01 to 13.81
32	GEA45 vs GER45	0.3000	0.0972	No	ns	-12.61 to 13.21
33	GEA45 vs GCF45	-1.600	0.5185	No	ns	-14.51 to 11.31
34	GEA45 vs GD45	-1.600	0.5185	No	ns	-14.51 to 11.31

Massa corporal final 45 dias

DOUTORADO CARLOS.pzf:1way ANOVA of Massa Final (g) - 45 dias - Thu Jan 28 14:52:25 2017

1way ANOVA						
1	Table Analyzed	Massa Final (g) - 45				
2						
3	One-way analysis of variance					
4	P value	0.9571				
5	P value summary	ns				
6	Are means signif. different? (P < 0.05)	No				
7	Number of groups	5				
8	F	0.1606				
9	R squared	0.01407				
10						
11	Bartlett's test for equal variances					
12	Bartlett's statistic (corrected)	0.4531				
13	P value	0.9779				
14	P value summary	ns				
15	Do the variances differ signif. (P < 0.05)	No				
16						
17	ANOVA Table	SS	df	MS		
18	Treatment (between columns)	337.9	4	84.47		
19	Residual (within columns)	23670	45	526.0		
20	Total	24010	49			
21						
22	Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	Significant?	Summary	95% CI of diff
23	GCI vs GNLT45	-373.6	0.0000	No	ns	0.0000 to 0.0000
24	GCI vs GEA45	-369.3	0.0000	No	ns	0.0000 to 0.0000
25	GCI vs GER45	-365.4	0.0000	No	ns	0.0000 to 0.0000
26	GCI vs GCF45	-369.0	0.0000	No	ns	0.0000 to 0.0000
27	GCI vs GD45	-369.3	0.0000	No	ns	0.0000 to 0.0000
28	GNLT45 vs GEA45	4.300	0.5929	No	ns	-26.27 to 34.87
29	GNLT45 vs GER45	8.200	1.131	No	ns	-22.37 to 38.77
30	GNLT45 vs GCF45	4.600	0.6342	No	ns	-25.97 to 35.17
31	GNLT45 vs GD45	4.300	0.5929	No	ns	-26.27 to 34.87
32	GEA45 vs GER45	3.900	0.5377	No	ns	-26.67 to 34.47
33	GEA45 vs GCF45	0.3000	0.04136	No	ns	-30.27 to 30.87
34	GEA45 vs GD45	0.0000	0.0000	No	ns	-30.57 to 30.57

Massa corporal inicial 90 dias

DOUTORADO CARLOS.pzf:1way ANOVA of Massa Inicial (g) - 90 dias - Thu Jan 26 14:51:44 2017

1way ANOVA						
1	Table Analyzed	Massa Inicial (g) - 90				
2						
3	One-way analysis of variance					
4	P value	0.4430				
5	P value summary	ns				
6	Are means signif. different? (P < 0.05)	No				
7	Number of groups	6				
8	F	0.9724				
9	R squared	0.08260				
10						
11	Bartlett's test for equal variances					
12	Bartlett's statistic (corrected)	1.974				
13	P value	0.8528				
14	P value summary	ns				
15	Do the variances differ signif. (P < 0.05)	No				
16						
17	ANOVA Table	SS	df	MS		
18	Treatment (between columns)	340.5	5	68.10		
19	Residual (within columns)	3782	54	70.03		
20	Total	4122	59			
21						
22	Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	Significant?	Summary	95% CI of diff
23	GCI vs GNLT90	-5.400	2.041	No	ns	-16.47 to 5.672
24	GCI vs GEA90	-0.2000	0.07558	No	ns	-11.27 to 10.87
25	GCI vs GER90	-6.000	2.267	No	ns	-17.07 to 5.072
26	GCI vs GCF90	-3.700	1.398	No	ns	-14.77 to 7.372
27	GCI vs GD90	-4.600	1.738	No	ns	-15.67 to 6.472
28	GNLT90 vs GEA90	5.200	1.965	No	ns	-5.872 to 16.27
29	GNLT90 vs GER90	-0.6000	0.2267	No	ns	-11.67 to 10.47
30	GNLT90 vs GCF90	1.700	0.6424	No	ns	-9.372 to 12.77
31	GNLT90 vs GD90	0.8000	0.3023	No	ns	-10.27 to 11.87
32	GEA90 vs GER90	-5.800	2.192	No	ns	-16.87 to 5.272
33	GEA90 vs GCF90	-3.500	1.323	No	ns	-14.57 to 7.572
34	GEA90 vs GD90	-4.400	1.663	No	ns	-15.47 to 6.672

Massa corporal final 90 dias

DOUTORADO CARLOS.pzf: 1way ANOVA of Massa Final (g) - 90 dias - Thu Jan 26 14:53:11 2017

1way ANOVA						
1	Table Analyzed	Massa Final (g) - 90				
2						
3	One-way analysis of variance					
4	P value	0.2051				
5	P value summary	ns				
6	Are means signif. different? (P < 0.05)	No				
7	Number of groups	5				
8	F	1.546				
9	R squared	0.1208				
10						
11	Bartlett's test for equal variances					
12	Bartlett's statistic (corrected)	0.3724				
13	P value	0.9847				
14	P value summary	ns				
15	Do the variances differ signif. (P < 0.05)	No				
16						
17	ANOVA Table	SS	df	MS		
18	Treatment (between columns)	580.1	4	145.0		
19	Residual (within columns)	4221	45	93.80		
20	Total	4801	49			
21						
22	Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	Significant?	Summary	95% CI of diff
23	GCI vs GNLT90	-411.2	0.0000	No	ns	0.0000 to 0.0000
24	GCI vs GEA90	-420.6	0.0000	No	ns	0.0000 to 0.0000
25	GCI vs GER90	-415.1	0.0000	No	ns	0.0000 to 0.0000
26	GCI vs GCF90	-419.0	0.0000	No	ns	0.0000 to 0.0000
27	GCI vs GD90	-414.0	0.0000	No	ns	0.0000 to 0.0000
28	GNLT90 vs GEA90	-9.400	3.069	No	ns	-22.31 to 3.508
29	GNLT90 vs GER90	-3.900	1.273	No	ns	-16.81 to 9.008
30	GNLT90 vs GCF90	-7.800	2.547	No	ns	-20.71 to 5.108
31	GNLT90 vs GD90	-2.800	0.9142	No	ns	-15.71 to 10.11
32	GEA90 vs GER90	5.500	1.796	No	ns	-7.408 to 18.41
33	GEA90 vs GCF90	1.600	0.5224	No	ns	-11.31 to 14.51
34	GEA90 vs GD90	6.600	2.155	No	ns	-6.308 to 19.51

Amplitude 45 dias

DOUTORADO CARLOS.pzf:1way ANOVA of Amplitude (mV) - 45 dias - Thu Jan 26 14:50:10 2017

1way ANOVA						
1	Table Analyzed	Amplitude (mV) - 45				
2						
3	One-way analysis of variance					
4	P value	< 0.0001				
5	P value summary	***				
6	Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes				
7	Number of groups	6				
8	F	587.7				
9	R squared	0.9633				
10						
11	Bartlett's test for equal variances					
12	Bartlett's statistic (corrected)					
13	P value					
14	P value summary	ns				
15	Do the variances differ signif. (P < 0.05)	No				
16						
17	ANOVA Table	SS	df	MS		
18	Treatment (between columns)	7111	5	1422		
19	Residual (within columns)	271.0	112	2.420		
20	Total	7382	117			
21						
22	Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	Significant?	Summary	95% CI of diff
23	GCI vs GNLT45	14.45	40.43	Yes	***	12.98 to 15.91
24	GCI vs GEA45	6.634	18.56	Yes	***	5.167 to 8.101
25	GCI vs GER45	6.706	18.76	Yes	***	5.239 to 8.173
26	GCI vs GCF45	-0.7180	2.064	No	ns	-2.146 to 0.709
27	GCI vs GD45	20.08	60.30	Yes	***	18.71 to 21.45
28	GNLT45 vs GEA45	-7.813	21.31	Yes	***	-9.318 to -6.308
29	GNLT45 vs GER45	-7.741	21.11	Yes	***	-9.246 to -6.236
30	GNLT45 vs GCF45	-15.17	42.43	Yes	***	-16.63 to -13.71
31	GNLT45 vs GD45	5.635	16.43	Yes	***	4.227 to 7.043
32	GEA45 vs GER45	0.07222	0.1970	No	ns	-1.433 to 1.573
33	GEA45 vs GCF45	-7.352	20.57	Yes	***	-8.819 to -5.885
34	GEA45 vs GD45	13.45	39.21	Yes	***	12.04 to 14.86

Latência 45 dias

DOUTORADO CARLOS.pzf:1way ANOVA of Latência (ms) - 45 dias - Thu Jan 26 14:49:25 2017

1way ANOVA						
1	Table Analyzed	Latência (ms) - 45				
2						
3	One-way analysis of variance					
4	P value	< 0.0001				
5	P value summary	***				
6	Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes				
7	Number of groups	6				
8	F	19020				
9	R squared	0.9989				
10						
11	Bartlett's test for equal variances					
12	Bartlett's statistic (corrected)					
13	P value					
14	P value summary	ns				
15	Do the variances differ signif. (P < 0.05)	No				
16						
17	ANOVA Table	SS	df	MS		
18	Treatment (between columns)	1107	5	221.4		
19	Residual (within columns)	1.257	108	0.01164		
20	Total	1108	113			
21						
22	Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	Significant?	Summary	95% CI of diff
23	GCI vs GNLT45	-0.2330	9.259	Yes	***	-0.3364 to -0.1296
24	GCI vs GEA45	-0.1601	6.360	Yes	***	-0.2635 to -0.05664
25	GCI vs GER45	-0.2850	11.81	Yes	***	-0.3841 to -0.1859
26	GCI vs GCF45	0.02600	1.078	No	ns	-0.07314 to 0.1251
27	GCI vs GD45	-8.313	344.6	Yes	***	-8.412 to -8.214
28	GNLT45 vs GEA45	0.07294	2.788	No	ns	-0.03459 to 0.1805
29	GNLT45 vs GER45	-0.05200	2.066	No	ns	-0.1554 to 0.05142
30	GNLT45 vs GCF45	0.2590	10.29	Yes	***	0.1556 to 0.3624
31	GNLT45 vs GD45	-8.080	321.1	Yes	***	-8.183 to -7.977
32	GEA45 vs GER45	-0.1249	4.965	Yes	**	-0.2284 to -0.02152
33	GEA45 vs GCF45	0.1861	7.393	Yes	***	0.08264 to 0.2895
34	GEA45 vs GD45	-8.153	324.0	Yes	***	-8.256 to -8.050

Amplitude 90 dias

DOUTORADO CARLOS.pzf:1way ANOVA of Amplitude (mV) - 90 dias - Thu Jan 26 14:48:26 2017

1way ANOVA						
1	Table Analyzed	Amplitude (mV) - 90				
2						
3	One-way analysis of variance					
4	P value	< 0.0001				
5	P value summary	***				
6	Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes				
7	Number of groups	6				
8	F	255.3				
9	R squared	0.9076				
10						
11	Bartlett's test for equal variances					
12	Bartlett's statistic (corrected)					
13	P value					
14	P value summary	ns				
15	Do the variances differ signif. (P < 0.05)	No				
16						
17	ANOVA Table	SS	df	MS		
18	Treatment (between columns)	7156	5	1431		
19	Residual (within columns)	728.7	130	5.605		
20	Total	7885	135			
21						
22	Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	Significant?	Summary	95% CI of diff
23	GCI vs GNLT90	13.44	25.38	Yes	***	11.27 to 15.61
24	GCI vs GEA90	7.245	14.29	Yes	***	5.169 to 9.321
25	GCI vs GER90	7.465	14.73	Yes	***	5.389 to 9.541
26	GCI vs GCF90	-0.5655	1.116	No	ns	-2.642 to 1.511
27	GCI vs GD90	20.08	39.62	Yes	***	18.01 to 22.16
28	GNLT90 vs GEA90	-6.194	12.22	Yes	***	-8.270 to -4.118
29	GNLT90 vs GER90	-5.974	11.79	Yes	***	-8.050 to -3.898
30	GNLT90 vs GCF90	-14.00	27.63	Yes	***	-16.08 to -11.93
31	GNLT90 vs GD90	6.643	13.11	Yes	***	4.567 to 8.719
32	GEA90 vs GER90	0.2200	0.4552	No	ns	-1.759 to 2.199
33	GEA90 vs GCF90	-7.811	16.16	Yes	***	-9.790 to -5.831
34	GEA90 vs GD90	12.84	26.56	Yes	***	10.86 to 14.82

Latência 90 dias

DOUTORADO CARLOS.pzf:1way ANOVA of Latência (ms) - 90 dias - Thu Jan 26 14:47:14 2017

1way ANOVA						
1	Table Analyzed	Latência (ms) - 90				
2						
3	One-way analysis of variance					
4	P value	< 0.0001				
5	P value summary	***				
6	Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes				
7	Number of groups	6				
8	F	9338				
9	R squared	0.9973				
10						
11	Bartlett's test for equal variances					
12	Bartlett's statistic (corrected)					
13	P value					
14	P value summary	ns				
15	Do the variances differ signif. (P < 0.05)	No				
16						
17	ANOVA Table	SS	df	MS		
18	Treatment (between columns)	1311	5	262.1		
19	Residual (within columns)	3.537	126	0.02807		
20	Total	1314	131			
21						
22	Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	Significant?	Summary	95% CI of diff
23	GCI vs GNLT90	-0.4915	13.12	Yes	***	-0.6449 to -0.3381
24	GCI vs GEA90	-0.1351	3.766	No	ns	-0.2820 to 0.01183
25	GCI vs GER90	-0.1725	4.604	Yes	*	-0.3259 to -0.01905
26	GCI vs GCF90	-0.002583	0.07202	No	ns	-0.1495 to 0.1443
27	GCI vs GD90	-8.313	231.8	Yes	***	-8.460 to -8.166
28	GNLT90 vs GEA90	0.3564	9.937	Yes	***	0.2095 to 0.5033
29	GNLT90 vs GER90	0.3190	8.515	Yes	***	0.1656 to 0.4724
30	GNLT90 vs GCF90	0.4889	13.63	Yes	***	0.3420 to 0.6358
31	GNLT90 vs GD90	-7.822	218.1	Yes	***	-7.968 to -7.675
32	GEA90 vs GER90	-0.03742	1.043	No	ns	-0.1843 to 0.1095
33	GEA90 vs GCF90	0.1325	3.874	No	ns	-0.007576 to 0.2726
34	GEA90 vs GD90	-8.178	239.1	Yes	***	-8.318 to -8.038

Área da fibra nervosa 45 dias

DOUTORADO CARLOS.pzf.1way ANOVA of Fibras Nervosas - Área (um²) - 45 dias - Thu Jan 28 15:01:24 2017

1way ANOVA						
1	Table Analyzed	Fibras Nervosas - Área (um²) - 45				
2						
3	One-way analysis of variance					
4	P value	< 0.0001				
5	P value summary	***				
6	Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes				
7	Number of groups	6				
8	F	569.6				
9	R squared	0.9814				
10						
11	Bartlett's test for equal variances					
12	Bartlett's statistic (corrected)					
13	P value					
14	P value summary	ns				
15	Do the variances differ signif. (P < 0.05)	No				
16						
17	ANOVA Table	SS	df	MS		
18	Treatment (between columns)	9842	5	1968		
19	Residual (within columns)	186.6	54	3.456		
20	Total	10030	59			
21						
22	Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	Significant?	Summary	95% CI of diff
23	GCI vs GNLT45	4.194	7.134	Yes	***	1.734 to 6.654
24	GCI vs GEA45	-2.807	4.775	Yes	*	-5.267 to -0.3475
25	GCI vs GER45	-2.603	4.428	Yes	*	-5.063 to -0.1435
26	GCI vs GCF45	-24.21	41.18	Yes	***	-26.67 to -21.75
27	GCI vs GD45	19.29	32.82	Yes	***	16.83 to 21.75
28	GNLT45 vs GEA45	-7.001	11.91	Yes	***	-9.461 to -4.541
29	GNLT45 vs GER45	-6.797	11.56	Yes	***	-9.257 to -4.337
30	GNLT45 vs GCF45	-28.40	48.31	Yes	***	-30.86 to -25.94
31	GNLT45 vs GD45	15.10	25.68	Yes	***	12.64 to 17.56
32	GEA45 vs GER45	0.2040	0.3470	No	ns	-2.256 to 2.664
33	GEA45 vs GCF45	-21.40	36.40	Yes	***	-23.86 to -18.94
34	GEA45 vs GD45	22.10	37.59	Yes	***	19.64 to 24.56

Área da fibra nervosa 90 dias

DOUTORADO CARLOS.pzf:1way ANOVA of Fibras Nervosas - Área (um²) - 90 dias - Thu Jan 26 14:57:44 2017

1way ANOVA						
1	Table Analyzed	Fibras Nervosas - Área (um²) - 90				
2						
3	One-way analysis of variance					
4	P value	< 0.0001				
5	P value summary	***				
6	Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes				
7	Number of groups	6				
8	F	899.1				
9	R squared	0.9881				
10						
11	Bartlett's test for equal variances					
12	Bartlett's statistic (corrected)					
13	P value					
14	P value summary	ns				
15	Do the variances differ signif. (P < 0.05)	No				
16						
17	ANOVA Table	SS	df	MS		
18	Treatment (between columns)	13970	5	2795		
19	Residual (within columns)	167.9	54	3.108		
20	Total	14140	59			
21						
22	Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	Significant?	Summary	95% CI of diff
23	GCI vs GNLT90	0.4600	0.8251	No	ns	-1.873 to 2.793
24	GCI vs GEA90	-6.072	10.89	Yes	***	-8.405 to -3.739
25	GCI vs GER90	-6.115	10.97	Yes	***	-8.448 to -3.782
26	GCI vs GCF90	-32.47	58.23	Yes	***	-34.80 to -30.13
27	GCI vs GD90	19.29	34.60	Yes	***	16.96 to 21.63
28	GNLT90 vs GEA90	-6.532	11.72	Yes	***	-8.865 to -4.199
29	GNLT90 vs GER90	-6.575	11.79	Yes	***	-8.908 to -4.242
30	GNLT90 vs GCF90	-32.93	59.06	Yes	***	-35.26 to -30.59
31	GNLT90 vs GD90	18.83	33.78	Yes	***	16.50 to 21.17
32	GEA90 vs GER90	-0.04300	0.0771	No	ns	-2.376 to 2.290
33	GEA90 vs GCF90	-26.39	47.34	Yes	***	-28.73 to -24.06
34	GEA90 vs GD90	25.37	45.50	Yes	***	23.03 to 27.70

Diâmetro da fibra nervosa 45 dias

DOUTORADO CARLOS.pzf:1way ANOVA of Fibras Nervosas - Diâmetro (um) - 45 dias - Thu Jan 28 15:03:12 2017

1way ANOVA						
1	Table Analyzed	Fibras Nervosas - Diâmetro (um) - 45				
2						
3	One-way analysis of variance					
4	P value	< 0.0001				
5	P value summary	***				
6	Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes				
7	Number of groups	6				
8	F	500.4				
9	R squared	0.9789				
10						
11	Bartlett's test for equal variances					
12	Bartlett's statistic (corrected)					
13	P value					
14	P value summary	ns				
15	Do the variances differ signif. (P < 0.05)	No				
16						
17	ANOVA Table	SS	df	MS		
18	Treatment (between columns)	327.9	5	65.58		
19	Residual (within columns)	7.077	54	0.1311		
20	Total	335.0	59			
21						
22	Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	Significant?	Summary	95% CI of diff
23	GCI vs GNLT45	0.4160	3.634	No	ns	-0.06295 to 0.894
24	GCI vs GEA45	-0.6550	5.722	Yes	**	-1.134 to -0.1761
25	GCI vs GER45	-0.6700	5.853	Yes	**	-1.149 to -0.1911
26	GCI vs GCF45	-4.309	37.64	Yes	***	-4.788 to -3.830
27	GCI vs GD45	3.683	32.17	Yes	***	3.204 to 4.162
28	GNLT45 vs GEA45	-1.071	9.355	Yes	***	-1.550 to -0.5921
29	GNLT45 vs GER45	-1.086	9.486	Yes	***	-1.565 to -0.6071
30	GNLT45 vs GCF45	-4.725	41.27	Yes	***	-5.204 to -4.246
31	GNLT45 vs GD45	3.267	28.54	Yes	***	2.788 to 3.746
32	GEA45 vs GER45	-0.01500	0.1310	No	ns	-0.4939 to 0.4639
33	GEA45 vs GCF45	-3.654	31.92	Yes	***	-4.133 to -3.175
34	GEA45 vs GD45	4.338	37.89	Yes	***	3.859 to 4.817

Diâmetro da fibra nervosa 90 dias

DOUTORADO CARLOS.pzf:1way ANOVA of Fibras Nervosas - Diâmetro (um) - 90 dias - Thu Jan 26 15:08:37 2017

1way ANOVA						
1	Table Analyzed	Fibras Nervosas - Diâmetro (um) - 90				
2						
3	One-way analysis of variance					
4	P value	< 0.0001				
5	P value summary	***				
6	Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes				
7	Number of groups	6				
8	F	647.1				
9	R squared	0.9836				
10						
11	Bartlett's test for equal variances					
12	Bartlett's statistic (corrected)					
13	P value					
14	P value summary	ns				
15	Do the variances differ signif. (P < 0.05)	No				
16						
17	ANOVA Table	SS	df	MS		
18	Treatment (between columns)	525.0	5	105.0		
19	Residual (within columns)	8.762	54	0.1623		
20	Total	533.7	59			
21						
22	Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	Significant?	Summary	95% CI of diff
23	GCI vs GNLT90	0.05100	0.4004	No	ns	-0.4819 to 0.583
24	GCI vs GEA90	-1.370	10.76	Yes	***	-1.903 to -0.837
25	GCI vs GER90	-1.349	10.59	Yes	***	-1.882 to -0.816
26	GCI vs GCF90	-6.233	48.93	Yes	***	-6.766 to -5.700
27	GCI vs GD90	3.783	29.70	Yes	***	3.250 to 4.316
28	GNLT90 vs GEA90	-1.421	11.16	Yes	***	-1.954 to -0.888
29	GNLT90 vs GER90	-1.400	10.99	Yes	***	-1.933 to -0.867
30	GNLT90 vs GCF90	-6.284	49.33	Yes	***	-6.817 to -5.751
31	GNLT90 vs GD90	3.732	29.30	Yes	***	3.199 to 4.265
32	GEA90 vs GER90	0.02100	0.1649	No	ns	-0.5119 to 0.553
33	GEA90 vs GCF90	-4.863	38.18	Yes	***	-5.396 to -4.330
34	GEA90 vs GD90	5.153	40.45	Yes	***	4.620 to 5.686

Área do axônio 45 dias

DOUTORADO CARLOS.pzf:1way ANOVA of Axônios - Área (um²) - 45 dias - Thu Jan 26 15:02:02 2017

1way ANOVA						
1	Table Analyzed	Axônios - Área (um²) - 45				
2						
3	One-way analysis of variance					
4	P value	< 0.0001				
5	P value summary	***				
6	Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes				
7	Number of groups	6				
8	F	280.7				
9	R squared	0.9629				
10						
11	Bartlett's test for equal variances					
12	Bartlett's statistic (corrected)					
13	P value					
14	P value summary	ns				
15	Do the variances differ signif. (P < 0.05)	No				
16						
17	ANOVA Table	SS	df	MS		
18	Treatment (between columns)	1164	5	232.9		
19	Residual (within columns)	44.81	54	0.8298		
20	Total	1209	59			
21						
22	Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	Significant?	Summary	95% CI of diff
23	GCI vs GNLT45	0.8790	3.051	No	ns	-0.3262 to 2.084
24	GCI vs GEA45	-0.5920	2.055	No	ns	-1.797 to 0.6132
25	GCI vs GER45	-0.5110	1.774	No	ns	-1.716 to 0.6942
26	GCI vs GCF45	-8.706	30.22	Yes	***	-9.911 to -7.501
27	GCI vs GD45	6.354	22.06	Yes	***	5.149 to 7.559
28	GNLT45 vs GEA45	-1.471	5.106	Yes	**	-2.676 to -0.2658
29	GNLT45 vs GER45	-1.390	4.825	Yes	*	-2.595 to -0.1848
30	GNLT45 vs GCF45	-9.585	33.27	Yes	***	-10.79 to -8.380
31	GNLT45 vs GD45	5.475	19.01	Yes	***	4.270 to 6.680
32	GEA45 vs GER45	0.08100	0.2812	No	ns	-1.124 to 1.286
33	GEA45 vs GCF45	-8.114	28.17	Yes	***	-9.319 to -6.909
34	GEA45 vs GD45	6.946	24.11	Yes	***	5.741 to 8.151

Área do axônio 90 dias

DOUTORADO CARLOS.pzf:1way ANOVA of Axônios - Área (um²) - 90 dias - Thu Jan 26 14:58:25 2017

1way ANOVA						
1	Table Analyzed	Axônios - Área (um²) - 90				
2						
3	One-way analysis of variance					
4	P value	< 0.0001				
5	P value summary	***				
6	Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes				
7	Number of groups	6				
8	F	1115				
9	R squared	0.9904				
10						
11	Bartlett's test for equal variances					
12	Bartlett's statistic (corrected)					
13	P value					
14	P value summary	ns				
15	Do the variances differ signif. (P < 0.05)	No				
16						
17	ANOVA Table	SS	df	MS		
18	Treatment (between columns)	1965	5	393.0		
19	Residual (within columns)	19.04	54	0.3525		
20	Total	1984	59			
21						
22	Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	Significant?	Summary	95% CI of diff
23	GCI vs GNLT90	0.08000	0.4261	No	ns	-0.7055 to 0.8655
24	GCI vs GEA90	-2.124	11.31	Yes	***	-2.910 to -1.338
25	GCI vs GER90	-2.169	11.55	Yes	***	-2.955 to -1.383
26	GCI vs GCF90	-12.89	68.65	Yes	***	-13.68 to -12.10
27	GCI vs GD90	6.354	33.84	Yes	***	5.568 to 7.140
28	GNLT90 vs GEA90	-2.204	11.74	Yes	***	-2.990 to -1.418
29	GNLT90 vs GER90	-2.249	11.98	Yes	***	-3.035 to -1.463
30	GNLT90 vs GCF90	-12.97	69.08	Yes	***	-13.76 to -12.18
31	GNLT90 vs GD90	6.274	33.42	Yes	***	5.488 to 7.060
32	GEA90 vs GER90	-0.04500	0.2397	No	ns	-0.8305 to 0.7405
33	GEA90 vs GCF90	-10.77	57.34	Yes	***	-11.55 to -9.980
34	GEA90 vs GD90	8.478	45.16	Yes	***	7.692 to 9.264

Diâmetro do axônio 45 dias

DOUTORADO CARLOS.pzf:1way ANOVA of Axônios - Diâmetro (um) - 45 dias - Thu Jan 26 15:03:57 2017

1way ANOVA						
1	Table Analyzed	Axônios - Diâmetro (um) - 45				
2						
3	One-way analysis of variance					
4	P value	< 0.0001				
5	P value summary	***				
6	Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes				
7	Number of groups	6				
8	F	241.6				
9	R squared	0.9572				
10						
11	Bartlett's test for equal variances					
12	Bartlett's statistic (corrected)					
13	P value					
14	P value summary	ns				
15	Do the variances differ signif. (P < 0.05)	No				
16						
17	ANOVA Table	SS	df	MS		
18	Treatment (between columns)	111.2	5	22.24		
19	Residual (within columns)	4.971	54	0.09206		
20	Total	116.2	59			
21						
22	Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	Significant?	Summary	95% CI of diff
23	GCI vs GNLT45	0.2830	2.949	No	ns	-0.1184 to 0.6844
24	GCI vs GEA45	-0.06700	0.6983	No	ns	-0.4684 to 0.3344
25	GCI vs GER45	-0.07000	0.7295	No	ns	-0.4714 to 0.3314
26	GCI vs GCF45	-1.896	19.76	Yes	***	-2.297 to -1.495
27	GCI vs GD45	2.758	28.74	Yes	***	2.357 to 3.159
28	GNLT45 vs GEA45	-0.3500	3.648	No	ns	-0.7514 to 0.0514
29	GNLT45 vs GER45	-0.3530	3.679	No	ns	-0.7544 to 0.0484
30	GNLT45 vs GCF45	-2.179	22.71	Yes	***	-2.580 to -1.778
31	GNLT45 vs GD45	2.475	25.79	Yes	***	2.074 to 2.876
32	GEA45 vs GER45	-0.003000	0.0312	No	ns	-0.4044 to 0.3984
33	GEA45 vs GCF45	-1.829	19.06	Yes	***	-2.230 to -1.428
34	GEA45 vs GD45	2.825	29.44	Yes	***	2.424 to 3.226

Diâmetro do axônio 90 dias

DOUTORADO CARLOS.pzf:1way ANOVA of Axônios - Diâmetro (um) - 90 dias - Thu Jan 26 14:59:14 2017

1way ANOVA						
1	Table Analyzed	Axônios - Diâmetro (um) - 90				
2						
3	One-way analysis of variance					
4	P value	< 0.0001				
5	P value summary	***				
6	Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes				
7	Number of groups	6				
8	F	327.7				
9	R squared	0.9681				
10						
11	Bartlett's test for equal variances					
12	Bartlett's statistic (corrected)					
13	P value					
14	P value summary	ns				
15	Do the variances differ signif. (P < 0.05)	No				
16						
17	ANOVA Table	SS	df	MS		
18	Treatment (between columns)	177.0	5	35.41		
19	Residual (within columns)	5.835	54	0.1081		
20	Total	182.9	59			
21						
22	Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	Significant?	Summary	95% CI of diff
23	GCI vs GNLT90	0.1860	1.789	No	ns	-0.2489 to 0.6209
24	GCI vs GEA90	-0.6230	5.993	Yes	**	-1.058 to -0.1881
25	GCI vs GER90	-0.5490	5.281	Yes	**	-0.9839 to -0.1141
26	GCI vs GCF90	-3.110	29.92	Yes	***	-3.545 to -2.675
27	GCI vs GD90	2.758	26.53	Yes	***	2.323 to 3.193
28	GNLT90 vs GEA90	-0.8090	7.783	Yes	***	-1.244 to -0.3741
29	GNLT90 vs GER90	-0.7350	7.071	Yes	***	-1.170 to -0.3001
30	GNLT90 vs GCF90	-3.296	31.71	Yes	***	-3.731 to -2.861
31	GNLT90 vs GD90	2.572	24.74	Yes	***	2.137 to 3.007
32	GEA90 vs GER90	0.07400	0.7119	No	ns	-0.3609 to 0.5089
33	GEA90 vs GCF90	-2.487	23.93	Yes	***	-2.922 to -2.052
34	GEA90 vs GD90	3.381	32.53	Yes	***	2.946 to 3.816

Área da bainha de mielina 45 dias

DOUTORADO CARLOS.pzf.1way ANOVA of Bainha de Mielina - Área (um²) - 45 dias - Thu Jan 28 15:05:43 2017

1way ANOVA						
1	Table Analyzed	Bainha de Mielina - Área (um ²) - 45				
2						
3	One-way analysis of variance					
4	P value	< 0.0001				
5	P value summary	***				
6	Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes				
7	Number of groups	6				
8	F	191.9				
9	R squared	0.9467				
10						
11	Bartlett's test for equal variances					
12	Bartlett's statistic (corrected)					
13	P value					
14	P value summary	ns				
15	Do the variances differ signif. (P < 0.05)	No				
16						
17	ANOVA Table	SS	df	MS		
18	Treatment (between columns)	4259	5	851.8		
19	Residual (within columns)	239.7	54	4.440		
20	Total	4499	59			
21						
22	Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	Significant?	Summary	95% CI of diff
23	GCI vs GNLT45	3.315	4.975	Yes	*	0.5274 to 6.103
24	GCI vs GEA45	-2.215	3.324	No	ns	-5.003 to 0.5726
25	GCI vs GER45	-2.092	3.140	No	ns	-4.880 to 0.6956
26	GCI vs GCF45	-15.50	23.27	Yes	***	-18.29 to -12.71
27	GCI vs GD45	12.94	19.42	Yes	***	10.15 to 15.73
28	GNLT45 vs GEA45	-5.530	8.300	Yes	***	-8.318 to -2.742
29	GNLT45 vs GER45	-5.407	8.115	Yes	***	-8.195 to -2.619
30	GNLT45 vs GCF45	-18.82	28.24	Yes	***	-21.60 to -16.03
31	GNLT45 vs GD45	9.624	14.44	Yes	***	6.836 to 12.41
32	GEA45 vs GER45	0.1230	0.1846	No	ns	-2.665 to 2.911
33	GEA45 vs GCF45	-13.29	19.94	Yes	***	-16.07 to -10.50
34	GEA45 vs GD45	15.15	22.74	Yes	***	12.37 to 17.94

Área da bainha de mielina 90 dias

DOUTORADO CARLOS.pzf:1way ANOVA of Bainha de Mielina - Área (um²) - 90 dias - Thu Jan 26 15:00:01 2017

1way ANOVA						
1	Table Analyzed	Bainha de Mielina - Área (um²) - 90				
2						
3	One-way analysis of variance					
4	P value	< 0.0001				
5	P value summary	***				
6	Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes				
7	Number of groups	6				
8	F	295.6				
9	R squared	0.9648				
10						
11	Bartlett's test for equal variances					
12	Bartlett's statistic (corrected)					
13	P value					
14	P value summary	ns				
15	Do the variances differ signif. (P < 0.05)	No				
16						
17	ANOVA Table	SS	df	MS		
18	Treatment (between columns)	5485	5	1097		
19	Residual (within columns)	200.4	54	3.711		
20	Total	5686	59			
21						
22	Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	Significant?	Summary	95% CI of diff
23	GCI vs GNLT90	0.3800	0.6238	No	ns	-2.169 to 2.929
24	GCI vs GEA90	-3.948	6.481	Yes	***	-6.497 to -1.399
25	GCI vs GER90	-3.946	6.477	Yes	***	-6.495 to -1.397
26	GCI vs GCF90	-19.58	32.13	Yes	***	-22.12 to -17.03
27	GCI vs GD90	12.94	21.24	Yes	***	10.39 to 15.49
28	GNLT90 vs GEA90	-4.328	7.104	Yes	***	-6.877 to -1.779
29	GNLT90 vs GER90	-4.326	7.101	Yes	***	-6.875 to -1.777
30	GNLT90 vs GCF90	-19.96	32.76	Yes	***	-22.50 to -17.41
31	GNLT90 vs GD90	12.56	20.62	Yes	***	10.01 to 15.11
32	GEA90 vs GER90	0.002001	0.0032	No	ns	-2.547 to 2.551
33	GEA90 vs GCF90	-15.63	25.65	Yes	***	-18.18 to -13.08
34	GEA90 vs GD90	16.89	27.72	Yes	***	14.34 to 19.44

Espessura da bainha de mielina 45 dias

DOUTORADO CARLOS.pzf:1way ANOVA of Bainha de Mielina - Espessura (um) - 45 dias - Thu Jan 26 15:07:39 2017

1way ANOVA						
1	Table Analyzed	Bainha de Mielina - Espessura (um) - 45				
2						
3	One-way analysis of variance					
4	P value	< 0.0001				
5	P value summary	***				
6	Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes				
7	Number of groups	6				
8	F	50.32				
9	R squared	0.8233				
10						
11	Bartlett's test for equal variances					
12	Bartlett's statistic (corrected)					
13	P value					
14	P value summary	ns				
15	Do the variances differ signif. (P < 0.05)	No				
16						
17	ANOVA Table	SS	df	MS		
18	Treatment (between columns)	63.24	5	12.65		
19	Residual (within columns)	13.57	54	0.2513		
20	Total	76.81	59			
21						
22	Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	Significant	Summary	95% CI of diff
23	GCI vs GNLT45	0.1330	0.8389	No	ns	-0.5303 to 0.796
24	GCI vs GEA45	-0.5880	3.709	No	ns	-1.251 to 0.0752
25	GCI vs GER45	-0.6000	3.785	No	ns	-1.263 to 0.0632
26	GCI vs GCF45	-2.413	15.22	Yes	***	-3.076 to -1.750
27	GCI vs GD45	0.9250	5.835	Yes	**	0.2617 to 1.588
28	GNLT45 vs GEA45	-0.7210	4.548	Yes	*	-1.384 to -0.057
29	GNLT45 vs GER45	-0.7330	4.624	Yes	*	-1.396 to -0.069
30	GNLT45 vs GCF45	-2.546	16.06	Yes	***	-3.209 to -1.883
31	GNLT45 vs GD45	0.7920	4.996	Yes	*	0.1287 to 1.455
32	GEA45 vs GER45	-0.01200	0.0756	No	ns	-0.6753 to 0.651
33	GEA45 vs GCF45	-1.825	11.51	Yes	***	-2.488 to -1.162
34	GEA45 vs GD45	1.513	9.544	Yes	***	0.8497 to 2.176

Espessura da bainha de mielina 90 dias

DOUTORADO CARLOS.pzf:1way ANOVA of Bainha de Mielina - Espessura (um) - 90 dias - Thu Jan 26 15:00:40 2017

1way ANOVA					
1	Table Analyzed	Bainha de Mielina - Espessura (um) - 90			
2					
3	One-way analysis of variance				
4	P value	< 0.0001			
5	P value summary	***			
6	Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes			
7	Number of groups	6			
8	F	95.52			
9	R squared	0.8984			
10					
11	Bartlett's test for equal variances				
12	Bartlett's statistic (corrected)				
13	P value				
14	P value summary	ns			
15	Do the variances differ signif. (P < 0.05)	No			
16					
17	ANOVA Table	SS	df	MS	
18	Treatment (between columns)	96.39	5	19.28	
19	Residual (within columns)	10.90	54	0.2018	
20	Total	107.3	59		
21					
22	Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	Significant?	Summary
23	GCI vs GNLT90	-0.1350	0.9503	No	ns
24	GCI vs GEA90	-0.7470	5.258	Yes	**
25	GCI vs GER90	-0.8000	5.632	Yes	**
26	GCI vs GCF90	-3.123	21.98	Yes	***
27	GCI vs GD90	1.025	7.215	Yes	***
28	GNLT90 vs GEA90	-0.6120	4.308	Yes	*
29	GNLT90 vs GER90	-0.6650	4.681	Yes	*
30	GNLT90 vs GCF90	-2.988	21.03	Yes	***
31	GNLT90 vs GD90	1.160	8.166	Yes	***
32	GEA90 vs GER90	-0.05300	0.3731	No	ns
33	GEA90 vs GCF90	-2.376	16.73	Yes	***
34	GEA90 vs GD90	1.772	12.47	Yes	***

Razão G 45 dias

DOUTORADO CARLOS.pzf:1way ANOVA of Razão G - 45 dias - Thu Jan 26 15:15:04 2017

1way ANOVA						
1	Table Analyzed	Razão G - 45				
2						
3	One-way analysis of variance					
4	P value	< 0.0001				
5	P value summary	***				
6	Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes				
7	Number of groups	6				
8	F	90.43				
9	R squared	0.8726				
10						
11	Bartlett's test for equal variances					
12	Bartlett's statistic (corrected)					
13	P value					
14	P value summary	ns				
15	Do the variances differ signif. (P < 0.05)	No				
16						
17	ANOVA Table	SS	df	MS		
18	Treatment (between columns)	4.900	5	0.9801		
19	Residual (within columns)	0.7153	66	0.01084		
20	Total	5.616	71			
21						
22	Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	Significant?	Summary	95% CI of diff
23	GCI vs GNLT45	-0.01622	0.5397	No	ns	-0.1411 to 0.1087
24	GCI vs GEA45	0.06688	2.225	No	ns	-0.05803 to 0.1918
25	GCI vs GER45	0.05170	1.720	No	ns	-0.07320 to 0.1766
26	GCI vs GCF45	0.1259	4.190	Yes	*	0.001025 to 0.2508
27	GCI vs GD45	0.7346	24.44	Yes	***	0.6097 to 0.8595
28	GNLT45 vs GEA45	0.08310	2.765	No	ns	-0.04181 to 0.2080
29	GNLT45 vs GER45	0.06792	2.260	No	ns	-0.05699 to 0.1928
30	GNLT45 vs GCF45	0.1422	4.730	Yes	*	0.01724 to 0.2671
31	GNLT45 vs GD45	0.7508	24.98	Yes	***	0.6259 to 0.8757
32	GEA45 vs GER45	-0.01518	0.5050	No	ns	-0.1401 to 0.1097
33	GEA45 vs GCF45	0.05905	1.965	No	ns	-0.06585 to 0.1840
34	GEA45 vs GD45	0.6677	22.22	Yes	***	0.5428 to 0.7926

Razão G 90 dias

DOUTORADO CARLOS.pzf: 1way ANOVA of Razão G - 90dias - Thu Jan 28 15:14:18 2017

1way ANOVA						
1	Table Analyzed	Razão G - 90				
2						
3	One-way analysis of variance					
4	P value	< 0.0001				
5	P value summary	***				
6	Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes				
7	Number of groups	6				
8	F	86.86				
9	R squared	0.8681				
10						
11	Bartlett's test for equal variances					
12	Bartlett's statistic (corrected)					
13	P value					
14	P value summary	ns				
15	Do the variances differ signif. (P < 0.05)	No				
16						
17	ANOVA Table	SS	df	MS		
18	Treatment (between columns)	4.668	5	0.9336		
19	Residual (within columns)	0.7094	66	0.01075		
20	Total	5.377	71			
21						
22	Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	Significant?	Summary	95% CI of diff
23	GCI vs GNLT90	0.03400	1.136	No	ns	-0.09039 to 0.1584
24	GCI vs GEA90	0.05714	1.909	No	ns	-0.06725 to 0.1815
25	GCI vs GER90	0.09674	3.232	No	ns	-0.02765 to 0.2211
26	GCI vs GCF90	0.1011	3.379	No	ns	-0.02327 to 0.2255
27	GCI vs GD90	0.7346	24.54	Yes	***	0.6102 to 0.8590
28	GNLT90 vs GEA90	0.02314	0.7732	No	ns	-0.1013 to 0.1475
29	GNLT90 vs GER90	0.06274	2.096	No	ns	-0.06165 to 0.1871
30	GNLT90 vs GCF90	0.06712	2.243	No	ns	-0.05727 to 0.1915
31	GNLT90 vs GD90	0.7006	23.41	Yes	***	0.5762 to 0.8250
32	GEA90 vs GER90	0.03960	1.323	No	ns	-0.08479 to 0.1640
33	GEA90 vs GCF90	0.04398	1.470	No	ns	-0.08041 to 0.1684
34	GEA90 vs GD90	0.6775	22.64	Yes	***	0.5531 to 0.8018

Contagem total de fibras nervosas 45 dias

DOUTORADO CARLOS.pzf:1way ANOVA of Contagem Total de Fibras - 45 dias - Thu Jan 26 15:10:29 2017

1way ANOVA						
1	Table Analyzed	Contagem Total de Fibras - 45				
2						
3	One-way analysis of variance					
4	P value	< 0.0001				
5	P value summary	***				
6	Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes				
7	Number of groups	6				
8	F	631.4				
9	R squared	0.9795				
10						
11	Bartlett's test for equal variances					
12	Bartlett's statistic (corrected)					
13	P value					
14	P value summary	ns				
15	Do the variances differ signif. (P < 0.05)	No				
16						
17	ANOVA Table	SS	df	MS		
18	Treatment (between columns)	16290000	5	3258000		
19	Residual (within columns)	340600	66	5161		
20	Total	16630000	71			
21						
22	Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	Significant?	Summary	95% CI of diff
23	GCI vs GNLT45	931.5	44.92	Yes	***	845.3 to 1018
24	GCI vs GEA45	648.7	31.28	Yes	***	562.5 to 734.9
25	GCI vs GER45	643.3	31.02	Yes	***	557.1 to 729.5
26	GCI vs GCF45	15.33	0.7394	No	ns	-70.86 to 101.5
27	GCI vs GD45	1336	64.43	Yes	***	1250 to 1422
28	GNLT45 vs GEA45	-282.8	13.64	Yes	***	-369.0 to -196.
29	GNLT45 vs GER45	-288.2	13.90	Yes	***	-374.4 to -202.
30	GNLT45 vs GCF45	-916.2	44.18	Yes	***	-1002 to -830.0
31	GNLT45 vs GD45	404.6	19.51	Yes	***	318.4 to 490.8
32	GEA45 vs GER45	-5.333	0.2572	No	ns	-91.53 to 80.86
33	GEA45 vs GCF45	-633.3	30.54	Yes	***	-719.5 to -547.
34	GEA45 vs GD45	687.4	33.15	Yes	***	601.2 to 773.6

Contagem total de fibras nervosas 90 dias

DOUTORADO CARLOS.pzf:1way ANOVA of Contagem Total de Fibras - 90 dias - Thu Jan 26 15:11:49 2017

1way ANOVA						
1	Table Analyzed	Contagem Total de Fibras - 90				
2						
3	One-way analysis of variance					
4	P value	< 0.0001				
5	P value summary	***				
6	Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes				
7	Number of groups	6				
8	F	590.2				
9	R squared	0.9781				
10						
11	Bartlett's test for equal variances					
12	Bartlett's statistic (corrected)					
13	P value					
14	P value summary	ns				
15	Do the variances differ signif. (P < 0.05)	No				
16						
17	ANOVA Table	SS	df	MS		
18	Treatment (between columns)	16000000	5	3200000		
19	Residual (within columns)	357800	66	5421		
20	Total	16360000	71			
21						
22	Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	Significant?	Summary	95% CI of diff
23	GCI vs GNLT90	792.4	37.28	Yes	***	704.1 to 880.8
24	GCI vs GEA90	393.1	18.49	Yes	***	304.7 to 481.4
25	GCI vs GER90	388.4	18.27	Yes	***	300.1 to 476.8
26	GCI vs CGF90	14.42	0.6783	No	ns	-73.92 to 102.8
27	GCI vs GD90	1359	63.95	Yes	***	1271 to 1448
28	GNLT90 vs GEA90	-399.3	18.79	Yes	***	-487.7 to -311.
29	GNLT90 vs GER90	-404.0	19.01	Yes	***	-492.3 to -315.
30	GNLT90 vs CGF90	-778.0	36.60	Yes	***	-866.3 to -689.
31	GNLT90 vs GD90	566.9	26.67	Yes	***	478.6 to 655.3
32	GEA90 vs GER90	-4.667	0.2196	No	ns	-93.01 to 83.67
33	GEA90 vs CGF90	-378.7	17.82	Yes	***	-467.0 to -290.
34	GEA90 vs GD90	966.3	45.46	Yes	***	877.9 to 1055

Estimulação elétrica com correntes de média frequência na regeneração nervosa periférica após neurorrafia látero-terminal do nervo fibular comum de ratos

Carlos Henrique Fachin Bortoluci^I, Fausto Viterbo^{II}, Luis Henrique Simionato^{III}, Geraldo Marco Rosa Junior^{IV}

I – Professor do Curso de Fisioterapia na Universidade do Sagrado Coração, Bauru/SP.

II – Professor Adjunto da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP.

III – Professor do Curso de Fisioterapia na Universidade do Sagrado Coração, Bauru/SP.

IV – Professor do Centro de Ciências da Saúde na Universidade do Sagrado Coração, Bauru/SP.

Objetivo: comparar a eficiência da estimulação elétrica com correntes de média frequência na regeneração nervosa periférica após neurorrafia látero-terminal do nervo fibular comum de ratos. **Método:** 120 animais foram distribuídos em 11 grupos: Grupo Controle Inicial, Grupo Experimental Neurorrafia Látero-terminal 45, Grupo Estimulação Aussie 45, Grupo Estimulação Russa 45, Grupo Desnervado 45, Grupo Controle Final 45, Grupo Experimental Neurorrafia Látero-terminal 90, Grupo Estimulação Aussie 90), Grupo Estimulação Russa 90, Grupo Desnervado 90, Grupo Controle Final 90. Os grupos (GEA45, GEA90, GER 45 e GER90) foram submetidos a três sessões semanais, com dias alternados, durante os 45 e 90 dias. As correntes foram moduladas em 30 e 100Hz. Foram coletados dados morfométricos e funcionais. **Resultados:** os resultados mostraram que os grupos eletroestimulados tiveram resultados estatisticamente significantes, quando comparados com os grupos que não receberam estimulação elétrica, tanto nos aspectos morfológicos, como no aspecto funcional. **Conclusão:** pode-se concluir que a estimulação elétrica foi eficiente no reparo nervoso após NTL; os grupos eletroestimulados tiveram resultados estatisticamente significante quando comparados os grupos não eletroestimulados; em relação às correntes não houve diferença estatisticamente significante, mas houve diferença estatisticamente significante comparando os grupos de 45 dias com os grupos de 90 dias.

Palavras-chave: neurorrafia látero-terminal; estimulação elétrica; nervo fibular; ratos.

Introdução

A lesão dos nervos periféricos permite um determinado grau de regeneração, em contraste com os axônios do sistema nervoso central (SNC), que não conseguem se regenerar. As células de Schwann no coto desnervado distalmente à lesão, fornecem o apoio essencial para a regeneração das fibras nervosas do sistema nervoso periférico em contraste com as células gliais do sistema nervoso central, os oligodendrócitos, que não conseguem fornecer este apoio (FENRICH & GORDON, 2004). No entanto, a recuperação da função após lesões de nervos periféricos em humanos é frequentemente decepcionante (FU & GORDON, 1997).

A degeneração crônica das células de Schwann durante a regeneração do nervo em relação à distância e o tempo de recuperação, é um dos principais contribuintes para os resultados funcionais escassos nas lesões dos nervos periféricos (SULAIMAN *et al.*, 2011). A suplementação exógena de drogas neurotróficas até pode restaurar a capacidade regenerativa dos nervos cronicamente denervados. No entanto, esses efeitos são dose-dependentes e precisam ser mais investigados (WOOD *et al.*, 2012; BOYD & GORDON, 2002).

Lesões nervosas periféricas podem levar a perda funcional importante para o paciente. Assim, muitas pesquisas buscam aprimorar técnicas cirúrgicas e tratamentos pós-cirúrgicos com a finalidade de minimizar a perda funcional do paciente (SATO, 2005).

Os nervos periféricos estão sujeitos a doenças inflamatórias, traumáticas, metabólicas, tóxicas, genéticas e neoplásicas (GIROLAMI, 2000). Estas doenças levam a diferentes tipos e graus de lesões (POLITIS, 1982; LUNDBORG, 2000).

Nos ambientes clínicos, as lesões dos nervos periféricos são bastante comuns (SUNDERLAND, 1978; TAYLOR *et al.*, 2008). Apesar de técnicas cirúrgicas meticulosas e muitos métodos de reparação, o resultado funcional completo, especialmente no que diz respeito à função motora, raramente é conseguido. Esses resultados funcionais pobres após o reparo de lesões nervosas têm sido atribuídos a dois fatores principais: em primeiro lugar, o coto proximal do nervo lesado cresce lentamente entre os locais de coaptação e, em segundo lugar, existe um período de tempo relativamente curto para os axônios em regeneração poderem se recuperar

(GORDON, *et al.*, 2009). As lesões nervosas periféricas foram classificadas por SEDDON (1943) em três tipos: a neuropraxia, axonotmese e neurotmese.

Viterbo e Viterbo (1992) propuseram a neurorrafia látero-terminal sem lesão no nervo doador e, até mesmo, sem a remoção do epineuro (VITERBO *et al.*, 1994a,b). Com trabalho experimental em ratos (VITERBO, 1992) realizou a secção do nervo fibular, que inerva o músculo tibial cranial, 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.

Al Majed *et al.*, (2000b) relataram que estimulação elétrica acelerou a regeneração nervosa após o reparo imediato do nervo. Mais recentemente, a estimulação elétrica foi usada para acelerar a reinervação muscular da mão humana (GORDON *et al.*, 2010).

Método

Todos os procedimentos realizados foram de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), que foi aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Medicina de Botucatu, sob o número 1043/2013.

Os ratos foram agrupados em: Grupo Controle Inicial (GCI) com 8 animais; Grupo Experimental Neurorrafia Látero-Terminal 45 (GENLT45) com 8 animais; Grupo Neurorrafia Látero-Terminal com Estimulação Aussie 45 dias (GEA45) com 16 animais; Grupo Neurorrafia Látero-Terminal com Estimulação Russa 45 dias (GER45) com 16 animais; Grupo Desnervado 45 dias (GD45) com 8 animais; Grupo Controle Final 45 (GCF45) com 8 animais; Grupo Experimental Neurorrafia Látero-Terminal 90 (GENLT90) com 8 animais; Grupo Neurorrafia Látero-Terminal com Estimulação Aussie 90 dias (GEA90) com 16 animais; Grupo Neurorrafia Látero-Terminal com Estimulação Russa 90 dias (GER90) com 16 animais; Grupo Desnervado 90 dias (GD90) com 8 animais; Grupo Controle Final 90 (GCF90) com 8 animais.

Nos Grupos (GD45 e GD90), com 8 animais, o nervo fibular foi seccionado e seus cotos 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 reinervação motora.

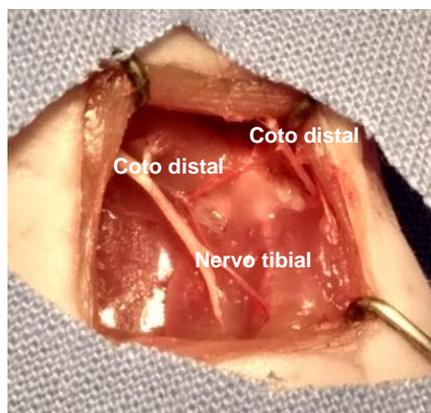


Foto 1 – desnervação: sutura do coto proximal na musculatura adjacente e do coto distal na tela subcutânea

Nos Grupos (GEA45 e GEA90) e (GER45 e GER90) com 16 animais cada, o nervo fibular foi seccionado e seu coto proximal encurvado medialmente 100 graus, a musculatura adjacente foi transfixada e suturada na face superficial dessa musculatura, impedindo dessa forma, a regeneração espontânea. O coto distal do nervo fibular foi encurvado, aproximadamente 80 graus, e suturado lateralmente ao nervo tibial, após a cirurgia, os animais foram estimulados com as Correntes Aussie e Russa, no músculo tibial cranial.

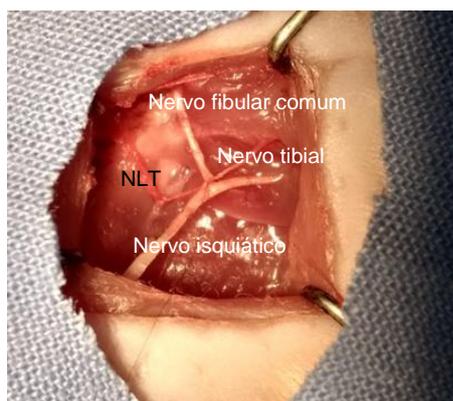


Foto 2 – Neurorrafia látero-terminal: sutura do nervo fibular comum na face lateral do nervo tibial

Os animais foram anestesiados com ketamina (80mg/Kg) e xilasina (30mg/Kg) intramuscular. A face dorso-lateral de um dos membros posteriores, direito ou esquerdo, foi escolhida por sorteio e marcadas adequadamente. Foi realizada uma incisão de 2 a 3 cm longitudinalmente ao maior eixo do membro, comprometendo pele e tecido subcutâneo com posterior divulsão da musculatura.

Após, foi realizado o procedimento, de acordo com cada grupo experimental. 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. 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 quatro 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 da eutanasia.

A estimulação elétrica com Corrente Aussie e Russa tiveram início com cinco dias de pós-operatório. Os animais dos grupos (GEA45, GEA90 GER45 e GER90) foram submetidos a três sessões semanais, com dias alternados (segunda, quarta e sexta-feira), no período da tarde, durante os 45 e 90 dias, totalizando 18 e 36 sessões respectivamente. Receberam estimulação elétrica no músculo tibial cranial, com Corrente Aussie, com frequência portadora (carrier) de 1000 Hz, sincronizada, modulação em 30 Hz (fibras musculares do tipo I) e 100 Hz (fibras musculares do tipo II), com duração do pulso de 2 milissegundos, tempo de contração de 10 segundos com 20 segundos de relaxamento, durante 10 minutos cada modulação. A intensidade da corrente elétrica foi aquela suficiente para promover a contração muscular, sendo padronizada em 40 miliamperes (mA).

Foi utilizado estimulador elétrico Neurodyn® 4 canais da empresa Ibramed. Os animais também receberam estimulação elétrica no músculo tibial cranial com Corrente Russa, com frequência portadora (carrier) de 2500 Hz, sincronizada, modulação em 30 Hz (fibras musculares tipo I) e 100 Hz (fibras musculares tipo II) com duração de burst de 4 milissegundos, tempo de contração de 10 segundos com 20 segundos de relaxamento, durante 10 minutos cada modulação. A corrente inicial foi aquela suficiente para promover a contração muscular, sendo padronizada em 40 miliamperes (mA). Foi utilizado estimulador elétrico Endophasys® da empresa KLD.

Os animais foram estimulados acordados e sem anestesia. Para isso foi utilizada uma cápsula metálica com abertura posterior para a cauda e duas aberturas laterais para fixação dos membros posteriores. Após essa imobilização, os eletrodos de um centímetro quadrado de área foram fixados sobre o ventre do

músculo tibial cranial. Estas cápsulas foram utilizadas para evitar anestesia de repetição. Para aplicação da estimulação elétrica foram utilizados eletrodos autoadesivos.

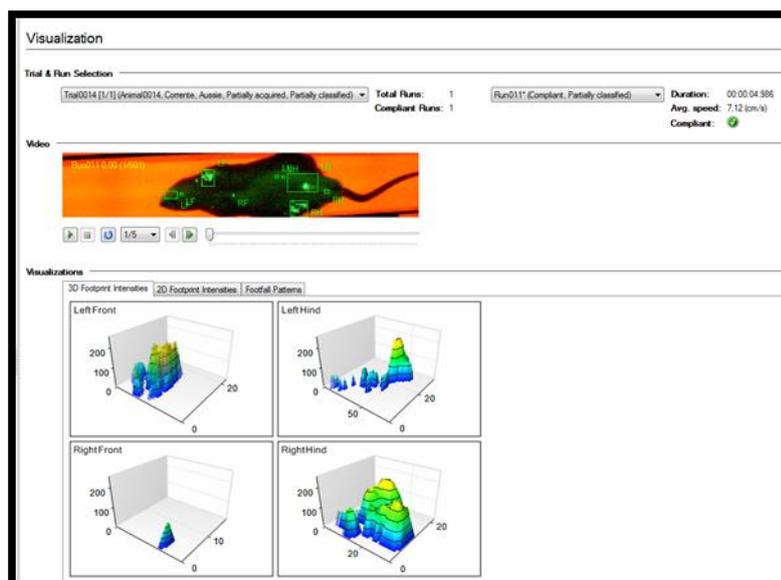


Figura 3 – Foto dos animais encapsulados para estimulação elétrica

Para o teste CatWalk, os animais são colocados sobre uma plataforma de vidro iluminada, de maneira a que nos locais de contato das patas com a plataforma é refletido um sinal luminoso de área e intensidade proporcionais à área de contato e à pressão exercida pela pata. A plataforma esteve monitorada com uma câmara de vídeo colocada sob a mesma e conectada a um computador equipado com um programa de aquisição de imagem. Os critérios adotados para que uma caminhada fosse considerada adequada para o experimento foram: que a caminhada durasse ao menos 5 segundos, que a caminhada não excedesse 10 segundos em tempo, que o número mínimo de pegadas fosse de quatro, completas, pegadas incompletas nesse tempo e nesse percurso foram descartadas, a variação na velocidade permitida foi de 60%.

Para o cálculo do Índice Funcional do fibular, nas pegadas foram medidos os parâmetros: E: experimental; N: normal; PL: comprimento da pata; TS: espalhar total dos dedos; IT: espalhar total dos dedos intermediários. Esses mesmos dados foram lançados na fórmula de Bain *et al.*, (1989). As quais forneceram o índice funcional do fibular (IFF):

$$\text{IFF} = 174,9 \times (\text{EPL} - \text{NPL} + 80,3 / \text{NPL}) \times (\text{ETS} - \text{NTS} - 13,4 / \text{NTS})$$



Para a realização do teste eletrofisiológico, a temperatura ambiente foi mantida em torno de 25°C. O teste eletrofisiológico foi realizado antes da eutanásia dos animais. O eletrodo vermelho (referência) foi colocado no tendão do músculo tibial cranial do rato; o eletrodo preto (ativo), no ventre do músculo tibial cranial, e o eletrodo verde (dispersivo), introduzido em local distante da região estudada.

Os segmentos de nervo coletados foram fixados e mantidos em solução de Karnovisk e refrigerados a 4°C até o momento do processamento histológico. Após fixação por período superior a 24 horas em solução de Karnovisk, 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 (1:1) 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® 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.

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.

As imagens digitalizadas e salvas foram analisadas através de medidas de área da fibra nervosa, diâmetro menor da fibra nervosa, área do axônio, diâmetro

menor do axônio, e espessura e área da bainha de mielina. Foram contadas 220 fibras nervosas, e marcadas da direita para a esquerda, na linha horizontal.

A análise estatística foi efetuada por meio do *software Prisma Pad* 5.1. A normalidade da distribuição dos dados foi feita pelo teste de *Shapiro-Wilk*. Para avaliação entre os grupos, aplicou-se o teste ANOVA *One-Way* com *post hoc* de *Tukey*, considerando a distribuição normal (média \pm desvio padrão). O nível de significância considerado foi de 5%.

Resultados

Os resultados do índice funcional, mostrou que os grupos GEA90 e GER90 tiveram resultados estatisticamente significante, quando se comparou com os dados dos grupos GEA45, GER45 e GENLT45, mas não mostrou diferença entre as correntes utilizadas, como pode ser observado nas tabelas 1 e 2.

Tabela 1 – resultados do índice funcional do grupo 45 dias.

Grupos	Média	DP
GCI	-12,91 ^a	\pm 1,49
GNLT45	-70,50 ^c	\pm 4,23
GEA45	-68,81 ^c	\pm 4,37
GER45	-68,01 ^c	\pm 4,23
GCF45	-13,40 ^a	\pm 1,50
GD45	-79,58 ^d	\pm 5,16

Tabela 2 – resultados do índice funcional do grupo 90 dias.

Grupos	Média	DP
GCI	-12,91 ^a	\pm 1,49
GNLT90	-88,81 ^b	\pm 6,60
GEA90	-58,29 ^c	\pm 4,23
GER90	-58,04 ^c	\pm 4,69
GCF90	-13,84 ^a	\pm 1,45
GD90	-104,32 ^d	\pm 14,00

Pode-se observar nas tabelas 3 e 4 que houve diferença estatisticamente significante entre os grupos estimulados e não estimulados. No entanto, não houve diferença estatisticamente significante entre os grupos estimulados, independentemente dos tempos de estimulação.

Tabela 3 – resultados da amplitude do grupo 45 dias.

Grupos	Média	DP
GCI	20,08 ^a	±1,94
GHLT45	5,64 ^b	±0,89
GEA45	13,45 ^c	±2,14
GER45	13,38 ^c	±1,63
GCF45	18,08 ^a	±1,82
GD45	0,00 ^d	0,00

Tabela 4 – resultados da amplitude do grupo 90 dias.

Grupos	Média	DP
GCI	20,08 ^a	±1,94
GHLT90	6,64 ^c	±0,55
GEA90	12,84 ^b	±3,22
GER90	12,62 ^b	±3,69
GCF90	20,65 ^a	±2,09
GD90	0,00 ^d	0,00

Pode ser observado nas tabelas 5 e 6 que houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos que foram estimulados por mais tempo, porém, quando se compara a corrente utilizada, não houve diferença estatisticamente significativa, o mesmo acontecendo com o grupo não tratado, mostrando que o tempo foi o diferencial.

Tabela 5 – resultados da latência do grupo 45 dias.

Grupos	Média	DP
GCI	1,69 ^a	±0,03
GHLT45	1,92 ^b	±0,08
GEA45	1,85 ^{bc}	±0,12
GER45	1,97 ^{bd}	±0,22
GCF45	1,66 ^a	±0,04
GD45	10,00 ^e	±0,00

Tabela 6 – resultados da latência do grupo 90 dias.

Grupos	Média	DP
GCI	20,08 ^a	±1,94
GHLT90	6,64 ^c	±0,55
GEA90	12,84 ^b	±3,22
GER90	12,62 ^b	±3,69
GCF90	20,65 ^a	±2,09
GD90	0,00 ^d	0,00

Observa-se nas tabelas 7 e 8 que houve diferença estatisticamente significativa quando se compara os grupos eletroestimulados com os grupos não estimulados. E quando se compara os grupos eletroestimulados, houve diferença estatisticamente significativa em relação ao tempo de estimulação, mas não havendo entre as correntes.

Tabela 7 – resultados da área da fibra nervosa do grupo 45 dias.

Grupos	Média	DP
GCI	16,80 ^a	±6,47
GNLT45	13,68 ^b	±5,12
GEA45	19,88 ^c	±7,56
GER45	19,27 ^c	±7,33
GCF45	38,53 ^d	±14,66
GD45	0,00 ^e	0,00

Tabela 8 – resultados da área da fibra nervosa do grupo 90 dias.

Grupos	Média	DP
GCI	19,29 ^a	±0,97
GNLT90	18,83 ^a	±0,77
GEA90	25,37 ^b	±1,81
GER90	25,41 ^b	±2,02
GCF90	51,76 ^c	±3,13
GD90	0,00 ^d	±0,00

Pode-se verificar nas tabelas 9 e 10 que em relação a área da bainha de mielina houve diferença estatisticamente significativa quando se compara os grupos eletroestimulados com os grupos não estimulados. E quando se compara os grupos estimulados eletricamente, houve diferença estatisticamente significativa em relação ao tempo de estimulação elétrica, mas não houve diferença entre as correntes utilizadas.

Tabela 9 – resultados da área da bainha de mielina do grupo 45 dias.

Grupos	Média	DP
GCI	12,94 ^a	±0,94
GNLT45	9,62 ^b	±2,47
GEA45	15,15 ^a	±2,14
GER45	15,03 ^a	±2,25
GCF45	28,44 ^c	±3,16
GD45	0,00 ^d	0,00

Tabela 10 – resultados da área da bainha de mielina do grupo 90 dias.

Grupos	Média	DP
GCI	12,94 ^a	±0,94
GHLT90	12,56 ^a	±1,11
GEA90	16,89 ^b	±2,09
GER90	16,89 ^b	±1,50
GCF90	32,51 ^c	±3,67
GD90	0,00 ^d	±0,00

Com relação a razão G, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos eletroestimulados com o grupo que realizou somente a neurorrafia látero-terminal, nem quando se compara os tempos de eletroestimulação, isto pode ser observado nas tabelas 11 e 12.

Tabela 11 – resultados da razão G do grupo 45 dias.

Grupos	Média	DP
GCI	0,73 ^a	±0,10
GHLT45	0,75 ^a	±0,11
GEA45	0,67 ^a	±0,09
GER45	0,68 ^a	±0,15
GCF45	0,61 ^a	±0,10
GCF45	0,00 ^b	±0,00

Tabela 12 – resultados da razão G do grupo 90 dias.

Grupos	Média	DP
GCI	0,73 ^a	±0,10
GHLT90	0,70 ^a	±0,12
GEA90	0,68 ^a	±0,09
GER90	0,64 ^a	±0,06
GCF90	0,63 ^a	±0,17
GCF90	0,00 ^b	±0,00

Discussão

Para realização desta pesquisa, foi escolhido o animal (*Rattus norvegicus*) da linhagem *Wistar* por ser relativamente fácil a obtenção, manutenção e de manejo simples, e também por se tratar do animal mais utilizado para este tipo de pesquisa, que inclui reparo nervoso e regeneração. Esta linhagem de animal tem semelhanças com a fisiopatologia nervosa do ser humano (AKGUL; GULSOY; GULCUR *et al.*, 2014; MOHAMMADI & SAADATI, 2014; GHAYEMI *et al.*, 2014).

A frequência de 20Hz foi usada em vários outros estudos para demonstrar a regeneração do axônio acelerado e o alvo da reinervação em ratos após a reparação de nervos imediata (ALRASHDAN *et al.*, 2010; ASENSIO-PINILLA *et al.*, 2009; FRANZ *et al.*, 2008; HUANG *et al.*, 2009, 2010, 2013.; KOPPES *et al.*, 2014a; SHARMA *et al.*, 2010a; SINGH *et al.*, 2012; WAN *et al.*, 2010) e em humanos após cirurgia de liberação do nervo mediano na síndrome do túnel do carpo (GORDON *et al.*, 2010).

Atualmente, os estudos com animais foram seguidos de reparo imediato do nervo. A maior parte das lesões dos nervos em humanos ocorre juntamente com politraumatismos severos com complicações potencialmente fatais. Consequentemente, o reparo do nervo foi invariavelmente tardio, levando, às vezes, meses para ser realizado. Os estudos em animais que avaliaram a regeneração após reparação tardia com estimulação elétrica de 1Hz e 20 Hz, mostraram que a estimulação elétrica acelerou a regeneração (HUANG *et al.*, 2013, ELZINGA *et al.*, 2015).

Segundo Al-Majed *et al.*, (2000b) demonstraram que a estimulação elétrica de baixa frequência (20 Hz) acelera a regeneração do axônio após transecção do nervo e reparo microcirúrgico, surgindo um interesse crescente em usar a eletroestimulação para melhorar a capacidade dos nervos periféricos lesionados em regenerar seus axônios e promover uma recuperação funcional.

Na pesquisa realizada por Maciel *et al.*, (2013), a frequência foi determinada de acordo com o tipo de fibra muscular do músculo tibial cranial, que possui uma mistura homogênea de fibras fásicas e tônicas, e que em estudos anteriores realizados no laboratório desses pesquisadores, ajudaram a determinar a frequência de modulação em 10 Hz, estimulando preferencialmente as fibras tônicas, e nesta pesquisa o músculo foi estimulado com duas frequências (30 e 100Hz) para ativar os dois tipos de fibras musculares (tônicas e fásicas).

Segundo Gordon (2016) a estimulação elétrica acelera a expressão de fatores neurotróficos, o que justifica a ideia dessa pesquisa que a eletroestimulação por meio de correntes de média frequência com 1000Hz ou 2500Hz, podem trazer benefícios para os pacientes portadores de lesão nervosa periférica.

A estimulação elétrica muscular tem se mostrado eficaz após o reparo de nervos, mas uma investigação mais aprofundada, usando um longo intervalo entre o reparo e a estimulação elétrica é necessária. Isso seria o mais próximo de imitar o cenário de uma clínica de reabilitação e poderia ajudar a definir se o uso da estimulação elétrica muscular pode proporcionar benefícios semelhantes aos observados em um modelo de reparo imediato (WILLAND *et al.*, 2015).

Conclusão

Com o modelo experimental, pôde-se concluir que a estimulação elétrica foi eficiente no reparo nervoso após a neurorafia látero-terminal e que não houve diferença estatisticamente significativa entre as correntes utilizadas, e sim, em relação ao tempo de eletroestimulação, que mostrou que o tempo maior de tratamento resultou em melhores resultados.

Referências

Fenrich K, Gordon T. Canadian Association of Neuroscience review: axonal regeneration in the peripheral and central nervous systems-current issues and advances. *Neurol Sci* 2004; 31:142–156.

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

Sulaiman OAR, Midha R, Gordon T. Pathophysiology of surgical nerve disorders. In: Winn HR, ed. *Youmans neurological surgery*. Philadelphia, PA: Saunders/Elsevier, 2011, 2368–2379.

Wood MD, Kim H, Bilbily A. GDNF released from microspheres enhances nerve regeneration after delayed repair. *Muscle Nerve* 2012 46:122–124.

Boyd JG, Gordon T. A dose-dependent facilitation and inhibition of peripheral nerve regeneration by brain-derived neurotrophic factor. *Eur J Neurosci* 2002;15:613–626.

Sato KM. Comparação de neurorafias 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.

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, 2000,1135-54.

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 Research*. 1982; 253:1-12.

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

Sunderland S. Nerve and nerve injuries. London: Churchill Livingstone, 1978.

Taylor CA, Braza D, Rice JB, Dillingham T. The incidence of peripheral nerve injury in extremity trauma. *Am J Phys Med Rehabil*. 2008, 87:381–385.

Gordon T, Sulaiman OA, Ladak A. Electrical stimulation for improving nerve regeneration: where do we stand? In: Geuna S, Tos P, Battiston B.eds. *Int Rev Neurobiol*. San Diego, CA: Academic Press, 2009, 87:433–444.

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

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

Viterbo F, Trindade JC, Hoshino K, Mazzoni Neto A. End-to-side neurorrhaphy with removal of the epineurial sheath: an experimental study in rats. *Plastic and Reconstructive Surgery*. 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 epineurial sheath: experimental study in rats. *British Journal of Plastic Surgery*. 1994b; 47:75-80.

Al-Majed AA, Neumann CM, Brushart TM, Gordon T. Brief electrical stimulation promotes the speed and accuracy of motor axonal regeneration. *J. Neurosci*. 2000b, 20, 2602–2608.

Gordon T, Amirjani N, Edwards DC, Chan KM. Brief post-surgical electrical stimulation accelerates axon regeneration and muscle reinnervation without affecting the functional measures in carpal tunnel syndrome patients. *Exp Neurol.* 2010b 223, 192–202.

Akgul T, Gulsoy M, Gulcur HO. Effects of early and delayed laser application on nerve regeneration. *Lasers Med. Sci.*, 2014; 29, 351-57.

Mohammadi R, Saadati A. Influence of insulin-like growth factor I on nerve regeneration using allografts: a sciatic nerve model. *Journal of Craniofacial Surgery.* 2014; 25(4):1510-14.

Ghayemi N, Haghghat A, Amini K, Mohammad R. Functional effect of local administration of glial derived neurotrophic factor combined with inside-out artery graft on sciatic nerve regeneration in rat. *Int. J. Surg.* 2014, v. 12, n. 5, p. 457-463.

Alrashdan MS, Park JC, Sung MA, Yoo SB, Jahng JW, Lee TH, Kim SJ, Lee JH. Thirty minutes of low intensity electrical stimulation promotes nerve regeneration after sciatic nerve crush injury in a rat model. *Acta Neurol. Belg.* 2010, 110, 168–179,

Asensio-Pinilla E, Udina E, Jaramillo J, Navarro X. Electrical stimulation combined with exercise increase axonal regeneration after peripheral nerve injury. *Exp. Neurol.* 2009, 219, 258–265.

Franz CK, Rutishauser U, Rafuse VF. Intrinsic neuronal properties control selective targeting of regenerating motoneurons. *Brain* 2008.131, 1492–1505,

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. *Eur J Neurosci.* 2013 38(12):3691–701.

Huang J, Ye Z, Hu X, Lu L, Luo Z. Electrical stimulation induces calcium dependent release of NGF from cultured Schwann cells. *Glia* 2010 58, 622–631.

Huang J, Lu L, Hu X, Ye Z, Peng Y, Yan X, Geng D, Luo Z. Electrical stimulation accelerates motor functional recovery in the rat model of 15-mm sciatic nerve gap bridged by scaffolds with longitudinally oriented microchannels. *Neurorehabil Neural Repair.* 2010 24, 736–745.

Huang J, Hu X, Lu L, Ye Z, Wang Y, Luo Z. Electrical stimulation accelerates motor functional recovery in autograft-repaired 10 mm femoral nerve gap in rats. *J Neurotrauma.* 2009 26, 1805–1813.

Koppes AN, Nordberg AL, Paolillo GM, Goodsell NM, Darwish HA, Zhang L, Thompson DM. Electrical stimulation of Schwann cells promotes sustained increases in neurite outgrowth. *Tissue Eng.* 2014a A 20, 494–506.

Sharma N, Marzo SJ, Jones KJ, Foecking EM. Electrical stimulation and testosterone differentially enhance expression of regeneration-associated genes. *Exp. Neurol.* 2010a, 223, 183–191.

Singh B, Xu QG, Franz CK, Zhang R, Dalton C, Gordon T, Verge VM, Midha R, Zochodne DW. Accelerated axon outgrowth, guidance, and target reinnervation across nerve transection gaps following a brief electrical stimulation paradigm. *J. Neurosurg.* 2012, 116, 498–512.

Wan LD, Xia R, Ding WL. Electrical stimulation enhanced remyelination of injured sciatic nerves by increasing neurotrophins. *Neuroscience.* 2010, 169, 1029–1038.

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

Maciel FO, Viterbo F, Chinaque LFC, Souza BM. Effect of electrical stimulation of the cranial tibial muscle after end-to-side neuroorrhaphy of the peroneal nerve in rats. *Acta Cirúrgica Brasileira.* 2013, v28 (1):39-47.

Gordon T. Electrical stimulation to enhance axon regeneration after peripheral nerve injuries in animal models and humans. *Neurotherapeutics.* 2016, 13:295-310.

Willand MP, Chiang CD, Zhang JJ, Kemp SWP, Borschel GH, Gordon T. Daily electrical muscle stimulation enhances functional recovery following nerve transection and repair in rats. *Neurorehabil Neural Repair.* 2015, 29:690–700.