UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU

Luis Henrique Simionato

CORRENTES RUSSA E AUSSIE NA RECUPERAÇÃO DO MÚSCULO TIBIAL CRANIAL APÓS NEURORRAFIA LÁTERO-TERMINAL EM 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. Dr. Fausto Viterbo
Coorientador: Prof. Dr. Geraldo Marco Rosa Junior

Botucatu

2017

LUIS HENRIQUE SIMIONATO

CORRENTES RUSSA E AUSSIE NA RECUPERAÇÃO DO MÚSCULO TIBIAL CRANIAL APÓS NEURORRAFIA LÁTERO-TERMINAL EM 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. Dr. Fausto Viterbo
Coorientador: Prof. Dr. Geraldo Marco Rosa Junior

BOTUCATU
2017

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

Simionato, Luis Henrique.
Correntes russa e aussie na recuperação do músculo tibial cranial após neurorrafia látero-terminal em ratos / Luis Henrique Simionato. - 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: 40100006

1. Nervos cranianos 2. Estímulos elétricos 3. Sistema nervoso - regeneração 4. Crânio - cirurgia 5. Rato como animal de laboratório

Palavras-chave: Eletroestimulação; Músculo tibial cranial; Nervo fibular comum ; Neurorrafia látero-terminal.

Luis Henrique Simionato

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.

CORRENTES RUSSA E AUSSIE NA RECUPERAÇÃO DO MÚSCULO TIBIAL CRANIAL APÓS NEURORRAFIA LÁTERO-TERMINAL EM RATOS

Comissão Examinadora da Defesa de Tese:

1. _____
Prof. Dr. Fausto Viterbo
Faculdade de Medicina de Botucatu - FMB – UNESP

2. _____
Prof. Dr. Cleber Ferraresi
Universidade do Sagrado Coração – USC – Centro de Ciências da Saúde

3. _____
Prof. Dr. Jesus Carlos Andreo
Universidade de São Paulo - FOB

4. _____
Prof. Dr. Nivaldo Antonio Parizotto
Universidade Federal de São Carlos – Departamento de Fisioterapia

5. _____
Profa. Dra. Selma Maria Michelin Matheus
Instituto de Biociências - FMB - UNESP

6. _____
Suplente: **Profa. Dra. Fabiola Alves dos Reis**
Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF

7. _____
Suplente: **Prof. Dr. Paulo Sérgio Bossini**
Universidade do Sagrado Coração – USC – Centro de Ciências da Saúde

8. _____
Suplente: **Prof. Dr. Rodrigo Leal de Paiva Carvalho**
Universidade do Sagrado Coração – USC – Centro de Ciências da Saúde

Botucatu, 03 de março de 2017.

Curriculum Luis Henrique Simionato

1988 - Graduado em fisioterapia pela Universidade Federal de São Carlos em 1988, São Carlos, São Paulo.

1995 - Especialização em Administração dos Serviços de Saúde pela Universidade de Ribeirão Preto, UNAERP, São Paulo, com o trabalho: Ocorrência de pacientes com LER no serviço de fisioterapia do Hospital de Base Bauru, no ano de 1994.

1996 - Especialização em Psicopedagogia pela Universidade do Sagrado Coração, USC, Bauru, São Paulo.

2004 - Mestrado em Biologia Oral pela Universidade do Sagrado Coração, USC, Bauru, com a dissertação: Estudo morfométrico e histoquímico das fibras musculares do músculo reto do abdome do macaco-prego, orientado pelo Prof. Livre Docente Jesus Carlos Andreo.

De 1993 a 1994 - Fiscal Regional do Conselho Federal de Fisioterapia e Terapia Ocupacional, COFITO, Brasil.

De 1994 a 1996 - Fisioterapeuta da Associação Hospitalar de Bauru, São Paulo.

De 1995..... até a presente data - Professor assistente do curso de graduação e pós-graduação em fisioterapia da Universidade do Sagrado Coração, USC, Bauru, São Paulo.

Dedicatória

Dedico este trabalho à Eliane
e Ane, minha esposa e filha.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Fausto Viterbo, pela orientação, pela possibilidade de crescimento profissional durante o período do doutorado e apoio que me levaram à elaboração e conclusão desta Tese. Obrigado pela oportunidade.

Ao Prof. Dr. Geraldo Marco Rosa Junior, pela coorientação, pelo incentivo na área da pesquisa, pela parceria e pelos conhecimentos transmitidos.

À Marcia Fonseca Piagentini Cruz, secretária do programa de pós-graduação, pela ajuda e apoio durante todo o processo de doutorado.

Aos funcionários do Laboratório de Cirurgia Experimental, Faculdade de Medicina, UNESP Botucatu.

À Universidade do Sagrado Coração - Bauru, pela disponibilidade dos laboratórios e apoio no desenvolvimento da pesquisa.

À Universidade de São Paulo – FOB – Bauru, pela disponibilidade dos laboratórios.

Ao Grupo de Estudos da Interação Mioneural – GEIM: sempre presente nesta caminhada.

Ao amigo e Professor Me. Carlos Henrique Fachin Bortoluci, pela parceria de longa data na vida acadêmica e amizade cultivada por longos anos.

Às minhas companheiras de caminhada Eliane e Ane pelo estímulo e apoio durante todo o processo do doutorado.

RESUMO

Introdução: Lesões de nervos periféricos podem levar uma perda funcional elevada ao paciente. Devido a este fator, muitas pesquisas buscam propor técnicas para melhorar a funcionalidade de um músculo reinervado. A neurorrafia látero-terminal (NLT), sem lesão no nervo doador, trouxe grande contribuição, pois a partir desta descoberta, qualquer nervo pode ser utilizado como nervo doador sem prejuízos para este ou para as estruturas por ele inervadas. Entretanto, após uma neurorrafia, o tempo para a regeneração axonal determinará atrofia das fibras musculares. Assim, a estimulação elétrica preveniria este fator negativo. **Objetivo:** Esta pesquisa teve como objetivo estudar a eficiência da estimulação elétrica na regeneração do músculo tibial cranial após secção e neurorrafia látero-terminal do coto distal do nervo fibular comum à face lateral do nervo tibial. **Métodos:** Foram utilizados 120 ratos Wistar machos (*Rattus norvergicus*), eletroestimulados com corrente russa e aussie, após neurorrafia látero-terminal em dois períodos diferentes: 45 e 90 dias, distribuidos em 11 grupos: Grupo Controle Inicial (GCI); Grupo Neurorrafia Látero-Terminal (GNLT45 e GNLT 90) ; Grupo Neurorrafia Látero-Terminal com Estimulação Aussie (GEA45 e GEA90) ; Grupo Neurorrafia Látero-Terminal Estimulação Russa (GER45 e GER90); Grupo Desnervado (GD45 e GD90) ; Grupo Controle Final (GCF45 e GCF90).Foram realizadas análises morfométricas dos tecidos musculares e funcionais dos ratos de todos os 11 grupos, comparando a resposta da regeneração trófica do tecido muscular. **Resultados e Discussão:** Os resultados referentes às médias dos valores da área das fibras do MTC dos grupos eletroestimulados GEA45 (2202,64µm^2), GER45 (2198,91µm^2), GEA90 (2759,94µm^2) e GER90 (2777,28µm^2), sempre foram maiores que os dos grupos controle cirúrgico GNLT45 (1778,27µm^2) e GNLT 90 (1904,67µm^2); repetindo a mesma relação de resultado em relação ao do diâmetro menor, GEA45(44,14µm), GER45(43,71µm), GEA90(51,06µm) e GER90 (51,31µm), maiores do que dos grupos controle cirúrgico GNLT45 (30,43µm) e GNLT 90 (142,38µm). Em relação à densidade de tecido conjuntivo, os resultados encontrados foram: GEA45 (7,92%), GER45 (8,84%), GEA90 (9,66%) e GER90 (7,00%). Os resultados referentes ao Teste de Força de Contração Máxima nos grupos eletroestimulados GEA45, GER45, GEA90 e GER90 apresentaram resultados superiores ao grupo que somente realizou a neurorrafia. A avaliação da intensidade da pegada entre os grupos com períodos de diferentes tempos de eletroestimulação, 45 e 90 dias, demonstrou uma influência positiva no período maior e o grupo 90, com média de 21,94 de intensidade de pressão da pegada. **Conclusão:** Após a comparação entre os grupos com períodos de eletroestimulção diferentes 45 e 90 dias, entre grupos de mesmo período de eletroestimulação não houve diferença significativa, mas entre os grupos com períodos diferentes, 45 e 90 dias, ocorreu uma influência positiva no período maior, o que permitiu constatar que existe uma relação direta na melhora das características morfológicas e funcionais do tecido muscular pós NLT com o aumento do período de eletroestimulação.

Palavras-Chave: Neurorrafia látero-terminal. Eletroestimulação. Nervo fibular comum Músculo tibial cranial.

ABSTRACT

Introduction: Peripheral nerve injury can lead to a high functional loss to the patient. Due to this factor, many researches seek to propose techniques to improve the functionality of a reinnervated muscle. The End-to-Side Neurorrhaphy (ESN), without injury to the donor nerve, brought great contribution, since from this discovery, any nerve can be used as donor nerve without damages to themselves or to the structures innervated by it. However, after a neurorrhaphy, the time for axonal regeneration will determine atrophy of the muscle fibers. Electrical stimulation would prevent this negative factor. **Purpose:** This research aimed to study the efficiency of electrical stimulation in the regeneration of the cranial tibial muscle after section and end-to-side neurorrhaphy of the distal stump of the peroneal nerve to the lateral aspect of the tibial nerve. **Methods**: A total of 120 male Wistar rats (*Rattus norvergicus*) were used, electrostimulated with Russian and Aussie current, after End-to-Side Neurorrhaphy in two different periods, 45 and 90 days, divided into 11 groups: Initial Control Group (ICG); End-to-Side Neurorrhaphy Group (EESNG45 and EESNG90); End-to-Side Neurorrhaphy with Aussie Stimulation Group (ASG45 and ASG90); End-to-Side Neurorrhaphy with Russian Stimulation (RSG45 and RSG90); Unnerved Group (UG45 and UG90); Final Control Group (FCG45 and FCG90). Morphometric analyzes of the muscular and functional tissues of the rats of all 11 groups were performed, comparing the trophic regeneration response of muscle tissue. **Results and Discussion:** The results of the mean values of the cranial tibial muscle fiber area of the electrostimulated groups, ASG45 (2202.64μm^2), RSG45 (2198.91μm^2), ASG90 (2759.94μm^2) and RSG90 (2777.28μm^2) were always higher than the surgical control group EESNG45 (1778.27 μm^2) and EESNG90 (1904.67 μm^2), repeating the same result ratio with respect to the smaller diameter, ASG45 (44.14μm), RSG45 (43.71μm), ASG90 (51.06μm) and RSG90 (51.31μm), higher than the EESNG45 surgical control groups (30.43μm) and EESNG90 (142.38μm). In relation to the density of connective tissue the results were: ASG45 (7.92%), RSG45 (8.84%), ASG90 (9.665%) and RSG90 (7.00%). The results for the Maximum Contraction Strength Test the ASG45, RSG45, ASG90 and RSG90 electro-stimulated groups presented higher results than the group that only performed neurorrhaphy. The evaluation of the intensity of the footprint between the groups with different periods of electrostimulation times, 45 and 90 days, had a positive influence in the longer period, group 90, with a mean of 21.94 of pressure intensity of the footprint. **Conclusion:** The comparison between groups with different periods of electrostimulation, 45 and 90 days, showed that was no significant difference between groups of the same electrostimulation period, but between the groups with different periods, 45 and 90 days, a positive influence occurred in the longer period, thus confirming that is a direct relationship in the improvement of the morphological and functional characteristics of muscle tissue after ESN with the increase of the electrostimulation period.

Keywords: End-to-Side Neurorrhaphy. Electro-stimulation. Peroneal nerve. Cranial tibial muscle.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figuras **Páginas**

Figura 1 - Procedimento cirúrgico realizado nos grupos GNLT 45 e GNLT 90..... 27

Figura 2 - Procedimento cirúrgico dos grupos desnervadoS GD45 e GD 90..... 28

Figura 3 - Procedimento cirúrgico da neurorrafia latero-terminal (NLT) dos grupos eletro estimulados (GEA 45, GEA 90, GER 45 e GER 90)..... 29

Figura 4 - Procedimento cirúrgio, divulsão na face dorso-lateral do membro pélvico e direito..... 30

Figura 5 - Fio monofilamentar de nylon 10-0 com agulha cilíndrica e circular..... 31

Figura 6 - Animais mantidos em caixas apropriadas, biotério da Universidade do Sagrado Coração (USC)..... 32

Figura 7 - Estimulador elétrico Neurodyn® 4 canais da empresa Ibramed..... 33

Figura 8 - Estimulador elétrico Endophasys® da empresa KLD..... 34

Figura 9 - Eletroestimulação dos animais (imobilizados dentro das cápsulas metálicas)..... 34

Figura 10 - Plataforma "CatWalk®" para realização da análise de intensidade máxima de contato da caminhada..... 35

Figura 11 - Transdutor de força FT03..... 36

Figura 12 - Realização do teste de contração tetânica do músculo tibial cranial.... 37

Figura 13 - Coleta do músculo tibial cranial..... 38

Figura 14 - Sistema de captura de imagem, microscópio Nikon Eclipse 80i, acoplado a uma câmera QIMAGING Microplublish 3.3 Cooled..... 39

Figura 15 - Comparação da intensidade de contato máxima dos animais após 45 dias de aplicação das correntes, dos grupos GCI, GNLT45, GEA45, GER45, GCF45 e GD45..... 42

Figura 16 - Gráfico da intensidade máxima de contato dos animais após 90 dias de aplicação das correntes, dos grupos GCI, GNLT90, GEA90, GER90, GCF90 e GD90..... 43

Figura 17 - Gráfico dos valores da comparação da intensidade máxima de contato dos animais após 45 e 90 dias de aplicação das correntes, dos grupos GEA45 e 90, GER45 e 90..... 44

Figura 18 - Gráfico da massa corporal inicial (expressa em gramas) dos grupos GCI, GNLT45, GEA45, GER45, GCF45 e GD45..... 45

Figura 19 - Gráfico da massa corporal final (expressa em gramas) dos grupos GNLT45, GEA45, GER45, GCF45 e GD45..... 46

Figura 20 - Gráfico da massa corporal inicial (expressa em gramas) dos grupos GCI, GNLT90, GEA90, GER90, GCF90 e GD90..... 47

Figura 21 - Gráfico da massa corporal final (expressa em gramas) dos grupos GNLT90, GEA90, GER90, GCF90 e GD90..... 48

Figura 22 - Gráfico da força de contração máxima do MTC (expressa em Newton) dos grupos GCI, GNLT45, GEA45, GER45, GCF45 e GD45..... 49
Figura 23 - Gráfico dos resultados obtidos no teste de força de contração máxima do MTC (expressa em Newton) dos grupos GCI, GNLT90, GEA90, GER90, GCF90 e GD90..... 50
Figura 24 - Gráfico dos valores da comparação da força de contração máxima do MTC (expressa em Newton) entre os dos grupos experimentais 45 e 90 dias..... 51
Figura 25 - Fotomicrografias dos cortes transversais do músculo Tibial cranial de ratos submetidos a coloração por HE. Sendo, A: GEA45; B: GER45; C: GEA90 e D: GER90..... 52
Figura 26 - Fotomicrografias dos músculos Tibial cranial de ratos submetidos a coloração por HE. Sendo, A: GEA45; B: GER45; C: GEA90 e D: GER90..... 53
Figura 27 - Gráfico da área das fibras musculares dos animais, expressa em μm^2, após 45 dias de aplicação das correntes, dos grupos GCI, GNLT45, GEA45, GER45, GCF45 e GD45..... 54
Figura 28 - Gráfico do diâmetro menor das fibras musculares dos animais, expressa em µm, após 45 dias de aplicação das correntes, dos grupos GCI, GNLT45, GEA45, GER45, GCF45 e GD45..... 55
Figura 29 - Gráfico da área das fibras musculares dos animais, expressa em μm^2, após 90 dias de aplicação das correntes, dos grupos GCI, GNLT90, GEA90, GER90, GCF90 e GD90..... 56
Figura 30 - Gráfico do diâmetro menor das fibras musculares dos animais, expressa em µm, após 90 dias de aplicação das correntes, dos grupos GCI, GNLT90, GEA90, GER90, GCF90 e GD90..... 57
Figura 31 - Gráfico dos valores da **c**omparação da área das fibras musculares dos animais, expressa em μm^2, entre os grupos experimentais 45 e 90 dias de aplicação das correntes..... 58
Figura 32 - Gráfico dos valores da comparação do diâmetro menor das fibras musculares dos animais, expressa em µm, entre os grupos 45 e 90 dias de aplicação das correntes..... 59
Figura 33 - Fotomicrografias de cortes transversais dos músculos tibial cranial de ratos submetidos à coloração de tricômico de Masson. Sendo A: GEA45; B: GER45; C: GEA90 e D: GER90..... 60
Figura 34 - Fotomicrografias dos músculos Tibial cranial de ratos com as áreas de tecidos conjuntivos evidenciadas pelo de tricômico de Masson . Sendo A: GEA45; B: GER45; C: GEA90 e D: GER90..... 61

Figura 35 - Gráfico da percentagem de tecido conjuntivo das fibras musculares dos animais, expressa em %, após 45 dias de aplicação das correntes, dos grupos GCI, GNLT45, GEA45, GER45, GCF45 e GD45..... 62

Figura 36 - Gráfico da percentagem de tecido conjuntivo das fibras musculares dos animais, expressa em %, após 90 dias de aplicação das correntes, dos grupos GCI, GNLT90, GEA90, GER90, GCF90 e GD90..... 63

Figura 37 - Gráfico dos valores da comparação da percentagem de tecido conjuntivo, expressa em %, entre os grupos experimentais 45 e 90 dias de aplicação das correntes..... 64

LISTAS DE TABELAS

Tabelas		Páginas
Tabela 1 -	Valores da intensidade máxima de contato, obtidos na avaliação da marcha dos grupos 45 dias, média e desvio padrão.....	42
Tabela 2 -	Valores da intensidade máxima de contato na avaliação da marcha dos grupos 90 dias, média e desvio padrão.....	43
Tabela 3 -	Valores da intensidade máxima de contato, na avaliação da marcha, entre os grupos 45 e 90 dias, média e desvio padrão.....	44
Tabela 4 -	Valores da massa corporal inicial do grupo 45 dias, média e desvio padrão obtidos, em gramas.....	45
Tabela 5 -	Massa corporal final do grupo 45 dias, em gramas, média e desvio padrão.....	46
Tabela 6 -	Massa corporal inicial do grupo 90 dias, em gramas, média e desvio padrão.....	47
Tabela 7 -	Massa corporal final do grupo 90 dias, em gramas, média e desvio padrão.....	48
Tabela 8 -	Resultados da força de contração máxima do MTC (expressa em Newton) dos grupos 45 dias, média e desvio padrão.....	49
Tabela 9 -	Força de contração máxima do MTC (expressa em Newton) dos grupos 90 dias, média e desvio padrão.....	50
Tabela 10 -	Valores da força de contração máxima do MTC (expressa em Newton) entre os grupos experimentais 45 e 90 dias, média e desvio padrão.....	51
Tabela 11 -	Valores da área das fibras musculares dos animais, expressa em μm^2, dos grupos 45 dias, média e desvio padrão.....	54
Tabela 12 -	Valores obtidos para o diâmetro menor das fibras musculares dos animais, músculo tibial cranial, expressa em µm, dos grupos 45 dias, média e desvio padrão.....	55
Tabela 13 -	Valores da área das fibras musculares dos animais, músculo tibial cranial, expressa em μm^2, dos grupos 90 dias, média e desvio padrão.....	56
Tabela 14 -	Valores do diâmetro menor das fibras musculares dos animais, expressa em µm, dos grupos 90 dias, média e desvio padrão.....	57
Tabela 15 -	Valores da comparação da área das fibras musculares dos animais expressa em μm^2, entre os grupos 45 e 90 dias, média e desvio padrão.....	58
Tabela 16 -	Valores da comparação do diâmetro menor das fibras musculares dos animais expressa em µm, entre os grupos 45 e 90 dias, média e desvio padrão.....	59

Tabela 17 - Valores obtidos para a percentagem de tecido conjuntivo das fibras musculares dos animais, músculo tibial cranial, expressa em %, dos grupos 45 dias, média e desvio padrão..... 62

Tabela 18 - Valores da percentagem de tecido conjuntivo diâmetro menor das fibras musculares dos animais, expressa em %, dos grupos 90 dias, média e desvio padrão..... 63

Tabela 19 - Valores da percentagem de tecido conjuntivo das fibras musculares dos animais, expressa em %, entre os grupos 45 e 90 dias, média e desvio padrão..... 64

Tabela 20 - Visão geral das médias dos resultados obtidos. ICP = intensidade máxima de contato da pegada; MCI = massa corporal inicial (g); MCF = massa corporal final (g); FMC = Teste de força máxima de contração muscular (N); AFM= área da fibra muscular (μm^2); DMF= diâmetro menor da fibra muscular (µm) e DTC = densidade de tecido conjuntivo (%)..... 65

LISTAS DE ABREVIAÇÕES

AFM - área da fibra muscular
ANOVA - análise de variância
COBEA - Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
DMF - diâmetro menor da fibra muscular
DTC - densidade de tecido conjuntivo
DW - degeneração “Walleriana”
EE - estimulação elétrica
GCF45 - Grupo Controle Final 45 dias
GCF90 - Grupo Controle Final 90 dias
GCI - Grupo Controle Inicial
GD45 - Grupo Desnervado 45 dias
GD90 - Grupo Desnervado 90 dias
GEA45 - Grupo Neurorrafia Látero-Terminal e Estimulação Aussie 45 dias
GEA90 - Grupo Neurorrafia Látero-Terminal e Estimulação Aussie 90 dias
GNLT90 - Grupo Neurorrafia Látero-Terminal - 90 dias
GNLT45 - Grupo Neurorrafia Látero-Terminal - 45 dias
GER45 - Grupo Neurorrafia Látero-Terminal Estimulação Russa 45 dias
GER90 - Grupo Neurorrafia Látero-Terminal Estimulação Russa 45 dias
HE - Hematoxilina-eosina
HZ - Hertz
ICP - intensidade máxima de contato da pegada
IGF-I - fator de crescimento I
LNPs - lesões nervosas periféricas
mA - mil amperes
MCF - massa corporal final
MCI - massa corporal inicial
mg/Kg - miligrama por quilo
Ms - Milissegundo
MTC - músculo tibial cranial
N - Newton
NLT - neurorrafia látero-terminal
NTL - neurorrafia termino-lateral
NTT - neurorrafia término-terminal
S - segundos
μm^2 - micrômetros quadrados (área)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 17
2 OBJETIVO 25
3 METODOLOGIA 26
3.1. Animais 26
3.2. Grupos experimentais 26
3.3. Cirurgia 29
3.4. Protocolo de estimulação elétrica 32
3.5. Análise da marcha – "CatWalk®" – intensidade máxima de contato 35
3.6 Teste de força de contração máxima do MTC 36
3.7 Análise morfométrica dos músculos e eutanásia 37
3.8 Processamento histológico do músculo tibial cranial 38
3.8.1 Morfometrias do músculo tibial cranial 39
3.8.2 Densidade de tecido conjuntivo do músculo tibial cranial 40
3.9 Análise Estatística 40
4 RESULTADOS 41
5 DISCUSSÃO 66
5. 1 Modelo animal 66
5.2 Autofagia 66
5.3 Cirurgia 67
5.4 Protocolo de eletroestimulação 67
5.5 Avaliação funcional da marcha – intensidade máxima de contato da pegada 69
5.7 Análise histológica e morfométrica do músculo tibial cranial 73
5.8 Densidade de tecido conjuntivo 75
6 CONCLUSÃO 77
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 78
8 ANEXO 78
8.1 Aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa 82
8.2 Análise estatística gerada pelo software Prisma Pad 5.1 88
8.3 Artigo a ser enviado para Acta cirurgica 107

1 INTRODUÇÃO

Diversas são as causas das lesões nervosas periféricas (LNPs), sendo frequentemente associadas a neoplasias, secções ou esmagamentos promovendo neuropatia inflamatória, a qual resulta em uma diminuição ou perda da sensibilidade e do controle motor no território inervado pelo nervo lesionado (SALMONS & JARVIS, 2008). As sequelas desse tipo de lesão irão depender da sua etiologia, localização e gravidade. Apesar da existência do desenvolvimento constante de técnicas para o tratamento, a recuperação morfológica e funcional raramente é total (VAREJÃO et al., 2001; DANEYEMEZ et al., 2005; GASPARINI et al., 2007; ROMÃO et al., 2007; RIBEIRO et al.,2008).

Os traumas, como acidentes automobilísticos ou quedas e acidentes industriais com objetos perfurocortantes, levam a lesões nervosas periféricas, que causam perda funcional importante para esses pacientes (ROBINSON, 2010). Esforços têm sido conduzidos na busca por aprimorar técnicas cirúrgicas e tratamentos posteriores com a finalidade de melhorar as condições de vida dos pacientes (SATO, 2005).

As lesões nos nervos periféricos causam alterações na estrutura, metabolismo e atividade fisiológica do corpo celular neuronal, podendo interromper a inervação dos órgãos distais à lesão e, tratando-se de neurônio motor, o órgão comprometido é o músculo (CHEM , 1978; DA SILVA, 1995).

Os nervos periféricos compõem-se de tecido nervoso e de tecidos conectivos. As fibras nervosas apresentam-se envolvidas por tecido conjuntivo, organizado em três níveis: epineuro, perineuro e endoneuro (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1999; MILLESI et al., 2007).

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

As lesões no nervo periférico são classificadas em função do envolvimento anatômico e dos achados clínicos posteriores a lesão em três níveis: neuropraxia (lesão tipo I), caracterizada por bloqueio fisiológico da condução elétrica, sem

interrupção da continuidade axonal ou degeneração; axoniotmese (lesão tipo II), em que ocorre ruptura na continuidade do axônio, porém os tubos endoneurais permanecem intactos; e neurotmese (lesão tipo III), na qual ocorre ruptura de uma ou mais camadas de tecido conectivo do nervo periférico (SEDDON, 1943).

Após uma lesão do nervo periférico, ocorrem alterações morfológicas, fisiológicas, moleculares e metabólicas no segmento distal à lesão, em alguns nodos terminais do coto proximal e no corpo celular do neurônio. Esta série de alterações são denominadas de Degeneração “Walleriana” (DW) e propiciam o meio adequado à regeneração dos axônios (FU & GORDON, 1997).

Após as primeiras 48h do trauma, inicia-se a DW no coto axonal distal, desenvolvendo-se ao longo de um a dois meses, caracterizada tanto por um processo de degeneração como também pela chegada de células de defesa no local da lesão e pela proliferação de células de Schwann, que irão determinar o processo da regeneração do tecido nervoso. Nesse processo, fatores neurotróficos, como o fator de crescimento I (IGF-I), são secretados tanto pelas células de Schwann (SENDTNER et al., 1992; STOLL e MULLER, 1999; Yuvrbova et al.; 2009) como pelos macrófagos localizados no coto distal (CHENG et al., 1996; TERENGHI, 1999; STOLL e MULLER, 1999) e irão estimular o processo de desenvolvimento das fibras nervosas.

Técnicas terapêuticas para recuperação dessas lesões nervosas são desenvolvidas por profissionais de diversas áreas da medicina, pesquisando a fisiopatologia das lesões nervosas periféricas com o intuito de promover a regeneração destes nervos e a recuperação funcional (RADTKE et al., 2009).

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

Viterbo, 1992 e Viterbo et al., 1992, propuseram a neurorrafia término-lateral sem lesão no nervo doador e, até mesmo, sem a remoção do epineuro (VITERBO et al., 1994ª). Com trabalho experimental em ratos, realizaram a secção do nervo fibular comum, que inerva o músculo tibial cranial (MTC) e seu coto distal foi suturado à face lateral do nervo tibial intacto, sem a remoção do epineuro. Obtiveram, pela primeira vez, reinervação muscular sem prejuízo ao nervo doador. 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. A técnica de neurorrafia látero-terminal chamou a atenção da comunidade científica por apresentar resultados expressivos em relação à regeneração da fibra nervosa (VITERBO et al., 1994b). Diversos estudos experimentais já foram realizados, reproduzindo a NLT (VITERBO, 1993; GALLI et al., 2002; KUMAR & HASSAN, 2002; YAMAMOTO et al., 2003; HAYASHI et al., 2004).

Existe controvérsia em relação a denominação desta técnica. Viterbo et al. (1992, 1994a, 1994b) denominam a técnica em relação ao local da sutura, sendo neurorrafia término-lateral quando o nervo doador é suturado na lateral do receptor e quando o nervo receptor é suturado na lateral do doador, a denominação deve ser neurorrafia látero-terminal.

O músculo esquelético é composto pelas células musculares, que quando estimuladas pelos motoneurônios α, promovem o encurtamento contrátil do músculo, e pelo tecido conectivo que é responsável por unir as células musculares entre si e aos ossos, e assim gerar o trabalho muscular (DOW et al., 2006).

Para que o tecido muscular realize o movimento, três pontos são relevantes: a inervação motora deve estar íntegra (motoneurônio α), a mobilidade articular presente e a transferência de carga ao sistema esquelético deve ser adequada (CRISCO et al., 1994). A desnervação interrompe o transporte de substâncias tróficas do motoneurônio para as fibras musculares, degenera as junções neuromusculares, altera as propriedades elétricas do sarcolema, além de diminuir a atividade da enzima acetilcolinesterase, aumentando assim a concentração de acetilcolina na junção neuromuscular e em toda a extensão do sarcolema. Tais fatores associados levam ao aumento no tempo da contração, além de diminuir a tensão gerada (TAKEKURA et al., 2003; ASHLEY et al., 2007 a,b; TOMORI et al., 2010).

A desnervação causa ainda muitas alterações ultraestruturais, entre elas a desorganização do sarcômero, ruptura de miofibrilas, alterações no número de ribossomos, no número e tamanho das mitocôndrias, além de alterações morfológicas no retículo sarcoplasmático (MARGRETH et al., 1972).

Assim, nota-se que o sistema neural está intimamente integrado ao sistema músculo-esquelético, portanto o processo de recuperação de uma lesão de nervo

periférico deve empregar uma conduta terapêutica não apenas voltada ao nervo e sim, relacionada ao músculo e às estruturas periarticulares. A recuperação funcional do membro acometido pela lesão neural depende não só da regeneração das células nervosas, como também da manutenção de um tecido muscular saudável. (ALVES, 2012)

Como sequela da desnervação poderá ocorrer uma paresia ou uma paralisia flácida em função da redução parcial ou total no número de unidades motoras que são recrutadas durante o movimento voluntário (BENDSZUS et al., 2002). O tecido muscular terá suas características morfológicas e funcionais alteradas, como a atrofia, degeneração e necrose das fibras musculares, além da substituição do tecido muscular por tecido conjuntivo fibroso, diminuição da força de contração, da extensibilidade e da excitabilidade neural (WISHART et al., 2008; YANG et al., 2008). Estudos têm demonstrado que o sistema nervoso controla os tecidos periféricos por dois mecanismo: um por impulsos dos neurônios motores, definido como mecanismo neuromotor; outro independente dos impulsos nervosos, o neurotrófico, controle que ocorre por liberação de substâncias químicas pelas fibras nervosas sobre os tecidos periféricos (MIDRIO, 2006). Estas alterações têm sido estudadas em diversos tipos de músculos e animais.

Nos períodos iniciais após a desnervação, ocorre menor atrofia nas fibras musculares. 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 massa de todo o músculo. Esta diferença entre redução de massa 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 & RAY, 1950).

Não se observa a substituição de tecido muscular por tecido fibroso em nenhum estágio de desnervação, mas pode ser observado uma invasão de gordura em alguns músculos (BOWDEN, 1944).

Diversos autores confirmaram a ocorrência tanto de brotamento colateral motor quanto sensorial, após a Neurorrafia Término-Lateral, com subsequente recuperação fisiológica do músculo previamente desnervado e recuperação funcional significante (MCCALLISTER et al., 1999; LUTZ et al., 2000; HAYASHI et al., 2004).

O tecido conjuntivo tem a função de manter a estrutura anatômica e funcional do músculo e, consequentemente, uma caraterística normal de contração muscular. É dividido no músculo, didaticamente, em 3 envoltórios. O epimísio, a camada mais externa de tecido conjuntivo; perimísio - a camada que agrupa grupos de fibras musculares, formando os fascículos; e o endomísio, a camada mais interna, a qual envolve as fibras musculares. Essas camadas mantêm comunicação entre si e, quando o músculo sofre alterações estruturais e funcionais, o seu tecido conjuntivo sofre alterações. Nas lesões de nervos periféricos, a eletroestimulação é usada com o objetivo de minimizar a atrofia e a proliferação de tecido conjuntivo (DECHERCHI et al., 2003).

A estimulação elétrica (EE) com finalidade regenerativa, embora controvertida, 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 (NEMETH, 1982; KANAYA & TAJIMA, 1992, WILLIAMS, 1996; IÑIGO, 1998; KOTWAL & SCMIDT, 2001; SOUZA et al., 2001; CARVALHO et al., 2002).

A estimulação elétrica, pela ativação indireta da liberação de substâncias neurotróficas, poderia modificar a organização estrutural em músculos desnervados em função da plasticidade ou adaptação do tecido muscular (RUSSO et al., 2007).

Estímulos mecânicos, produzidos pelos exercícios físicos ativos ou passivos exercem papel fundamental para manter o músculo desnervado saudável e evitar atrofia. A EE, que comprovadamente provoca estímulos mecânicos, possui um papel importante na regulação da síntese proteica, na manutenção do trofismo, da característica elástica e capacidade de manter a morfologia e a função das fibras musculares desnervadas semelhantes às das fibras com inervação íntegra (DOW et al., 2006; SALMONS & JARVIS, 2008).

O uso da estimulação elétrica para aumentar o desempenho do músculo esquelético já é aceito e demonstrado em estudos experimentais e clínicos (SOO et al., 1988; RUFFIN & KNINGHAM, 1993; SNYDER-MACKLER et al., 1994).

Parte do efeito da aplicação da EE pode estar na facilitação neural em função de um número maior de unidades motoras ativas e aumento na taxa de

impulsos ou em um padrão mais eficiente de recrutamento (FOX, 1975; RUFFIN & KNINGHAM, 1993; MCINTYRE & ROBERTSON, 1992).

Como no caso do nervo isquiático em 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 (BAIN, 1989; DE MEDINACELI & WYATT, 1982; SATO, 2005).

A EE está relacionada à redução dos danos da imobilização, minimizando a redução da área de secção transversal, fibrose intersticial e deficiência de suprimento sanguíneo (QIN et al.,1997). Além dos efeitos metabólicos, a EE é capaz de aumentar a atividade de enzimas oxidativas em fibras musculares, realçar a regeneração muscular e prevenir a atrofia muscular esquelética (PETTE & STARON, 1997).

A EE também promove o aumento da efetividade contrátil das fibras musculares, viabilizando, desse modo, a dinâmica de captação da insulina via GLUT-4, metabolismo da glicose e a atividade das vias metabólicas celulares (GUIRRO et al., 2004). O transportador de glicose expressado, predominantemente, no músculo esquelético é o GLUT-4 e sua expressão (JAMES et al., 1989), além de ser dependente da ação da insulina, também é relacionada à contratilidade do músculo, existindo, assim, clara associação entre o transporte de glicose nas fibras musculares e o grau de contração muscular basal (GASTER et al., 2000).

Alguns trabalhos confirmaram, mediante registro de atividade, que ocorrem passagens de estímulos elétricos no músculo reinervado, porém, ainda não se conhece todas as possibilidades de recuperação de uma musculatura reinervada por Neurorrafia Término-Lateral (GIOVANOLI et al., 2000; ISAACS et al., 2005).

Entretanto, o músculo reinervado deveria apresentar características fisiológicas que permitissem boa função, pois a necessidade funcional de um paciente vai além da passagem do estímulo pela junção entre o nervo doador e o nervo receptor. Uma das características mais importantes que um músculo íntegro deve apresentar é a capacidade de produzir tensão durante a contração, objetivando promover movimento (ENOKA, 2000).

O emprego da estimulação elétrica em músculos desnervados se justifica tanto pela ação direta do estímulo elétrico, como pela ativação indireta da liberação de substâncias neurotróficas. Assim o músculo tem sua organização estrutural modificada (RUSSO et al., 2007). Outros estudos relatam que a eletroestimulação também estimula a proliferação das células satélites, diminuindo a apoptose (LIM & HAN, 2010; ZHANG et al., 2010; GUO et al., 2012).

São comuns investigações extensas sobre a eletroestimulação, mas ainda assim não se sabe se todos os procedimentos são realmente funcionais. Por isso, os pesquisadores entram em desacordo quanto à frequência, duração, intensidade e parâmetros de avaliação (NEMETH, 1982; KANAYA & TAJIMA, 1992; WILLIAMS, 1996, IÑIGO, 1998; GORDON et al., 2011; MACIEL et al., 2013). Tagami et al. (2009) observaram, que a regeneração neuromuscular, durante a aplicação de eletroestimulação acontece de forma benéfica e sem prejuízos funcionais.

Gordon et al. (2011), por sua vez, observaram que a estimulação elétrica foi eficaz apesar da regressão do potencial de crescimento dos neurônios lesionados cronicamente.

Existem atualmente no mercado brasileiro dois tipos distintos de corrente de média frequência, a corrente Russa e a corrente Aussie. A corrente Russa apresenta os seguintes parâmetros: frequência de 2500 Hz, ciclo de trabalho de 50%, estímulo de 10 segundos, seguido por outro de 50 segundos ou descanso, pulso de 4 ms e burst ajustável. É recomendado que a corrente seja utilizada durante 10 minutos por sessão e alternadamente, podendo ser utilizada no tratamento da atrofia muscular e aumento de força, sendo que com a associação de exercícios físicos, o aumento de força tem um resultado significativo (DELITTO & ROSE, 1986).

A corrente Aussie é uma corrente elétrica terapêutica alternada com frequência na faixa de 1000 Hz, com alguma semelhança em relação à Corrente Russa. A diferença está no valor da corrente em Hz utilizada, bem como no formato de onda. A corrente Russa apresenta duração de pulso de 4ms, já a corrente Aussie apresenta duração de 2ms. Estudos sugerem, ainda, 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 et al., 2007).

A resistência à fadiga muscular é um fator de extrema importância dentro de procedimentos de reabilitação, envolvendo a recuperação dos músculos esqueléticos, particularmente quando se faz opção de uso de uma corrente excitomotora (Russa e Aussie) (WARD et al., 2007).

Considerando as pesquisas atuais, que apresentam a eletroestimulação como coadjuvante importante na regeneração das lesões nervosas periféricas, mas que ainda suscita diversas questões; e a neurorrafia látero-terminal uma importante técnica no tratamento de lesão nervosa periférica, sobretudo em casos críticos, mas que ainda demanda aprimoramento, decidiu-se estudar o efeito da eletroestimulação com dois tipos diferentes de correntes, na reinervação periférica, por meio da neurorrafia látero-terminal.

2 OBJETIVO

Comparar a eficiência entre as correntes russa e aussie na recuperação do músculo tibial cranial após neurorrafia látero-terminal em ratos.

3 METODOLOGIA

Este trabalho foi realizado no Laboratório Experimental da Faculdade de Medicina de Botucatu (eutanásia dos animais, coleta das peças histológicas, análise da marcha, teste de força muscular e eletroneuromiografia) e na Universidade do Sagrado 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 após análise do Comitê de Ética da Faculdade de Medicina de Botucatu, sob o número 1042/2013 (Anxo I).

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

3.2. Grupos experimentais

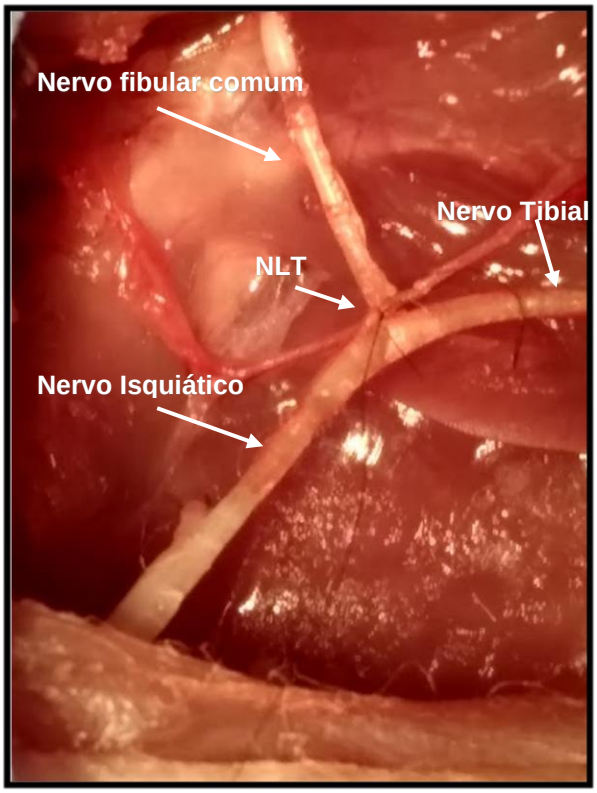
Os ratos foram agrupados em: Grupo Controle Inicial (GCI), com 8 animais; Grupo Neurorrafia Látero-Terminal 45 (GNLT45), com 8 animais; Grupo Neurorrafia Látero-Terminal com Estimulação Aussie 45 dias (GEA45), com 16 animais; Grupo Neurorrafia Látero-Terminal com Estimulação Russa 45 dias (GER45), com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

Os animais dos grupos GCI, GCF 45 e GCF 90 não sofreram procedimento cirúrgico ou protocolo de eletroestimulação. Os animais do grupo GCI foram eutanasiados com 80 dias, os dos grupos GCF 45 e GCF 90 foram eutanasiados, respectivamente, ao final da aplicação do protocolo de eletroestimulação, com 45 e 90 dias.

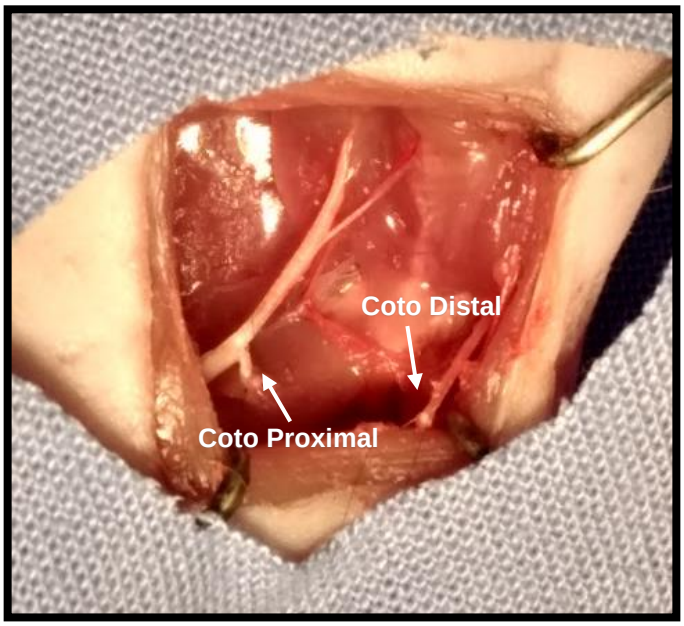
Nos grupos (GNLT 45 e 90), apresentando 08 animais cada, o nervo fibular comum foi seccionado e seu coto proximal encurvado medialmente 100 graus, e sepultado na musculatura adjacente, impedindo, dessa forma, a regeneração espontânea. O coto distal do nervo fibular comum foi encurvado, aproximadamente 80 graus, e suturado lateralmente ao nervo tibial. Após a cirurgia, os animais não receberam os protocolos de eletroestimulação (Fig. 1).

Figura 1 - Procedimento cirúrgico realizado nos Grupos GNLT 45 e GNLT 90.



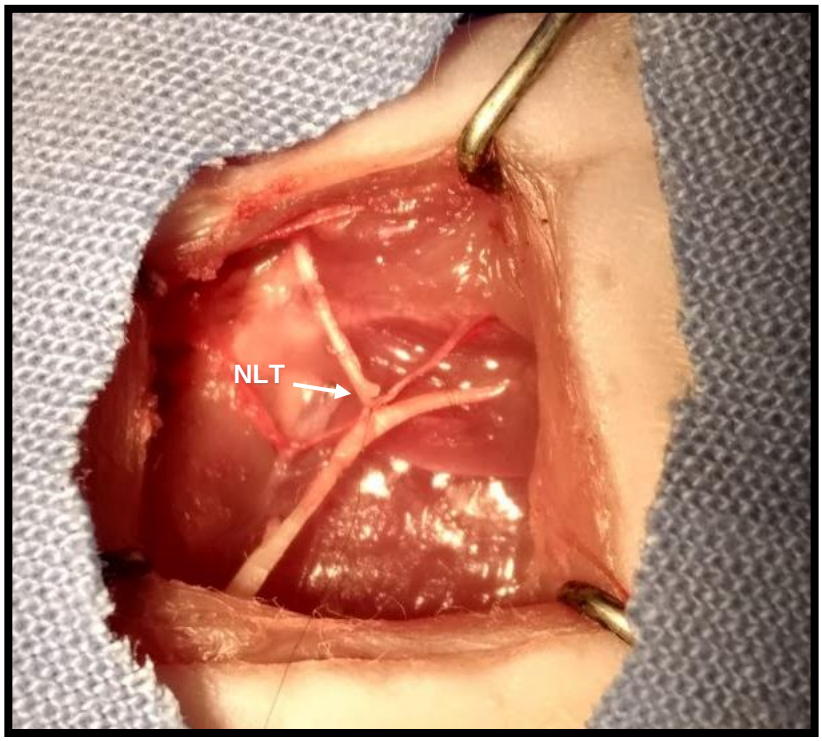
Nos Grupos (GD45 e GD90), com 8 animais, o nervo fibular comum foi seccionado e seus cotos invertidos 180 graus. O coto distal foi sepultado à musculatura subjacente. O coto proximal foi transpassado por uma incisão na musculatura glútea e suturado no plano subcutâneo a fim de impedir reinervação motora (Fig. 2).

Figura 2 - Procedimento cirúrgico dos grupos desnervados GD45 e GD 90.



Nos Grupos (GEA45 e GEA90) e (GER45 e GER90), com 16 animais cada, o nervo fibular comum foi seccionado e seu coto proximal encurvado medialmente 100 graus, e sepultado à musculatura adjacente, impedindo, dessa forma, a regeneração espontânea. O coto distal do nervo fibular comum 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. 3).

Figura 3 – Procedimento cirúrgico da neurorrafia látero-terminal (NLT) dos grupos eletroestimulados (GEA 45, GEA 90, GER 45 e GER 90).



3.3. Cirurgia

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

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. 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 (MACIEL et al., 2013).

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 (MACIEL et al., 2013).

No pós-operatório, os animais foram observados quanto à dor, considerando os seguintes sinais: vocalização, piloereção, postura encurvada, hipotermia, descarga ocular, ato de lamber-se, maior agressividade, relutância em interagir, alteração no consumo de água e ração e, por último, a perda de massa. A analgesia pós-operatória foi feita com acetominofenol (paracetamol) 2 mg/mL de água, na água do bebedouro a cada 4 horas na água oferecida. A medicação foi usada até não haver mais sinais de dor.

A face dorso-lateral do membro pélvico direito, marcada adequadamente, sofreu incisão de 2 a 3 cm longitudinalmente ao maior eixo do membro, comprometendo pele e tecido subcutâneo com posterior divulsão da musculatura (Fig. 4). Após, foi realizado o procedimento, de acordo com cada grupo experimental.

Figura 4- Procedimento cirúrgico, divulsão na face dorso-lateral do membro pélvico direito.

As cirurgias foram realizadas com o auxílio de lupa cirúrgica de cabeça com aumento de três vezes.

As neurorrafias foram realizadas com fio monofilamentar de nylon 10-0 com agulha cilíndrica e circular (Fig. 5), 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.

Figura 5 - Fio monofilamentar de nylon 10-0 com agulha cilíndrica e circular.

Os animais foram mantidos em caixas apropriadas, contendo quatro animais cada, em temperatura controlada (25 ± 2ºC), ciclo claro-escuro de 12 horas, com ração e água *ad libitum*, até o momento da eutanásia (Fig. 6).

Figura 6 - Animais mantidos em caixas apropriadas, biotério da Universidade do Sagrado Coração (USC).

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: segundas, quartas e sextas no período vespertino, 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 1000Hz, sincronizada , modulação em 30Hz para fibras musculares tipo I; e 100Hz para fibras musculares tipo II, com duração do pulso de 2ms, tempo de contração de 10 segundos por 20 segundos de relaxamento, durante 10 minutos para cada modulação, promovendo uma média de 40 contrações por sessão. A intensidade da corrente elétrica foi aquela suficiente para promover a contração muscular, sendo padronizada em 40mA. Foi utilizado estimulador elétrico Neurodyn® 4 canais, da empresa Ibramed (Fig. 7).

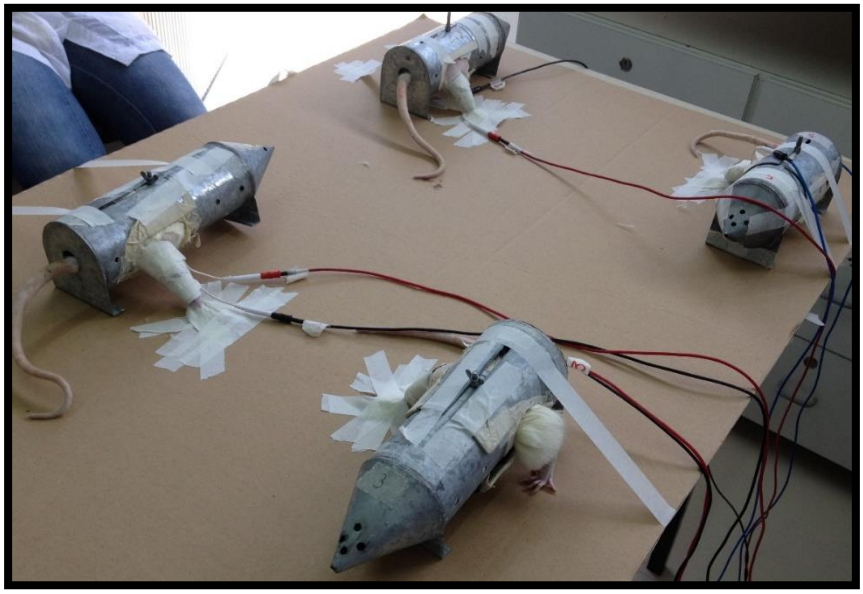
Figura 7 - Estimulador elétrico Neurodyn® 4 canais, da empresa Ibramed.

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, segundas, quartas e sextas no período vespertino, 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 2500Hz, sincronizada, modulação em 30Hz para estimular fibras musculares Tipo I; e 100Hz para estimular fibras musculares Tipo II, com duração de burst de 4ms, tempo de contração de 10 segundos por 20 segundos de relaxamento, durante 10 minutos para cada modulação, promovendo uma média de 40 contrações por sessão. A corrente inicial foi aquela suficiente para promover a contração muscular, sendo padronizada em 40mA. Foi utilizado estimulador elétrico Endophasys®, da empresa KLD (Fig. 8).

Figura 8 - 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 esta imobilização, os eletrodos de um centímetro quadrado de área foram fixados sobre o ventre do respectivo músculo. Para aplicação da estimulação elétrica foram utilizados eletrodos autoadesivos (Fig. 9).

Figura 9 - Eletroestimulação dos animais (imobilizados dentro das cápsulas metálicas).



3.5. Análise da marcha – "CatWalk®" – intensidade máxima de contato

Para o teste CatWalk®, os animais foram 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 (Fig. 10). A plataforma é monitorizada com uma câmara de vídeo colocada sob si e conectada a um computador equipado com um programa de aquisição de imagem (AGUIAR, 2014).

Figura 10 - Plataforma "CatWalk®", para realização da análise de intensidade máxima de contato da caminhada.

Utilizando o CatWalk®, realizou-se o estudo das pegadas e 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. caminhada com duração de , ao menos, 5 segundos;
2. caminhada que não excedesse a 10 segundos em tempo;

3. que o número mínimo de pegadas fosse três, completas;

4. pegadas incompletas nesse tempo e nesse percurso foram descartadas;

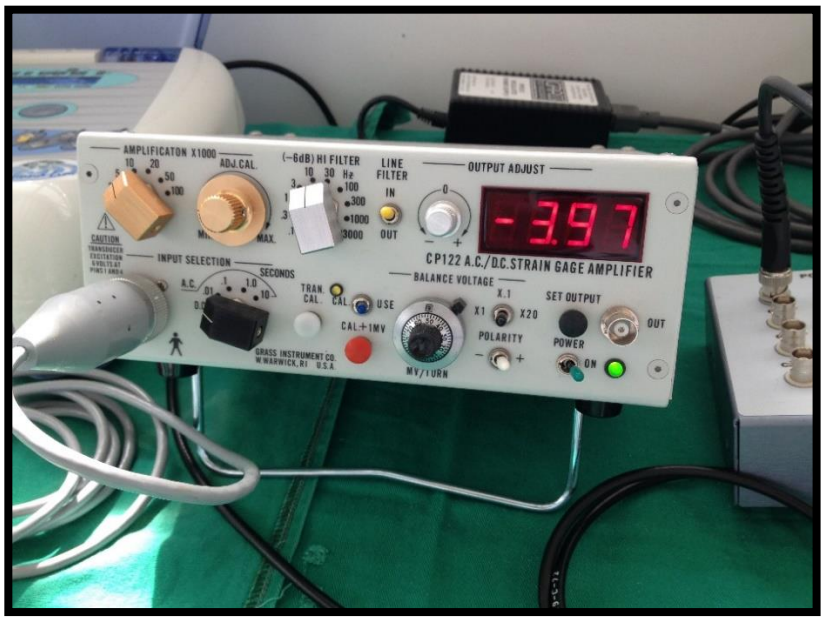
5. a variação na velocidade permitida foi de 60%.

Esses critérios são preestabelecidos no programa do “CatWalk®” e podem ser mudados conforme a conveniência de cada experimento. A intensidade do sinal depende da área da pata em contato com a plataforma e aumenta com a pressão aplicada pela pata (PAIVA, 2016). O parâmetro avaliado foi a intensidade máxima de contato da pata do animal do membro pélvico direito, do lado que sofreu a cirurgia.

3.6 Teste de força de contração máxima do MTC

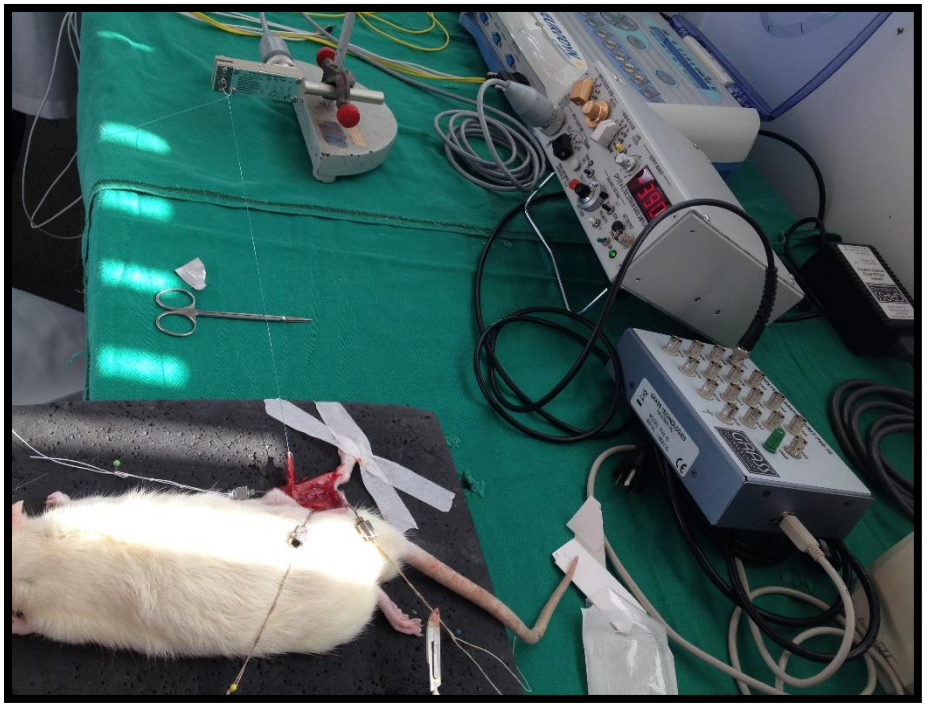
O tendão distal do músculo tibial cranial foi seccionado na sua inserção. Um fio de náilon 4.0 foi suturado nesse tendão e a outra extremidade foi amarrada a um pequeno gancho ligado a um transdutor de força FT03 (Grass Technologies) (Fig. 11) para a coleta dos dados.

Figura 11 - Transdutor de força FT03 .



O comprimento do músculo foi mantido por um pré-tensionamento com carga de 0,18N e foi reajustado entre os testes. Este valor de pré-tensionamento foi determinado durante a calibração do dispositivo. Um estimulador elétrico Neurodyn de 10 canais da Ibramed foi posicionado diretamente no músculo exposto. O ensaio de contração muscular consistiu de três aplicações sequenciais de 1s. Um computador registrou os picos de força. A tensão muscular foi reajustada entre as medições. O teste de contração tetânica (Fig. 12), foi realizado com 100mA e frequência de 100Hz, utilizando a corrente AUSSIE para realizar o estímulo no músculo.

Figura 12 - Realização do teste de contração tetânica do músculo Tibial Cranial.



3.7 Análise morfométrica dos músculos e eutanásia

Após a realização dos procedimentos cirúrgicos, os animais receberam dose letal de pentobarbital sódico, administrado intraperitonealmente.

Os músculos foram retirados e fixados por imersão em paraformaldeído 4% tamponado (PBS 0,1 M, pH 7,0), por 24 horas, e processado rotineiramente para inclusão em parafina (Fig. 13).

Figura 13 - Coleta do músculo tibial cranial.

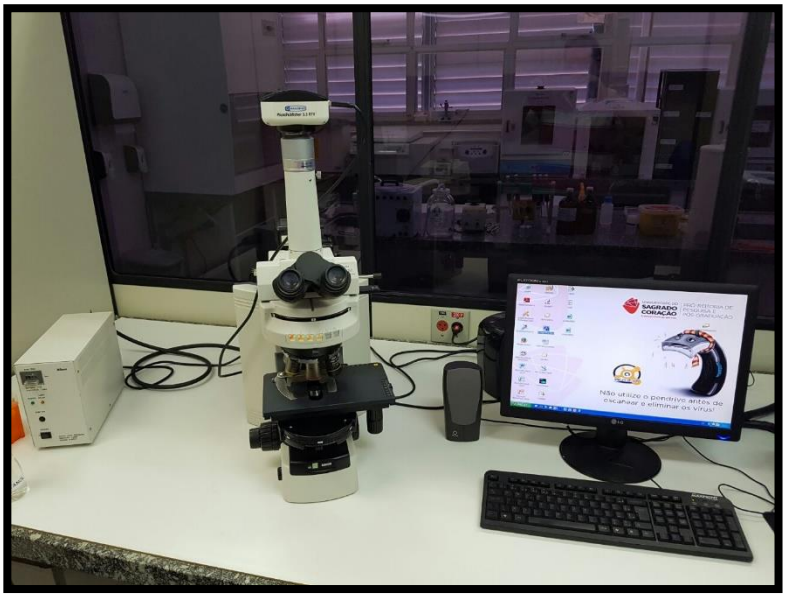
.

3.8 Processamento histológico do músculo tibial cranial

Foram realizados cortes seriados de 5µm de espessura, obtidos a partir dos blocos de parafina e distendidos em lâminas de vidro. As lâminas foram codificadas e o código revelado somente após a obtenção dos dados quantitativos para garantir uma análise sem tendenciosidade. Após hidratação, as lâminas foram coradas pela Hematoxilina-eosina (HE) para estudo morfométrico; e com Tricômico de Masson para a avaliação da percentagem de tecido conjuntivo.

As imagens foram capturadas utilizando um microscópio Nikon Eclipse 80i, acoplado a uma câmera QIMAGING Microplublish 3.3 Cooled e processadas pelo software Image Pró® Plus version 5.1.2 (Fig. 14).

Figura 14 - Sistema de captura de imagem, microscópio Nikon Eclipse 80i, acoplado a uma câmera QIMAGING Microplublish 3.3 Cooled.



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 200 vezes (ocular de 10 vezes e objetiva de 20 vezes) para a análise das fibras musculares.

3.8.1 Morfometrias do músculo tibial cranial

As imagens digitalizadas e salvas foram analisadas utilizando medidas de área, diâmetro menor das fibras musculares e do músculo como um todo. As medidas foram feitas de modo semiautomático, utilizando-se *software* Image Pro Plus 6.0. Foram registradas 5 fotos de campos diferentes de cada animal, com objetiva de 20x, para análise morfométrica das fibras musculares. Foram mensuradas aleatoriamente uma média de 220 fibras por animal, seguindo um sentido horizontal na lâmina histológica da esquerda para a direita e voltando pela fileira inferior no sentido contrário, até ser atingido o valor médio de 220 fibras, descartando aquelas que não apareciam completas na imagem fragmentada.

3.8.2 Percentagem de tecido conjuntivo do músculo tibial cranial

Foi realizada uma foto da área de secção transversal total do músculo com objetiva de 2x, para aferição de sua área total e, em seguida, foram capturadas fotos com a objetiva de 20x, também da área total do músculo com o objetivo de aproximar detalhes da coloração, para que o programa Image Pro-Plus® 6.2 (Media Cybernetics, Bethesda, MD, USA) reconhecesse com mais fidelidade o Azul de Anilina, responsável pela marcação do tecido conjuntivo nesta técnica. Após as aferições, foi realizado o cálculo para obtenção da percentagem de tecido conjuntivo existente no músculo.

3.9 Análise estatística

A análise estatística foi efetuada por meio do software Graphpad Prism 5.1. A normalidade da distribuição dos dados foi aferida 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 ± desvio padrão). O nível de significância considerado foi de 5%.

4 RESULTADOS

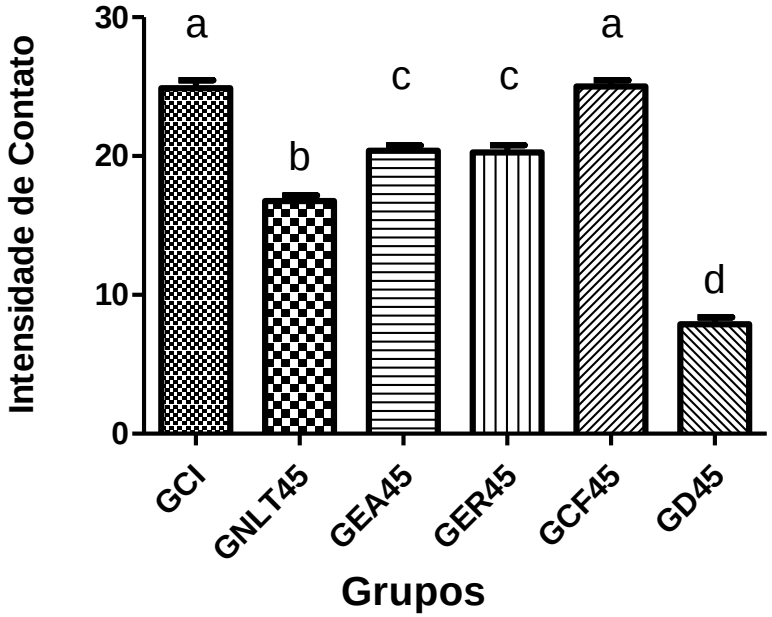
Nesta pesquisa não houve perda de animais e nenhum deles apresentou deformidades articulares, contratura, não promovendo alteração na marcha do animal, não havendo, portanto, necessidade de substituição.

Durante a eletroestimulação todos os animais apresentaram contrações musculares.

As figuras e tabelas apresentadas a seguir mostram os resultados de todos os grupos controles e experimentais (45 e 90 dias) em gráficos, médias e desvio padrão, respectivamente, dos seguintes parâmetros analisados: avaliação da marcha (intensidade máxima de contato), massa do animal (inicial e final), teste de força da contração muscular, morfometria das fibras musculares (área e diâmetro menor) e comparação dos resultados de todos os parâmetros entre os grupos 45 e 90 dias.

A Figura 15 e a Tabela 1 apresentam os resultados da intensidade máxima de contato obtidos na avaliação da marcha para o grupo 45 dias. Para os animais avaliados após 45 dias de eletroestimulação, os grupos controle inicial e final apresentaram resultados superiores aos demais grupos, os grupos GNLT45, GEA45 e GER45 foram estatisticamente semelhantes entre si e superiores ao grupo desnervado.

Figura 15 – Gráfico da intensidade máxima de contato dos animais após 45 dias de aplicação das correntes, dos grupos GCI, GNLT45, GEA45, GER45, GCF45 e GD45. Letras diferentes entre si indicam diferenças estatisticamente significativas (p≤ 0,05).



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

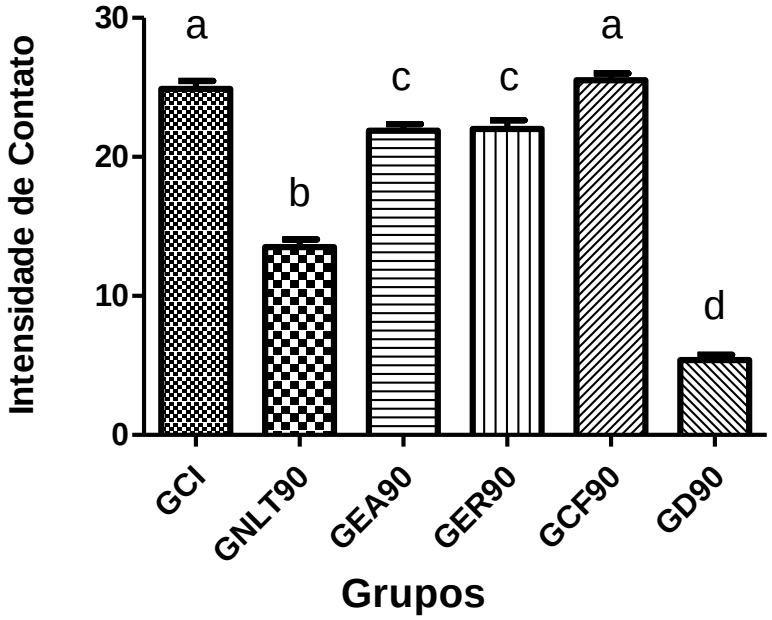
Tabela 1 - Valores da intensidade máxima de contato, obtidos na avaliação da marcha dos grupos 45 dias, média e desvio padrão.

GRUPOS	MÉDIA	DP
GCI	24,88[a]	± 1,64
GNLT45	16,75[b]	± 1,16
GEA45	20,38c	± 1,06
GER45	20,25[c]	± 1,49
GCF45	25,00[a]	± 1,31
GD45	7,88[d]	± 1,46

Letras diferentes entre si indicam diferenças estatisticamente significativas (p≤ 0,05).
GCI=GCF45>(GEA45=GER45)>GNLT45>GD45.

Os resultados da intensidade máxima de contato obtidos na avaliação da marcha dos animais pertencentes ao grupo experimental 90 dias são apresentados na Figura 16 e a Tabela 2. Observa-se que os grupos controle inicial e final apresentaram resultados superiores aos demais grupos; os grupos GEA90 e GER90 foram estatisticamente semelhantes entre si e superiores aos GNLT 90 e GD90.

Figura 16 - Gráfico da İntensidade máxima de contato dos animais após 90 dias de aplicação das correntes, dos grupos GCI, GNLT90, GEA90, GER90, GCF90 e GD90. Letras diferentes entre si indicam diferenças estatisticamente significativas (p≤ 0,05).



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

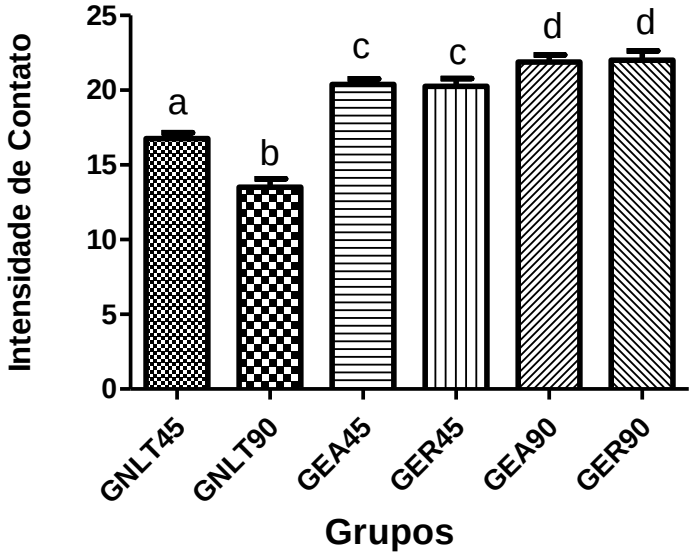
Tabela 2 - Valores da intensidade máxima de contato na avaliação da marcha dos grupos 90 dias, média e desvio padrão.

GRUPOS	MÉDIA	DP
GCI	24,88[a]	± 1,64
GNLT90	13,50[b]	± 1,60
GEA90	21,88[c]	± 1,36
GER90	22,00[c]	± 1,77
GCF90	25,50[a]	± 1,41
GD90	5,38[d]	± 1,06

Letras diferentes entre si indicam diferenças estatisticamente significativas (p≤ 0,05).
GCI=GCF90>(GEA90=GER90)>GNLT90>GD90.

A análise comparativa, observada na Figura 17 e Tabela 3, da intensidade máxima de contato da avaliação da marcha, mostrou que o valor apresentado pelos grupos eletroestimulados 90 dias foi superior ao grupo 45 dias e que ambos os grupos eletroestimulados obtiveram resultados melhores que os grupos que somente realizaram neurorrafia.

Figura 17 - Gráfico dos valores da comparação da intensidade máxima de contato dos animais após 45 e 90 dias de aplicação das correntes, dos grupos : GNLT 45e 90, GEA45 e 90, GER45 e 90. Letras diferentes entre si indicam diferenças estatisticamente significativas (p≤ 0,05).



(GNLT45>GNLT90)<(GEA90=GEA90) > (GEA45=GER45).

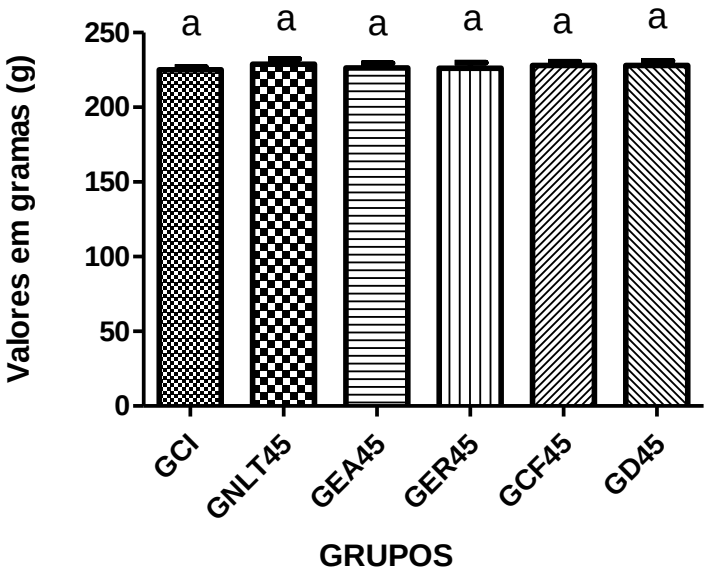
Tabela 3 – Valores da intensidade máxima de contato, na avaliação da marcha, entre os grupos 45 e 90 dias, média e desvio padrão.

GRUPOS	MÉDIA	DP
GNLT45	16,75[a]	± 1,16
GNLT90	13,50[b]	± 1,60
GEA45	20,38[c]	± 1,06
GER45	20,25[c]	± 1,49
GEA90	21,88[d]	± 1,36
GER90	22,00[d]	± 1,77

Letras diferentes entre si indicam diferenças estatisticamente significativas (p≤ 0,05).
(GNLT45>GNLT90)< (GEA90=GEA90) > (GEA45=GER45).

As Figuras 18 e 19, Tabelas 4 e 5 (Grupo 45), Figuras 20 e 21, Tabelas 6 e 7 (Grupo 90), apresentam os valores referentes à massa corporal dos ratos no início e no final do experimento, respectivamente. As massas foram comparadas entre os grupos. Pôde-se observar que houve uma homogeneidade entre os valores da massa ente os animais do mesmo grupo.

Figura 18 - Gráfico da massa corporal inicial (expressa em gramas) dos grupos GCI, GNLT45, GEA45, GER45, GCF45 e GD45. Letras diferentes entre si indicam diferenças estatisticamente significativas (p≤ 0,05).



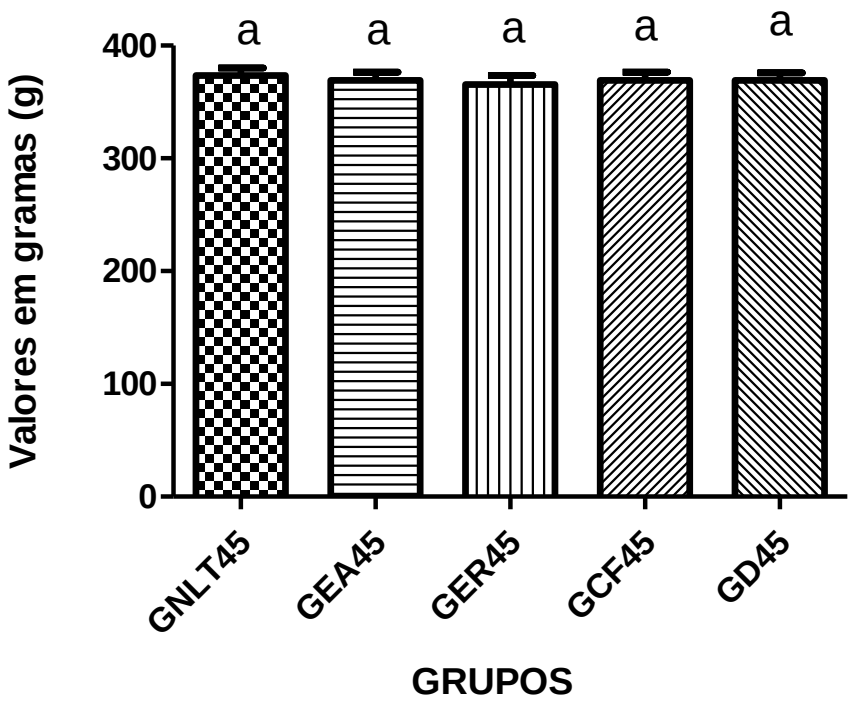
GC I=GNLT45=GEA45=GER45=GCF45=GD45.

Tabela 4 - Valores da massa corporal inicial do grupo 45 dias, média e desvio padrão, obtidos, em gramas.

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

Letras diferentes entre si indicam diferenças estatisticamente significativas (p≤ 0,05).
GC I=GNLT45=GEA45=GER45=GCF45=GD45.

Figura 19 - Gráfico da massa corporal final (expressa em gramas) dos grupos GNLT45, GEA45, GER45, GCF45 e GD45. Letras diferentes entre si indicam diferenças estatisticamente significativas (p≤ 0,05).



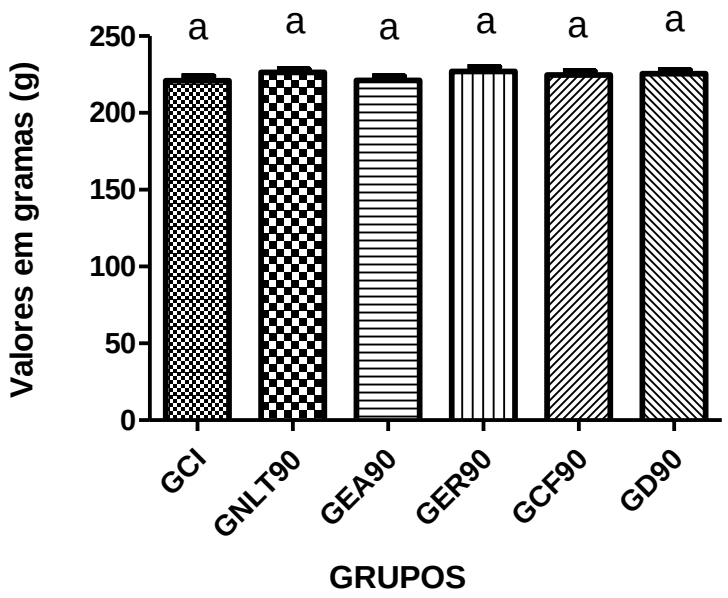
GNLT45=GEA45=GER45=GCF45=GD45.

Tabela 5 - Massa corporal final do grupo 45 dias, em gramas, média e desvio padrão.

GRUPOS	MÉDIA	DP
GNLT45	373,60ª	± 20,90
GEA45	369,30ª	± 23,29
GER45	365,40ª	± 25,17
GCF45	369,00ª	± 23,95
GD45	369,30ª	± 21,07

Letras diferentes entre si indicam diferenças estatisticamente significativas (p≤ 0,05).
GNLT45=GEA45=GER45=GCF45=GD45.

Figura 20 - Gráfico da massa corporal inicial (expressa em gramas) dos grupos GCI, GNLT90, GEA90, GER90, GCF90 e GD90. Letras diferentes entre si indicam diferenças estatisticamente significativas (p≤ 0,05).



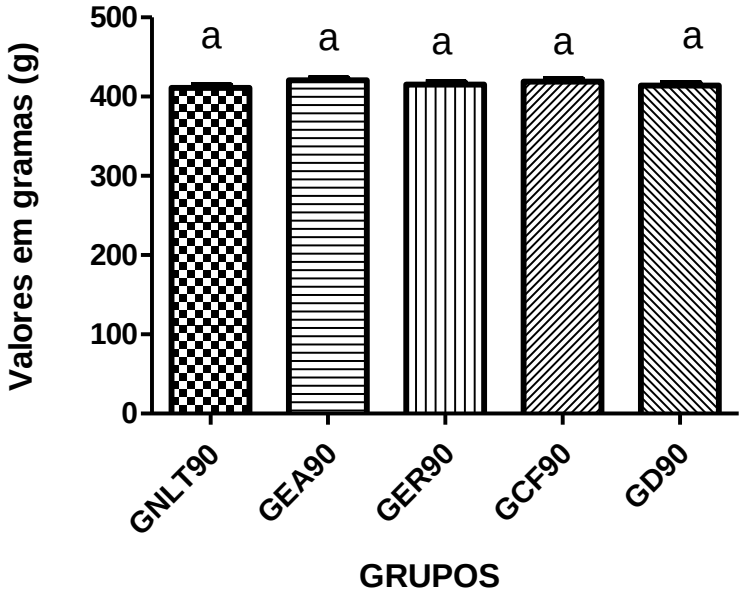
GC I=GNLT90=GEA90=GER90=GCF90=GD90.

Tabela 6 - Massa corporal inicial do grupo 90 dias, em gramas, média e desvio padrão.

GRUPOS	MÉDIA	DP
GCI	225,00ª	± 6,24
GNLT90	226,30ª	± 6,62
GEA90	221,10ª	± 8,88
GER90	226,90ª	± 9,43
GCF90	224,60ª	± 8,21
GD90	225,50ª	± 7,03

Letras diferentes entre si indicam diferenças estatisticamente significativas (p≤ 0,05).
GCI=GNLT90=GEA90=GER90=GCF90=GD90.

Figura 21 – Gráfico da massa corporal final (expressa em gramas) dos grupos GNLT90, GEA90, GER90, GCF90 e GD90. Letras diferentes entre si indicam diferenças estatisticamente significativas (p≤ 0,05).



GNLT90=GEA90=GER90=GCF90=GD90.

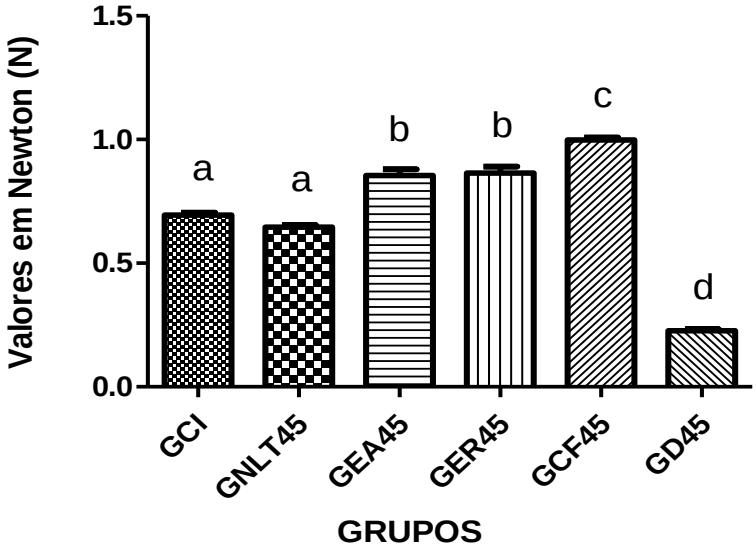
Tabela 7 - Massa corporal final do grupo 90 dias, em gramas, média e desvio padrão.

GRUPOS	MÉDIA	DP
GNLT90	411,20ª	± 10,44
GEA90	420,60ª	± 8,53
GER90	415,10ª	± 9,87
GCF90	419,00ª	± 9,63
GD90	414,00ª	± 9,85

Letras diferentes entre si indicam diferenças estatisticamente significativas (p≤ 0,05).
GC I=GNLT90=GEA90=GER90=GCF90=GD90.

A Figura 22 e a Tabela 8 representam a força de contração máxima do MTC entre os grupos quando estimulado com frequência de 100 Hz. O GCF45 apresentou maior valor de força de contração em relação aos demais grupos, os grupos GEA45 e GER45 não apresentaram diferença significativa entre si, mas apresentaram valores significativamente maiores que os grupos (GCI = GNLT45) > GD45.

Figura 22 - Gráfico da força de contração máxima do MTC (expressa em Newton) dos grupos GCI, GNLT45, GEA45, GER45, GCF45 e GD45. Letras diferentes entre si indicam diferenças estatisticamente significativas (p≤ 0,05).



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

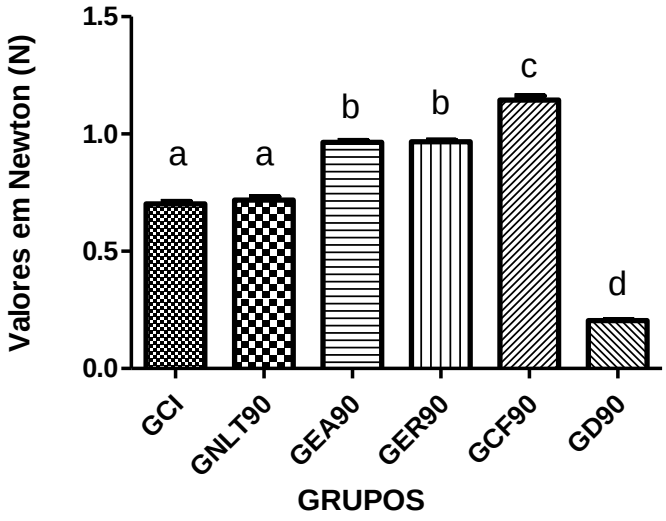
Tabela 8 - Resultados da força de contração máxima do MTC (expressa em Newton) dos grupos 45 dias, média e desvio padrão.

GRUPOS	MÉDIA	DP
GCI	0,69[a]	± 0,03
GNLT45	0,65[a]	± 0,02
GEA45	0,85[b]	± 0,07
GER45	0,86[b]	± 0,07
GCF45	1,00[c]	± 0,03
GD45	0,23[d]	± 0,01

Letras diferentes entre si indicam diferenças estatisticamente significativas (p≤ 0,05).
GCF45>(GEA45=GER45)>(GCI=GNLT45)>GD45.

A Figura 23 e Tabela 9 abaixo mostram a comparação entre os grupos quanto à resposta de força contrátil (N) do músculo tibial cranial após estímulo no músculo e no nervo fibular comum. Observou que o grupo GCF90 apresenta o melhor resultado referente ao teste de força de contração, sendo maior que os grupos eletroestimulados GEA90 e GER90 , os quais não apresentam diferença significativa entre si, mas mostram resultados superiores aos grupos CGI, GNLT90 e GD90.

Figura 23 - Gráfico dos resultados obtidos no teste de força de contração máxima do MTC (expressa em Newton) dos grupos GCI, GNLT90, GEA90, GER90, GCF90 e GD90. Letras diferentes entre si indicam diferenças estatisticamente significativas (p≤ 0,05).



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

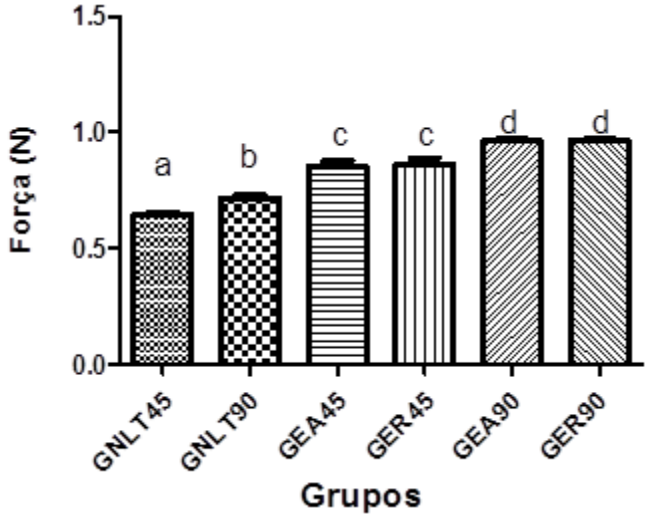
Tabela 9 - Força de contração máxima do MTC (expressa em Newton) dos grupos 90 dias, média e desvio padrão.

GRUPOS	MÉDIA	DP
GCI	0,69[a]	± 0,03
GNLT90	0,72[a]	± 0,03
GEA90	0,96[b]	± 0,02
GER90	0,97[b]	± 0,01
GCF90	1,14[c]	± 0,05
GD90	0,20[d]	± 0,01

Letras diferentes entre si indicam diferenças estatisticamente significativas (p≤ 0,05).
GCF90>(GEA90=GER90)>(GCI=GNLT90)>GD90.

Os resultados da comparação, quanto à resposta de força contrátil (N) do músculo tibial cranial após estímulo no músculo e no nervo fibular comum, entre os grupos eletroestimulados 45 e 90 dias são observados na Figura 24 e Tabela 10. Observa-se que não existe diferença significativa entre Grupos, GEA45 = GER45 e GEA90 = GER90. Contudo, em relação ao tempo de eletroestimulação nos grupos eletroestimulados 90 dias, os valores são significativamente maiores que os dos grupos 45 dias. Todos os grupos eletroestimulados apresentaram valores maiores significativamente que os grupos que realizaram apenas neurorrafia.

Figura 24 - Gráfico dos valores da comparação da força de contração máxima do MTC (expressa em Newton) entre os dos grupos experimentais 45 e 90 dias. Letras diferentes entre si indicam diferenças estatisticamente significativas (p≤ 0,05).



(GEA90 = GER90) > (GER45 = GER 45)> (GNLT45<GNLT90).

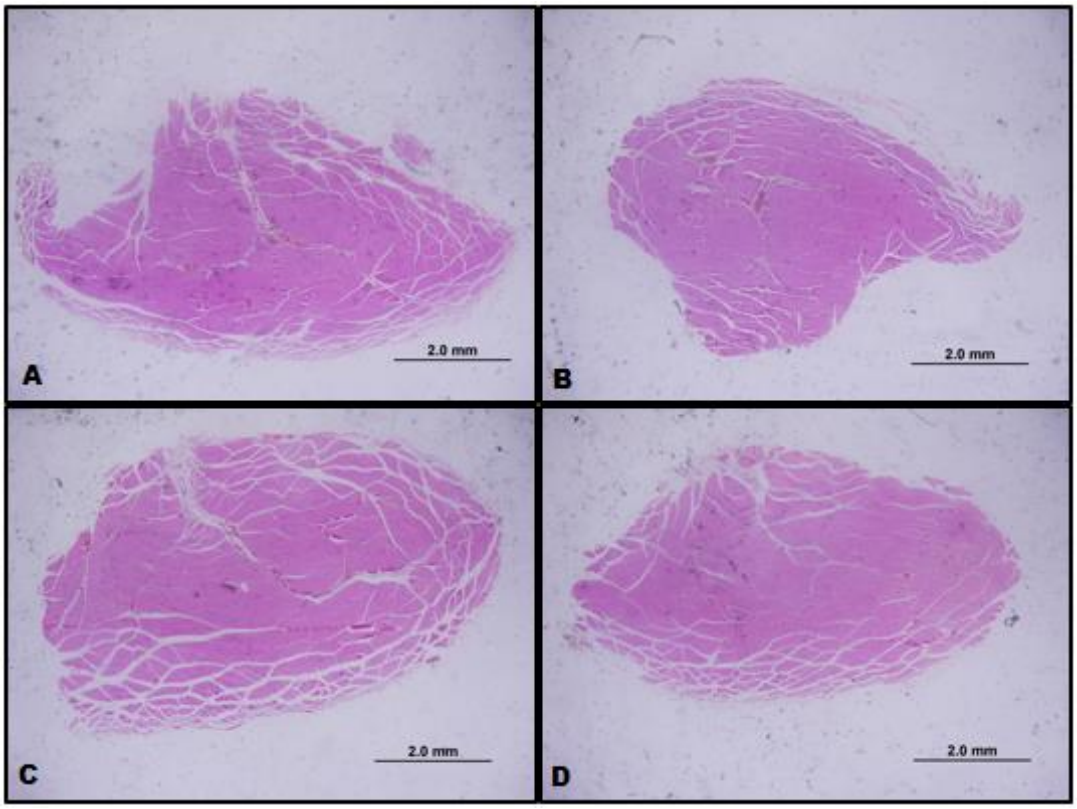
Tabela 10 - Valores da força de contração máxima do MTC (expressa em Newton) entre os grupos experimentais 45 e 90 dias, média e desvio padrão.

GRUPOS	MÉDIA	DP
GNLT45	0,65[a]	± 0,02
GNLT90	0,72[b]	± 0,03
GEA45	0,85[c]	± 0,07
GER45	0,86[c]	± 0,07
GEA90	0,96[d]	± 0,02
GER90	0,97[d]	± 0,01

Letras diferentes entre si indicam diferenças estatisticamente significativas (p≤ 0,05).
(GEA90 = GER90) > (GER45 = GER 45) > (GNLT45<GNLT90).

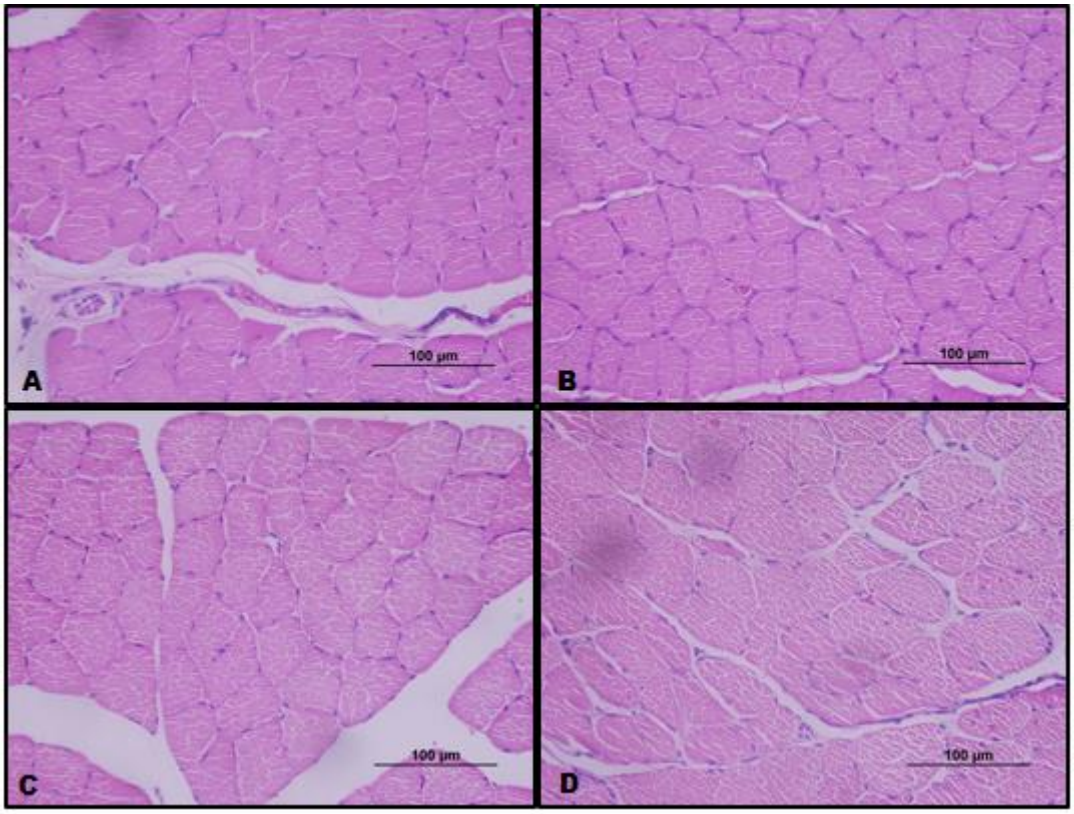
A Figura 25 apresenta fotomicrografias dos cortes transversais dos músculos Tibial cranial de ratos, empregadas nas análises morfométricas de área e diâmetro menor das fibras do músculo tibial cranial.

Figura 25 - Fotomicrografias dos cortes transversais do músculo Tibial cranial de ratos submetidos a coloração por HE . Sendo, A: GEA45; B: GER45; C: GEA90 e D: GER90.



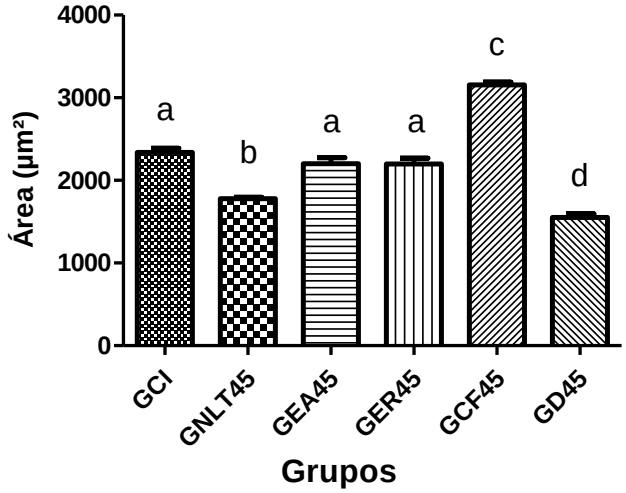
A Figura 26 apresenta fotomicrografias empregadas na análise morfométricas de área e diâmetro menor das fibras do musculo tibial cranial.

Figura 26 - Fotomicrografias dos músculos tibial cranial de ratos submetidos a coloração por HE. Sendo, A: GEA45; B: GER45; C: GEA90 e D: GER90.



Quanto à área das fibras musculares do músculo tibial cranial dos animais eletroestimulados por 45 dias, pode-se observar na Figura 27 e Tabela 11, que o grupo GCF45 apresenta melhor resultado que os demais grupos. Não existe diferença significativa entre os grupos GCI, GEA45 E GER45, que apresentaram valores maiores que os grupos GNLT45 e GD45.

Figura 27 - Gráfico da área das fibras musculares dos animais, expressa em µm², após 45 dias de aplicação das correntes, dos grupos GCI, GNLT45, GEA45, GER45, GCF45 e GD45. Letras diferentes entre si indicam diferenças estatisticamente significativas (p≤ 0,05).



GCF45 > (GCI=GEA45=GER45) > GNLT45 > GD 45.

Tabela 11 – Valores da área das fibras musculares dos animais, expressa em µm², dos grupos 45 dias, média e desvio padrão.

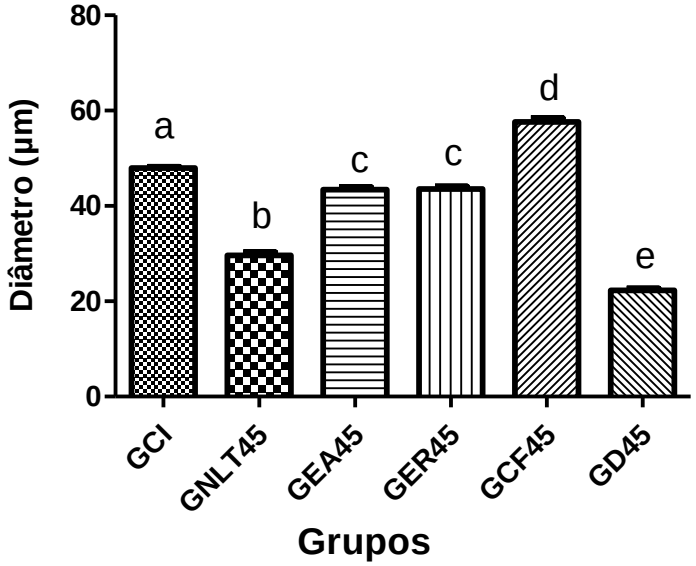
GRUPOS	MÉDIA	DP
GCI	2338,94[a]	± 203,57
GNLT45	1778,27[b]	± 56,87
GEA45	2202,64[a]	± 239,06
GER45	2198,91[a]	± 233,47
GCF45	3155,45[c]	± 112,19
GD45	1523,45[d]	± 149,90

Letras diferentes entre si indicam diferenças estatisticamente significativas (p≤ 0,05).
GCF45 > (GCI=GEA45=GER45) > GNLT45 > GD 45.

A Figura 28 e Tabela 12, a seguir, mostram os resultados referentes à morfometria, diâmetro menor, das fibras musculares do músculo tibial cranial, dos animais eletroestimulados 45 dias. Observa-se que o grupo GCF45 apresenta o melhor resultado, sendo maior que os demais grupos e não existindo diferença

significativa entre os grupos GEA45 e GER45 e que estes apresentaram valores maiores que os grupos GNLT45 e GD45.

Figura 28 - Gráfico do diâmetro menor das fibras musculares dos animais, expressa em µm, após 45 dias de aplicação das correntes, dos grupos GCI, GNLT45, GEA45, GER45, GCF45 e GD45. Letras diferentes entre si indicam diferenças estatisticamente significativas (p≤ 0,05).



GCF45 > GCI > (GEA45=GER45) > GNLT45 > GD 45.

Tabela 12 - Valores obtidos para o diâmetro menor das fibras musculares dos animais, músculo tibial cranial, expressa em µm, dos grupos 45 dias, média e desvio padrão.

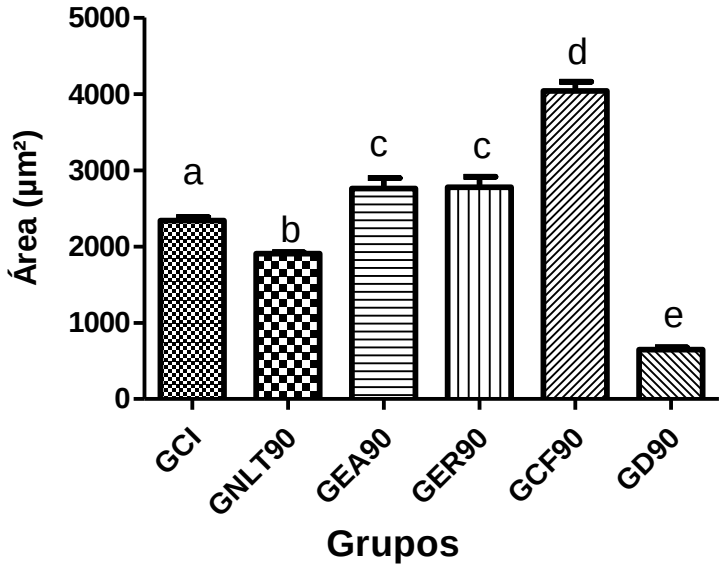
GRUPOS	MÉDIA	DP
GCI	47,94[a]	± 0,98
GNLT45	30,43[b]	± 1,72
GEA45	44,14[c]	± 1,46
GER45	43,71[c]	± 1,38
GCF45	58,43[d]	± 1,72
GD45	21,57[e]	± 1,13

Letras diferentes entre si indicam diferenças estatisticamente significativas (p≤ 0,05). GCF45 > GCF45 > GCI > (GEA45=GER45) > GNLT45 > GD 45.

Os valores referentes à área das fibras musculares do músculo tibial cranial, dos animais eletroestimulados 90 dias, são apresentados na Figura 29 e Tabela 13. O grupo GCF90 apresenta melhor resultado que os demais grupos . Não

existe diferença significativa entre os grupos GEA90 e GER90, que apresentaram valores maiores que os grupos GNLT90 e GD90.

Figura 29 - Gráfico da área das fibras musculares dos animais, expressa em µm², após 90 dias de aplicação das correntes, dos grupos GCI, GNLT90, GEA90, GER90, GCF90 e GD90. Letras diferentes entre si indicam diferenças estatisticamente significativas (p≤ 0,05).



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

Tabela 13 – Valores da área das fibras musculares dos animais, músculo tibial cranial, expressa em µm², dos grupos 90 dias, média e desvio padrão.

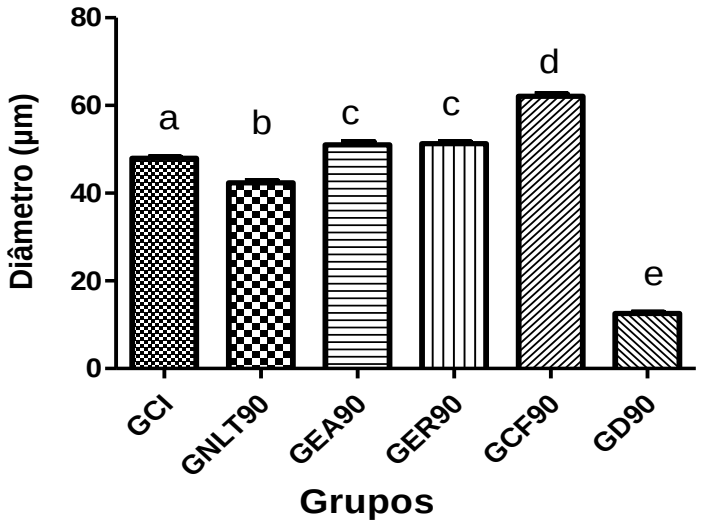
GRUPOS	MÉDIA	DP
GCI	2338,94[a]	± 203,57
GNLT90	1904,67[b]	± 95,98
GEA90	2759,94[c]	± 589,75
GER90	2777,28[c]	± 590,36
GCF90	3974,11[d]	± 440,36
GD90	646,44[e]	± 126,86

Letras diferentes entre si indicam diferenças estatisticamente significativas (p≤ 0,05).
GCF90>(GEA90=GER90) >GCI>GNLT90>GD90.

A Figura 30 e Tabela 14 mostram os resultados referentes à morfometria, diâmetro menor, das fibras musculares do músculo tibial cranial dos animais

eletroestimulados 90 dias. Observa-se que o grupo GCF90 apresenta o melhor resultado, sendo maior que os demais grupos e não existindo diferença significativa entre os grupos GEA90 E GER90, que apresentaram valores maiores que os grupos CGI, GNLT90 e GD90.

Figura 30 - Gráfico do diâmetro menor das fibras musculares dos animais, expressa em µm, após 90 dias de aplicação das correntes, dos grupos GCI, GNLT90, GEA90, GER90, GCF90 e GD90. Letras diferentes entre si indicam diferenças estatisticamente significativas (p≤ 0,05).



GCF90>(GEA90=GER90)>(GCI90>GNLT90)>GD90.

Tabela 14 - Valores do diâmetro menor das fibras musculares dos animais, expressa em µm, dos grupos 90 dias, média e desvio padrão.

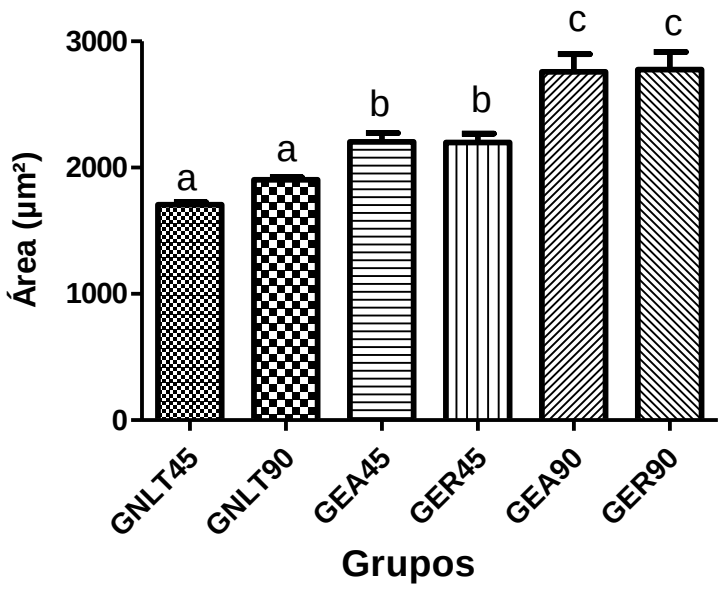
GRUPOS	MÉDIA	DP
GCI	47,94[a]	± 1,12
GNLT90	42,38[b]	± 1,86
GEA90	51,06[c]	± 2,84
GER90	51,31[c]	± 1,66
GCF90	62,13[d]	± 2,13
GD90	12,56[e]	± 0,96

Letras diferentes entre si indicam diferenças estatisticamente significativas (p≤ 0,05).
GCF90>(GEA90=GER90)>(GCI90>GNLT90)>GD90.

Os resultados da comparação referente à morfometria, área, entre os grupos eletroestimulados 45 e 90 dias são observados na Figura 31 e Tabela 15.

Observa-se que não existe diferença significativa entre os Grupos GEA45 = GER45 e GEA90 = GER90, mas em relação ao tempo de eletroestimulação, os grupos eletroestimulados por 90 dias apresentam valores maiores significativamente que os grupos 45 dias. E os dois grupos apresentam valores maiores que os grupos GNLT 45 e 90.

Figura 31 - Gráfico dos valores da **c**omparação da área das fibras musculares dos animais, expressa em µm², entre os grupos experimentais 45 e 90 dias de aplicação das correntes. Letras diferentes entre si indicam diferenças estatisticamente significativas (p≤ 0,05).



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

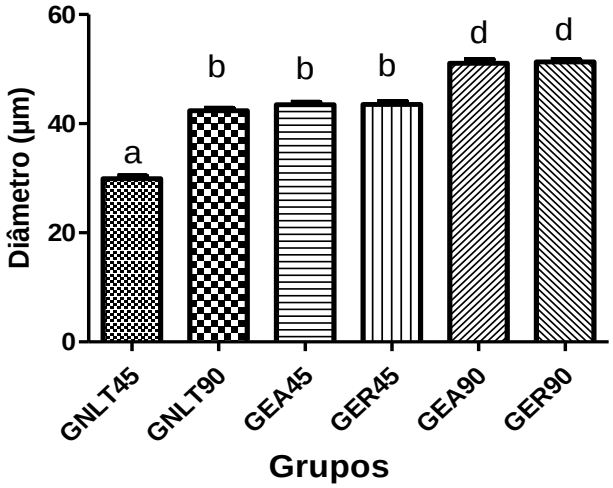
Tabela 15 - Valores da comparação da área das fibras musculares dos animais expressa em µm², entre os grupos 45 e 90 dias, média e desvio padrão.

GRUPOS	MÉDIA	DP
GNLT45	1778,27[a]	± 56,87
GNLT90	1904,67[a]	± 95,98
GEA45	2202,64[b]	± 239,06
GER45	2198,91[b]	± 233,47
GEA90	2759,94[c]	±589,75
GER90	2777,28[c]	± 590,36

Letras diferentes entre si indicam diferenças estatisticamente significativas (p≤ 0,05).
(GEA90=GER90) > (GEA45=GER45) > GNLT45<GNLT90).

Nas Figura 32 e Tabela 16, observa-se a análise comparativa da morfometria, diâmetro menor, entre os grupos eletroestimulados por 45 e 90 dias. Nota-se que não existe diferença significativa entre os Grupos, GEA45 = GER45 e GEA90 = GER90, mas em relação ao tempo de eletroestimulação, os grupos eletroestimulados por 90 dias apresentam valores significativamente maiores que os grupos de 45 dias. E os dois grupos eletroestimulados 45 e 90 e GENT90 apresentam valores melhores que os grupos GNLT 45 .

Figura 32 - Gráfico dos valores da comparação do diâmetro menor das fibras musculares dos animais, expressa em µm, entre os grupos 45 e 90 dias de aplicação das correntes. Letras diferentes entre si indicam diferenças estatisticamente significativas (p≤ 0,05).



(GEA90=GER90) > (GEA45=GER45=GENTL90) > GENTL45.

Tabela 16 - Valores da comparação do diâmetro menor das fibras musculares dos animais expressa em µm, entre os grupos 45 e 90 dias, média e desvio padrão.

GRUPOS	MÉDIA	DP
GNLT45	30,43[a]	± 1,72
GNLT90	42,38[b]	± 1,86
GEA45	44,14[b]	± 1,46
GER45	43,71[b]	± 1,38
GEA90	51,06[d]	± 2,84
GER90	51,31[d]	± 1,66

Letras diferentes entre si indicam diferenças estatisticamente significativas (p≤ 0,05).
(GEA90=GER90) > (GEA45=GER45=GENTL90) > GENTL45

Para determinação da percentagem de tecido conjuntivo no músculo tibial cranial dos ratos foram utilizadas fotomicrografias de cortes transversais (Fig. 33) e de fibras do músculo (Fig. 34) , submetidos à coloração por tricômico de masson .

Figura 33 - Fotomicrografias de cortes transversaais dos músculos tibial cranial de ratos submetidos à coloração de tricômico de Masson. Sendo A: GEA45; B: GER45; C: GEA90 e D: GER90.

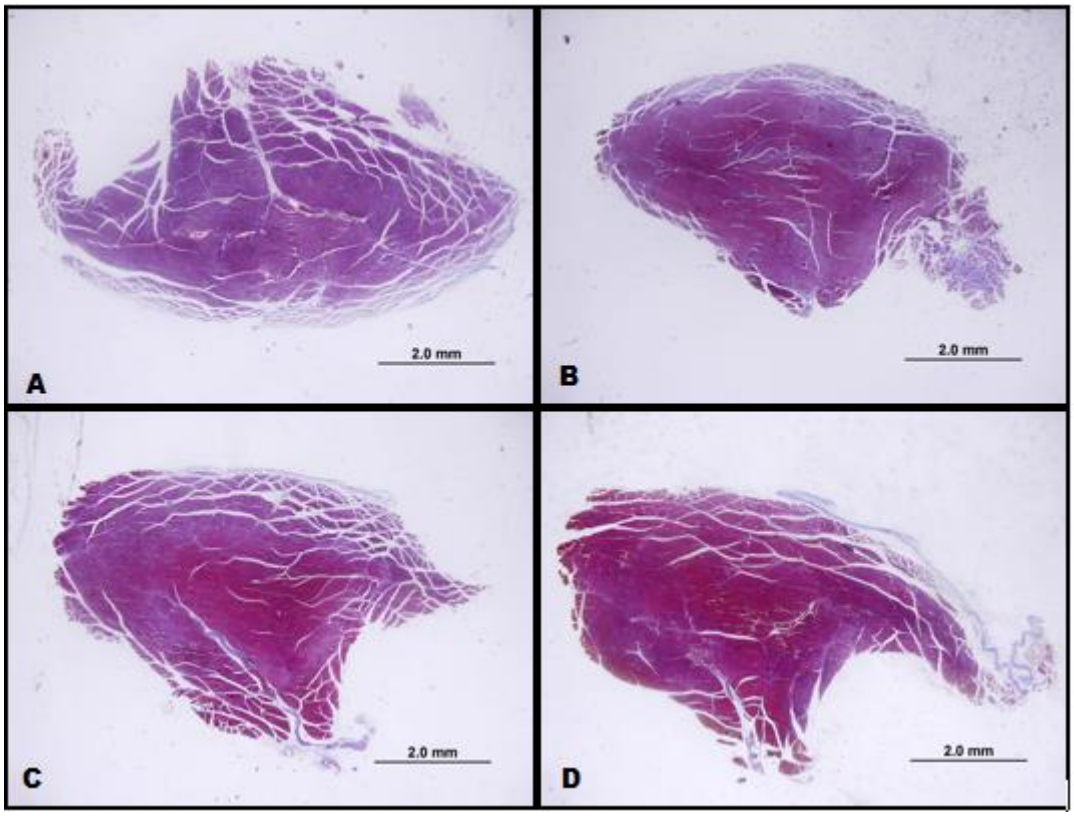
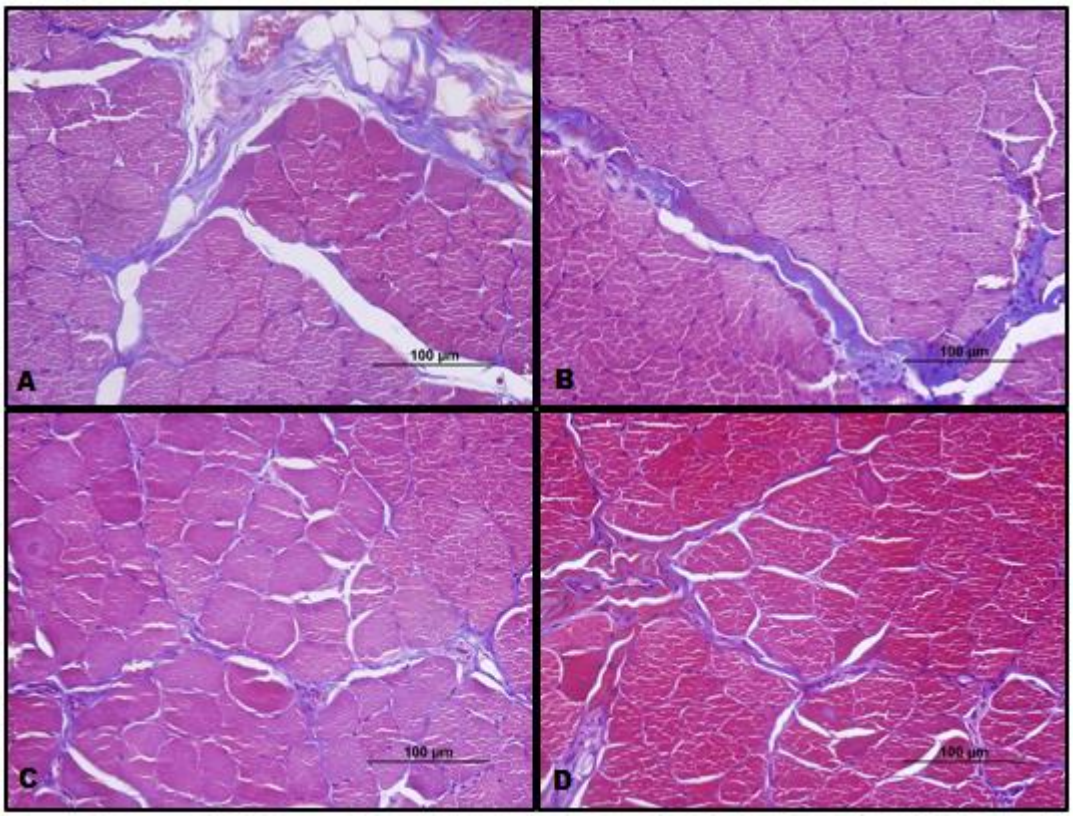
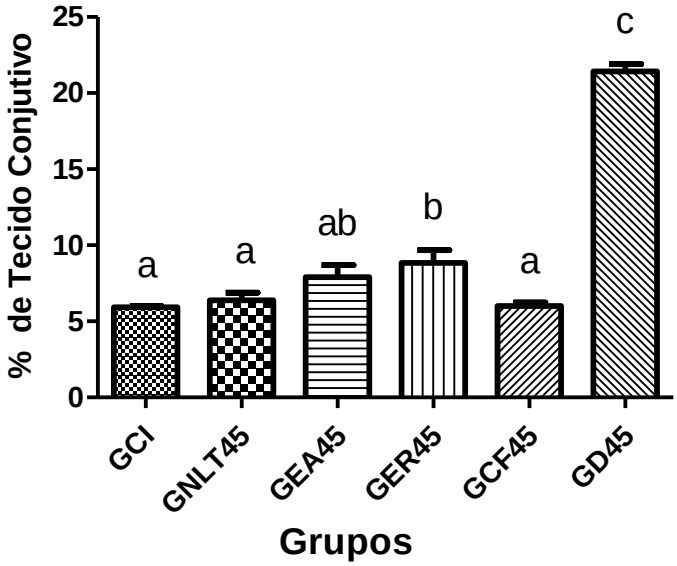


Figura 34 - Fotomicrografia dos músculos tibial cranial de ratos com as áreas de tecidos conjuntivos evidenciadas pelo de tricômico de Masson . Sendo A: GEA45; B: GER45; C: GEA90 e D: GER90.



A Figura 35 e a Tabela 17, a seguir, mostram os resultados referentes à percentagem de tecido conjuntivo, em corte transversal do músculo tibial cranial, dos animais eletroestimulados 45 dias. Observa-se que o grupo GD45 apresenta percentagem de tecido conjuntivo em suas fibras musculares maior que todos os demais grupos, não existindo diferença significativa entre os grupos CGI, GNLT45, GEA45 e CGF45, os grupos GEA45 e GER45.

Figura 35 - Gráfico da percentagem de tecido conjuntivo das fibras musculares dos animais, expressa em %, após 45 dias de aplicação das correntes, dos grupos GCI, GNLT45, GEA45, GER45, GCF45 e GD45. Letras diferentes entre si indicam diferenças estatisticamente significativas (p≤ 0,05).



GD45 > GCI=GNLT45=GGCF45 , GEAT45 = GER 45.

Tabela 17 - Valores obtidos para a percentagem de tecido conjuntivo das fibras musculares dos animais, músculo tibial cranial, expressa em %, dos grupos 45 dias, média e desvio padrão.

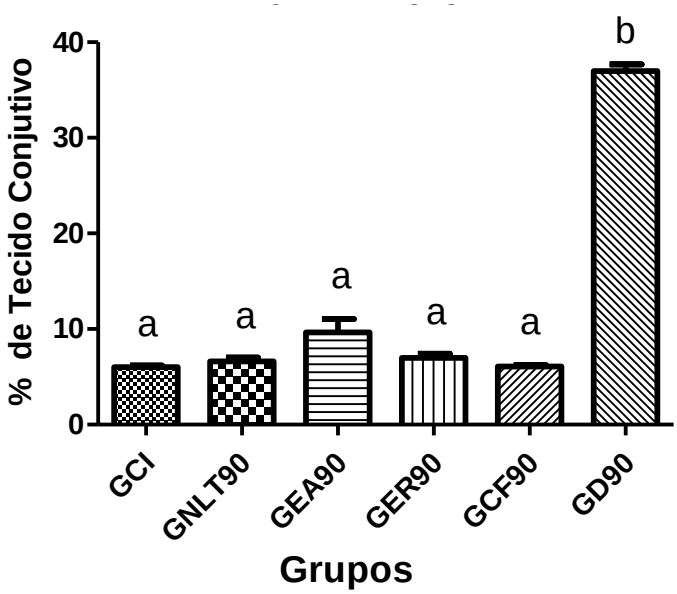
GRUPOS	MÉDIA	DP
GCI	5,93 [a]	± 0,22
GNLT45	6,38 [a]	± 1,78
GEA45	7,92[ab]	± 2,23
GER45	8,84[b]	± 2,22
GCF45	6,02 [a]	± 0,61
GD45	21,42[c]	± 1,94

Letras diferentes entre si indicam diferenças estatisticamente significativas (p≤ 0,05).

GD5 > GCI=GNLT45=GGCF45, GEAT45 = GER 45.

Os valores referentes à percentagem de tecido conjuntivo, em corte transversal do músculo tibial cranial, dos animais eletroestimulados 90 dias, são apresentados na Figura 36 e Tabela 18. O grupo GD 90 apresenta valores da percentagem de tecido conjuntivo maior, significativamente, do que todos os demais grupos, os quais não apresentam diferença significativa entre si.

Figura 36 - Gráfico da percentagem de tecido conjuntivo das fibras musculares dos animais, expressa em %, após 90 dias de aplicação das correntes, dos grupos GCI, GNLT90, GEA90, GER90, GCF90 e GD90. Letras diferentes entre si indicam diferenças estatisticamente significativas (p≤ 0,05).



GD90>(GC90=GNLT90=GEA90=GER90=GCF90).

Tabela 18 - Valores da percentagem de tecido conjuntivo diâmetro menor das fibras musculares dos animais, expressa em %, dos grupos 90 dias, média e desvio padrão.

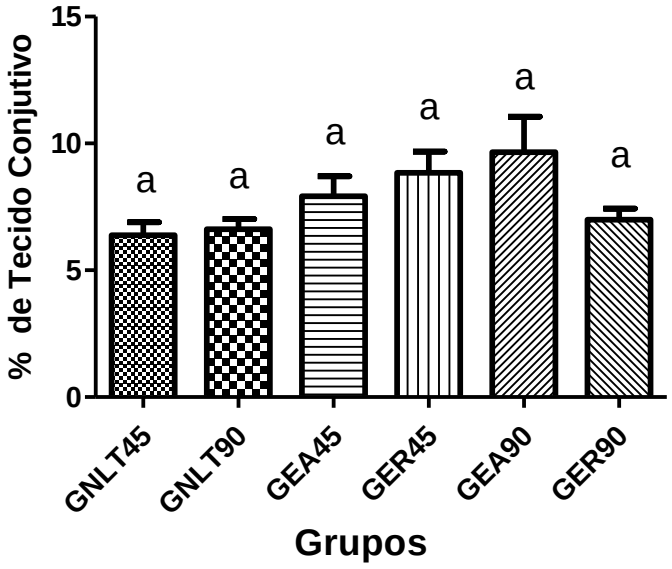
GRUPOS	MÉDIA	DP
GCI	6,02 [a]	± 0,43
GNLT90	6,62 [a]	± 1,30
GEA90	9,66 [a]	± 2,43
GER90	7,00 [a]	± 0,86
GCF90	6,07 [a]	± 0,54
GD90	36,98 [b]	± 2,87

Letras diferentes entre si indicam diferenças estatisticamente significativas (p≤ 0,05).

GD90>(GC90=GNLT90=GEA90=GER90=GCF90).

Nas Figura 37 e Tabela 19, observa-se a análise comparativa da percentagem de tecido conjuntivo entre os grupos eletroestimulados por 45 e 90 dias. Não existe diferença significativa dos resultados da percentagem de tecido conjuntivo entre todos os grupos.

Figura 35 - Gráfico dos valores da comparação da percentagem de tecido conjuntivo, expressa em %, entre os grupos experimentais 45 e 90 dias de aplicação das correntes. Letras diferentes entre si indicam diferenças estatisticamente significativas (p≤ 0,05).



GNLT45=GNLT90=GEA45=GER45=GEA90=GER90.

Tabela 19 - Valores da percentagem de tecido conjuntivo das fibras musculares dos animais, expressa em %, entre os grupos 45 e 90 dias, média e desvio padrão.

GRUPOS	MÉDIA	DP
GNLT45	6,38[a]	± 1,78
GNLT90	6,62[a]	± 1,30
GEA45	7,92[a]	± 2,23
GER45	8,84[a]	± 2,22
GEA90	9,66[a]	± 0,54
GER90	7,00[a]	± 2,87

Letras diferentes entre si indicam diferenças estatisticamente significativas (p≤ 0,05).

GNLT45=GNLT90=GEA45=GER45=GEA90=GER90.

A Tabela 20 mostra uma visão geral das médias dos resultados obtidos em relação às análises morfométricas e funcionais avaliados, nos grupos eletroestimulados por 45 e 90 dias.

Tabela 20 - Visão geral das médias dos resultados obtidos. ICP = intensidade máxima de contato da pegada; MCI = massa corporal inicial (g); MCF = massa corporal final (g); FMC = Teste de força de contração máxima muscular (N); AFM= área da fibra muscular (μm^2); DMF= diâmetro menor da fibra muscular (μm) e DTC = densidade de tecido conjuntivo (%).

GRUPO 45	**ICP**	**MCI**	**MCF**	**FMC**	**AFM**	**DMF**	**DTC**
GCI	24,88^{a}	225,00^{a}	------	0,69^{a}	2338,94^{a}	47,94^{a}	5,93 ^{a}
GNLT45	16,75^{b}	228,90^{a}	373,60^{a}	0,65^{a}	1778,27^{b}	30,43^{b}	6,38 ^{a}
GEA45	20,38^{c}	226,40^{a}	369,30^{a}	0,85^{b}	2202,64^{a}	44,14^{c}	7,92^{ab}
GER45	20,25^{c}	226,10^{a}	365,40^{a}	0,86^{b}	2198,91^{a}	43,71^{c}	8,84^{b}
GCF45	25,00^{a}	228,00^{a}	369,00^{a}	1,00^{c}	3155,45^{c}	58,43^{d}	6,02 ^{a}
GD45	7,88^{d}	228,00^{a}	369,30^{a}	0,23^{d}	1523,45^{d}	21,57^{e}	21,42^{c}
GRUPO 90	**ICP**	**MCI**	**MCF**	**FMC**	**AFM**	**DMF**	**DTC**
GCI	24,88^{a}	225,00^{a}	------	0,69^{a}	2338,94^{a}	47,94^{a}	6,02 ^{a}
GNLT90	13,50^{b}	226,30^{a}	411,20^{a}	0,72^{a}	1904,67^{b}	42,38^{b}	6,62 ^{a}
GEA90	21,88^{c}	221,10^{a}	420,60^{a}	0,96^{b}	2759,94^{c}	51,06^{c}	9,66 ^{a}
GER90	22,00^{c}	226,90^{a}	415,10^{a}	0,97^{b}	2777,28^{c}	51,31^{c}	7,00 ^{a}
GCF90	25,50^{a}	224,60^{a}	419,00^{a}	1,14^{c}	3974,11^{d}	62,13^{d}	6,07 ^{a}
GD90	5,38^{d}	225,50^{a}	414,00^{a}	0,20^{d}	646,44^{e}	12,56^{e}	36,98 ^{b}

Letras diferentes entre si indicam diferenças estatisticamente significativas (p≤ 0,05).

5 DISCUSSÃO

5. 1 Modelo animal

Nesse estudo, foi utilizado o animal (*Rattus norvegicus*) da linhagem *Wistar* por ser de fácil obtenção, manipulação e manutenção, sendo o modelo mais utilizado para estudos de regeneração nervosa e reparo nervoso periférico por apresentarem semelhança de estruturas e de degeneração nervosa com o ser humano (AKGUL et al., 2014; GHAYEMI et al., 2014; KAVLAK et al., 2014; MOHAMMADI & SAADATI, 2014).

Foram escolhidos animais do gênero masculino por apresentarem menor variação hormonal do que as fêmeas. Outros estudos já comprovaram que tal variação pode influenciar na regeneração nervosa através de efeitos neurotróficos (CARANDENTE et al., 1989).

Além do sexo masculino, é indicado também o uso de animais jovens, pois animais com idade mais avançada apresentam retardo do reparo nervoso periférico (KANG & LICHTMAN, 2013).

5.2 Autofagia

Segundo Dias (2011) e Rosa-Junior (2010), os animais de suas pesquisas que apresentaram autofagia foram submetidos à secção do nervo isquiático, o qual é responsável pela inervação total da pata e possui outras estruturas que são diretamente ligadas a ele, como o nervo sural responsável pela inervação sensitiva dorso-lateral e consequente autofagia. Já neste estudo, nenhum animal foi detectado com autofagia devido ao fato que o nervo lesionado era o nervo tibial cranial.

5.3 Cirurgia

O modelo experimental utilizado neste trabalho foi o proposto por Viterbo (1992) para estudos de neurorrafia término-lateral. Os nervos fibular comum e tibial são de fácil acesso, apresentam-se anatomicamente próximos e inervam músculos distintos. O músculo tibial cranial, inervado apenas pelo nervo fibular comum , também é de fácil acesso, superficial, palpável e não sofre a atuação de inervações secundárias (VITERBO, 1992).

A cirurgia de NLT foi realizada sem retirada de janela epineural, assim as fibras regeneradas após a NLT conseguiriam absorver e transpor as três camadas de tecido conjuntivo da fibra nervosa (endoneuro, perineuro e epineuro), em nervos com diâmetro inferior a 1,5 mm (VITERBO et al., 1992; VITERBO et al., 1998; MACIEL et al., 2013).

É necessário que, nesses casos de cirurgia em animais sejam, utilizados anestésicos que atuem tanto como sedativo e também como relaxante muscular, que é responsável pela vasoconstrição, fazendo com que a cirurgia não cause intensos sangramentos no animal. Um sangramento intenso pode causar risco de morte em animais de pequeno porte. Portanto, esse estudo utilizou o cloridrato de xilazina e de ketamina que cumpre essas condições.

5.4 Protocolo de eletroestimulação

As lesões nervosas periféricas levam à desnervação do músculo, os quais sofrem atrofia rapidamente. Vários recursos fisioterapêuticos podem ser empregados: cinesioterapia passiva e ativa, reeducação neuromuscular e eletroterapia, os quais podem auxiliar na recuperação funcional após a reinervação (GORDON & ENGLISH, 2016). A atrofia atua como uma barreira ao crescimento axonal durante a reinervação muscular, já que impedir essa atrofia e propiciar a recuperação são alguns dos objetivos da eletroestimulação. Quanto ao resultado, este depende do protocolo de intervenção (CAVALCANTE, et al., 2012).

A revisão sistemática sobre o efeito da eletroestimulação no músculo desnervado de ratos elaborada por Cavalcante et al. (2012), encontrou nove artigos sobre o tema no período entre 1990 a 2010 (Tabela 20).

Tabela 20- Levantamento sistemático sobre o efeito da eletroestimulação no músculo desnervado de ratos.

Autor	Intervenção	Protocolo de Eletroestimulação
Gigo-Benato et al. (2010)	Músculo: TA Eletrodo: Transcutâneo Duração: Frequência: 1 sessão/48h Período: 14 dias	Corrente exponencial Frequência: 20 Hz Amplitude: 0,25 - 0,8 mA Duração do pulso: 4-10 ms Nº de contrações/dia: 2
Tomori et al. (2010)	Músculo: TA Eletrodo: Transcutâneo Duração: 30 minutos/sessão Frequência: 6 sessões/semana Período: 3 semanas	Corrente retangular simétrica Frequência: 10 Hz Amplitude: 4 mA (GDE-I4), 8 mA (GDE-I8), 16 mA (GDE-I16) Duração do pulso: 250 µs Nº de contrações/dia
Russo et al. (2010)	Músculo: TA Eletrodo: Transcutâneo Duração: 52,8 min/sessão Frequência: 1 sessão/dia Período: 6 dias	Corrente exponencial Frequência: 50 Hz Amplitude: 0,3 - 0,7 mA Duração do pulso: 2-7 ms Nº de contrações/dia: 200
Lima et al. (2009)	Músculo: GM Eletrodo: Transcutâneo Duração: 30 minutos/sessão Frequência: 5 sessões/semana (GDE-D) e 3 sessões/semana (GD-DA) Período: 10 dias	Corrente bifásica quadrada e simétrica Frequência: 10 Hz Amplitude: 5 mA com adição de 1 mA a cada 5 min Duração do pulso: 3 ms Nº de contrações/dia
Russo et al. (2007)	Músculo: TA Eletrodo: Transcutâneo Duração: Freqüência: 1 sessão/48h Período: 28 dias	Músculo: TA Eletrodo: Transcutâneo Duração: Freqüência: 1 sessão/48h Período: 28 dias
Dow et al. (2006)	Músculo: ELD Eletrodo: Interno (implantado) Duração: 24h/dia** Frequência: 7 dias/semana Período: 4 ou 7 meses	Corrente bipolar Frequência: 100 Hz Amplitude: 6 - 12 mA Duração do pulso: 0,4 ms Nº de contrações/dia: 200
Dow et al. (2005)	Músculo: ELD Eletrodo: Interno (implantado) Duração: 24h/dia*** Frequência: 7 dias/semana Duração: 5 semana	Corrente bipolar Frequência: 100 Hz Amplitude: 6 - 12 mA Duração do pulso: 0,4ms Nº de contrações/dia: 100 a 800
Dow et al. (2009)	Músculo: ELD Eletrodo: Interno (implantado) Duração: 24h/dia**** Frequência: 7dias/semana Duração: 5 semana	Corrente bipolar Frequência: 100 Hz Amplitude: 6 - 12 mA Duração do pulso: 0,4 ms Nº de contrações/dia: 25, 50, 100, 200, 300, 500, 800, 1.200, 2.000 e 5.000
Kanaya et al. (1992)	Músculo: TA Eletrodo: Transcutâneo Duração: 30 min/dia Frequência: 5 dias/semana Duração: 12 semanas	Corrente retangular Frequência: 2 Hz Amplitude: Duração do pulso: 100 ms Nº de contrações/dia:

Fonte: Adaptado de Cavalcante et al., 2012.

Entre os tipos mais utilizados de correntes estão a exponencial (33,3%) e a bipolar (33,3%). A frequência das sessões variou desde diariamente até a cada 48 horas. E o período de intervenção foi de seis dias até sete meses.

Romão et al. (2007), utilizaram estimulação elétrica com corrente elétrica contínua, na frequência de 50 hertz, com duração de 0,5ms e intensidade de 3 volts, diariamente, durante 60 dias, por sete minutos, sobre o músculo tibial cranial direito de ratos após lesão do nervo fibular comum comum.

Utilizando corrente de alta voltagem, Teodori et al. (2011) após lesão do nervo ciático, eltroestimularam ratos sob anestesia, realizando estimulação catódica sobre a cicatriz, durante 30 minutos (100 Hz, tensão mínima de 100 V, 20 μs e intervalo interpulso de 100 μs), 5 dias por semana, durante 21 dias.

Neste trabalho, o diferencial foi o emprego de correntes de média frequência entre dois tipos Aussie e Russa, a frequência foi três vezes por semana, por dois períodos diferentes, 45 e 90 dias.

5.5 Avaliação funcional da marcha – intensidade máxima de contato da pegada

A avaliação da marcha foi desenvolvida por De Medinacelli et al. (1982), que utilizavam um método quantitativo para avaliação do Índice Funcional do Isquiático. Em seguida, Bain et al. (1989) aperfeiçoaram o método de De Medinacelli e desenvolveram específicas avaliações para o nervo fibular comum e nervo tibial. Fizeram também com que a distância entre as pegadas não fosse levada em consideração devido à velocidade da pegada.

Para a captura das pegadas do animal, utilizou-se um método semelhante ao de Varejão et al. (2001), que possui uma câmera acoplada sob uma plataforma de vidro transparente para que os animais caminhem sobre ela e uma canaleta que os guia pelo percurso. Possui também um controle de velocidade que estabelece o tempo no qual os animais devem cumprir o percurso para a aquisição de dados e é automatizada. Se o animal anda mais rápido que o estabelecido para a sua caminhada, os dados não são considerados . Esse método substituiu o de De Medinacelli et al. (1982) ,que utilizavam filmes radiográficos ou a pintura da pata dos

animais, pois o mesmo apresentava variações que causavam interferências no resultado.

Segundo Monte-Raso et al. (2006) a grande maioria dos estudos em lesões nervosas periféricas empregam os métodos histomorfométricos e eletrofisiológicos na análise dos tecidos nervosos e musculares para comparação dos grupos, mas é importante avaliar a recuperação da função motora. Esta avaliação pode ser realizada pelo “CatWalk®”, que permite avaliar parâmetros dinâmicos além dos parâmetros estáticos em modelos de neurotmesepor meio de dados apresentados de forma menos trabalhosa (DEUMENS et al., 2007).

Os resultados funcionais são imprescindíveis em um estudo da regeneração nervosa periférica, já que a volta da função normal é o objetivo máximo desta linha pesquisa.

Maciel et al. (2013) em um estudo semelhante, no qual os animais foram divididos em grupo controle, grupo desnervado, grupo neurorrafia látero-terminal e neurorrafia látero-terminal mais estimulação elétrica, também observaram uma grande melhora funcional no grupo que utilizou a eletroestimulação, nos dois períodos de avaliação da marcha, 30 e 180 dias. Com 30 dias após o início do experimento o grupo controle apresentou melhor resultado na avaliação da marcha, sendo que os demais apresentaram resultado avaliativo semelhante entre si. E com 180 dias de pós-operatório, o grupo que sofreu neurorrafia e estimulação elétrica foi o único a se igualar ao grupo Controle com uma melhora de 60,5%, enquanto o grupo que sofreu somente neurorrafia melhorou 9,5%.

Sobral et al. (2008) em seu estudo, realizaram uma análise histomorfométrica e funcional para avaliar a influência do exercício físico em esteira, aplicado nas fases imediata e tardia da regeneração do nervo isquiático de ratos, após axoniotmese. Os animais foram divididos nos grupos: controle (CON); desnervado (D); desnervado+exercício+gaiola (DEG), o qual iniciou o exercício após 24 horas da cirurgia e desnervado+gaiola+exercício (DGE), que iniciou no 14º dia. Foi observado que todos os grupos, no período pré-operatório, mostraram avaliação da marcha normal entre -16,18 e -6,44. No 7º e 14º dias PO, os valores refletiram expressiva perda funcional, com valores entre -92,840 e -64,93; enquanto entre o 21º e 28º dias PO esses valores mostraram recuperação funcional na avaliação da marcha, entre -20,20 e -9,91, do índice funcional do ciático (IFC).

Maeda et al. (1999) em trabalho no qual avaliaram os efeitos da tensão no sítio da sutura após secção do nervo ciático na recuperação funcional após neurorrafia, avaliram a marcha de seus três grupos experimentais: neurorrafia término-terminal, sem tensão, neurorrafia realizada sob tensão e no terceiro grupo, com enxerto de nervo entre os cotos proximal e distal do nervo seccionado. O resultado da avaliação da marcha evidenciou melhor recuperação no grupo submetido à neurorrafia término-terminal sem tensão, quando comparado com o grupo do enxerto. O grupo submetido à tensão apresentou a menor recuperação funcional.

Paiva (2016) em seu estudo experimental com células tronco em ratos, avaliou a intensidade máxima da pegada completa. Seus grupos experimentais 3 a 7 não diferiram estatisticamente entre si. Os valores dos resultados apresentados pelos animais dos grupos: 3 (somente neurorrafia) foi de 80,65; 4 (preenchimento com fascia) foi de 82,31; 5 (Gel de Plaqueta), 87,96 e 7 (célula tronco) foi de: 94,79; resultados estes estatisticamente semelhantes ao grupo 2 (desnervado) e inferior ao do grupo 1 (controle) 103,37. O grupo 6 (gel+fascia) apresentou resultado estatisticamente superior (96,90) ao do grupo 2 (desnervado), 73,27; e, estatisticamente semelhante ao do grupo 1.

Neste trabalho, os animais eletroestimulados tanto com a corrente russa como com a aussie, apontaram que entre grupos de mesmo período de eletroestimulação não houve diferença significativa na avaliação da intensidade de pegada durante a avaliação da marcha (GEA45: 20,38; GER45: 20,25 de intensidade de contato); (GEA90: 21,88; GER90: 22,00 de intensidade de contato). Porém, entre os grupos com períodos diferentes de tempos de eletroestimulação, 45 e 90 dias, ocorreu uma influência positiva no período maior, o grupo 90, com média de 21,94 de intensidade de contato. Vale ressaltar também que os dois grupos eletroestimulados, 45 e 90, apresentaram resultados superiores aos grupos que sofreram apenas o processo cirúrgico (GNLT45 e GNLT90).

Portanto, neste trabalho, os resultados são semelhantes aos demais citados, em que os grupos que sofreram alguma intervenção após o processo cirúrgico apresentaram resultados superiores aos que não sofreram e aos grupos desnervados.

5.6 Teste de força de contração máxima do MTC

Foram seguidos os padrões de Isaacs et al. (2005), para realização do teste de força máxima. Algumas adaptações foram feitas para haver adequação ao estudo. Eles realizaram o estímulo elétrico nomúsculo e não no nervo, como nesta pesquisa, porque queriam comprovar a passagem do estímulo pela NTL, pois não realizaram testes eletrofisiológicos da condução nervosa.

Em outros estudos como o de Marcos (2002) e Hala (2003), foi empregado também o estímulo elétrico no nervo e não no músculo do animal, estimulando o nervo fibular comum intacto para provocar contração do MTC de ratos para verificar o processo de fadiga muscular.

Tham & Morrison (1998) em estudo sobre neurorrafia látero-terminal, usaram o nervo fibular comum como receptor e o nervo tibial como doador, tendo o músculo gastrocnêmio como músculo-alvo. Os autores realizaram teste de força nos grupos experimentais e observaram força de contração do músculo gastrocnêmio no grupo experimental menor que no grupo controle.

Em outras pesquisas como as de, Liu et al. (1999); Issacs et al. (2005), e Paiva (2016) o teste de força foi realizado apenas com estímulo no nervo, permitindo observar a passagem da corrente pela neurorrafia, possibilitando avaliar a força de contração independente da neurorrafia, determinando a reinervação e conservação de fibras musculares que permitiram a contração.

Paiva (2016) em seu estudo experimental com células tronco em ratos após neurorrafia, quando o estímulo foi realizado no músculo tibial cranial apresentou os seguintes resultados: os grupos 3 (somente neurorrafia) 0,96N, 5 (Gel de Plaqueta) 0,90N, 6 (gel+fascia) e 7 (célula tronco) 1,08N - não apresentaram diferença estatística do grupo 1(controle) 0,96N. Os grupos 2 (desnervado) 0,60 e 4 (preenchimento com fáscia), 1,24N, foram estatisticamente diferentes de todos os outros. O grupo 2 possui a menor média (desnervado) e o grupo 4 a maior média.

Nesta pesquisa, a escolha por estimular o músculo diretamente foi em função de alcançar a força de contração máxima do MTC dos animais, pois o grupo GD45 e GD90 foram desnervados e não seria possível obter resultados para

comparação, entre todos os grupos, durante o teste de força máxima de contração do MTC.

Os grupos eletroestimulados GEA45, GER45, GEA90 e GER90 apresentaram resultados superiores ao grupo que somente realizou a neurorrafia, resultado semelhante ao encontrado por Maciel et al. (2013) que sugerem que parte do efeito do treinamento realizado por EE pode estar na facilitação neural em função de um número maior de unidades motoras ativas e aumento na taxa de impulsos, ou um padrão mais eficiente de recrutamento, provavelmente devido a uma modificação do mecanismo de gradação de força, propiciando melhora da somação de estímulos nervosos. Em termos práticos, o músculo treinado com EE contrai com mais eficiência.

Observa-se, assim, a importância do teste de força como parâmetro de comparação entre modelos experimentais para estudos em reinervação periférica.

5.7 Análise histológica e morfométrica do MTC

Foi feita a opção por realizar a análise histológica com a determinação da área de secção transversa e não pesagem da massa do músculo, a qual reflete indiretamente o trofismo das fibras, visto que é influenciada por outros fatores, como a proliferação do tecido conjuntivo, mascarando assim a atrofia e, consequentemente, a análise histológica. A morfometria, por sua vez, é mais confiável para avaliação do trofismo muscular (CAVALCANTE et al., 2012).

Foi utilizada a coloração com HE, pois esta técnica evidencia bem a fibra muscular, o que é importante para a realização da morfometria.

Dentre os parâmetros morfométricos, foram analisados área e diâmetro menor das fibras musculares. De acordo com De Sá et al. (2004), e Romão et al. (2007) a medida de diâmetro menor é mais confiável que a medida da área ou de diâmetro máximo, pois esta não sofre alteração devido à inclinação da navalha durante o corte histológico, nem tampouco sofre alterações durante o preparo histoquímico.

Utilizando o mesmo parâmetro de avaliação, Romão et al. (2007) em estudo sobre a interferência da eletroestimulação em nervo periférico relacionados,

ao músculo tibial cranial, concluíram que a análise desses parâmetros (Área e Diâmetro) não mostra diferença para os grupos experimentais entre si, grupo com lesão no nervo (A-182,44,D-55,52), lesão mais eletroestimulação diária (A-177,56,D-51,83), lesão mais eletroestimulação três vezes por semana (A-203,86, D-58,10), mas apresentaram diferença em relação ao grupo desnervado (A-99,60, D-29,51).

Maciel et al. (2013) concluiram que o grupo que recebeu eletroestimulação (2901,2 μm² área, 49,35 μm diâmetro) apresentou resultado estatisticamente superior ao grupo cirúrgico que não a recebeu (2129,28 μm², 40,88 μm) e ao desnervado (672,99 μm², 22,67 μm) como neste trabalho, mostrando que a eletroestimulação foi eficiente e houve diferença significativa entre os grupos experimentais.

Em sua pesquisa, Paiva (2016) encontraram quanto aos valores do diâmetro menor das fibras musculares do músculo tibial cranial do lado direito em μm, que os grupos experimentais somente com neurorrafia (41,32), preenchimento com fascia (42,01), Gel de Plaqueta (41,57), gel+fascia (41,40) e célula tronco (42,15) não mostraram diferença estatística entre si. Todos os grupos mostraram resultados estatisticamente superiores ao resultado observado no grupo desnervado (23,44) e inferiores ao resultado mostrado pelo grupo controle da normalidade (46,91).

Quanto aos resultados média da área (μm2) das fibras musculares do músculo tibial cranial , Paiva (2016) observou que o resultado foi estatisticamente maior no controle de normalidade (3275,48), quando comparado aos grupos experimentais de neurorrafia (2547,94), preenchimento com fascia (2702,79), Gel de Plaqueta (2634,43), gel+fascia (2559,75) e célula tronco (2675,17). Os grupos experimentais mostraram valores de área que diferiram entre si e que foram estatisticamente superiores ao observado no grupo desnervado (870,48).

Nesta pesquisa quando observados os valores da área e diâmetro menor da fibra muscular, notou-se que o grupo GCF90, grupo controle final que não sofreu nenhuma intervenção, apresentou um resultado superior aos demais grupos.

É observado neste trabalho que tanto os resultados das médias dos valores da área das fibras do MTC dos grupos eletroestimulados, GEA45 (2202,64μm^2), GER45 (2198,91μm^2), GEA90 (2759,94μm^2) e GER90 (2777,28 μm^2), sempre foram maiores que dos grupos controle cirúrgico GNLT45 (1778,27μm^2) e GNLT 90 (1904,67μm^2), repetindo a mesma relação de resultado em relação ao de diâmetro

menor, GEA45 (44,14µm), GER45 (43,71µm), GEA90 (51,06µm) e GER90 (51,31µm), mantendo-se maiores que dos grupos controle cirúrgico GNLT45 (30,43µm) e GNLT 90 (42,38µm). Isso demonstra que o efeito da EE foi positivo para o MTC após a neurorafia término-lateral, pois existe uma relação direta entre a secção transversal da fibra muscular com a força que um músculo pode produzir (NETO et al., 2007).

Os dois grupos eletroestimulados GEA45, GER45 e GEA90 e GER90, apresentaram diferença significativa em relação aos grupos controles cirúrgicos GNLT45 e GNLT90 nas análises do parâmetros morfométricos do MTC, área e diâmetro menor da fibra muscular, existindo uma relação direta na melhora das características morfológicas com o aumento do período de eletroestimulação.

5.8 Densidade de tecido conjuntivo

O aumento da percentagem de tecido conjuntivo, principalmente no perimísio e no endomísio das fibras musculares é a alteração mais característicaem um músculo desnervado. Autores afirmam que essas alterações interferem na microcirculação sanguínea das fibras musculares, na recuperação funcional e na interação neuromuscular após a reinervação do músculo (MINATOMO, 2007). O valor de normalidade da percentagem de tecido conjuntivo em músculos sadios gira em torno de 1 a 10% (MURPHY et al., 2013; NACU et al., 2013).

Murphy et al. (2013) citam que o tecido conjuntivo em excesso, no músculo em regeneração, pode acarretar resultados funcionais ruins, e a densidade do tecido conjuntivo na grande maioria dos grupos reinervados, apresentou percentagem acima do normal e na avaliação funcional, resultados ruins também foram vistos.

Fernandes et al. (2005) em sua pesquisa utilizaram estimulação elétrica após desnervação do isquiático em ratos, observando a variação da percentagem do tecido conjuntivo no músculo sóleo. Os resultados obtidos de densidade de área do tecido conjuntivo foi significativamente menor no grupo desnervado mais estimulação elétrica (16,61%) em relação ao desnervado (34,49%), sendo que ambos os grupos apresentaram valores maiores que o grupo controle (9,55%).

Durigan et al. (2006) avaliaram o efeito da estimulação elétrica (EE) na área das fibras e densidade do tecido conjuntivo do músculo sóleo de ratos submetidos à imobilização de tornozelo durante 3 dias. Seus animais foram divididos em 3 grupos: controle, imobilizado por 3 dias e imobilizado associado à EE por 3 dias. Os resultados encontrados de percentagem de TC foram: o grupo controle apresentou um valor médio de 8,93%; o grupo que foi imobilizado, 33,93%; e o grupo eletroestimulado 17,86%, observando o efeito positivo do uso da EE na minimização do aumento de tecido conjuntivo em músculos desnervados.

Neste trabalho, com músculo tibial cranial o resultado obtido de densidade de tecido conjuntivo, nos grupos eletroestimulados, esteve entre 1 e 10%, sendo GEA45 (7,92%), GER45 (8,84%), GEA90 (9,66%) e GER90 9&,00%), resultado funcional bom como descrito por MURPHY et al., 2013, e superior ao apresentado pelo grupo desnervado 45 (21,42%) e 90 (36,98%).

Portanto, a densidade de tecido conjuntivo nos músculos é um fator determinante na recuperação funcional e a sua comparação deve ser feita. Métodos mais sofisticados, os quais mostrem qual tipo de tecido conjuntivo está sendo substituído no músculo reinervado devem ser mais detalhadamente investigados.

6 CONCLUSÃO

Com o modelo experimental utilizado nesta pesquisa, a comparação entre os grupos com períodos de eletroestimulação diferentes, 45 e 90 dias, apontaram que entre grupos de mesmo período de eletroestimulação não houve diferença significativa, mas entre os grupos com períodos diferentes, 45 e 90 dias, ocorreu uma influência positiva no período maior, em todos os parâmetros avaliados. Constatando, assim, que existe uma relação direta na melhora das características morfológicas e funcionais com o aumento do período de eletroestimulação.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aguiar TMD. **Efeito antinociceptivo do resveratrol num modelo experimental de osteoartrose.** (Dissertação), Faculdade de medicina, Universidade do Porto, Portugal, 2014.

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

Alves ES. **Efeito do uso da estimulação elétrica muscular durante o processo de reparação tecidual graus distintos de axonotmese experimental do nervo ciático de ratos.** (Dissertação), Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2012.

Ashley Z, et al. Effects of chonic electrical stimulation on long-term denervated muscle of the rabbit hind limb. **J Muscle Res Cell Motil**. 2007a; 28:203-17.

Ashley Z, et al. Atrophy, but not necrosis, in rabbit skeletal muscle denervated for periods up to one year. **Am J Physiol**. 2007b; 292:440-51.

Bain JR, Mackinnon SE, Hunter DA. Functional evaluation of complete sciatic, peroneal, and posterior tibial nerve lesions in the rat. **Plast Reconst Surg.** 1989; 83(1): 129-36.

Bendszus M, Koltzenburg M, Wessing C & SolymosI L. Sequential MR imaging of denerveted muscle: Experimental Study. **Am J Neuroradiol.** 2002; 23:1427-1431.

Bowden REM, Gutmann E. Denervation and re-innervation of human voluntary muscle. **Brain,** 1944; 67: 273-76.

Carandente F, Angeli A, Candiani GB, Crosignani PG, Dammacco F, De Cecco L, et al.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, et al. Tratamentos não farmacológicos na estimulação da osteogênese. **Rev Saúde Pública.** 2002; 36(5):647-54.

Cavalcante EVV, da Silva LGM, Montenegro EJN, Pontes NT Filho. Efeito da eletroestimulação no músculo desnervado de animais: revisão sistemática. **Fisioter Mov.** 2012 jul/set;25(3):669-78.

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

Cheng H, Lederer MR, Lederer WJ & Cannell MB. Calcium sparks and[Ca2+]i waves in cardiac myocytes. **American Journal of Physiology.** 1996**;** 270, C148–159.

Crisco JJ, Jokl P, Heinen GT, Connell MD, Panjabi M. A muscle contusion injury model: biomechanics, physiology, and histology. **Am J Sports Med**. 1994; 22(5): 702-10.

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

Daneyemez M, Solmaz I& Izci Y. Prognostic factors for the surgical management of peripheral nerve lesions. **Tohoku J. Exp. Med.** 2005, 205, 269-275.

Decherchi P, et al. Électromyostimulation et recuperation fonctionnelle d'un muscle dénervé. **Science & Sports**. 2003; 18:253-63.

De Medinaceli LFW, Wyatt RJ. An index of the functional condition of rat sciatic nerve based an measurements made from walking tracks. **Experimental Neurology.** 1982; 77: 634-43.

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

Delitto A, Rose J. Comparative comfort of three waveforms used in electrically eleciting quadríceps femoris muscle contractions. **Phys Ther** 1986; 66:1704-7.

Deumens R; Jaken RJP; Marcus MAE; Joosten EAJ. The CatWalk® gait analysis in assessment of both dynamic and static gait changes after adult rat sciatic nerve resection. **J Neurosci Meth.** 2007;164(1):120-130.

Dias DV. Tecido adipose a enxerto com tubo de polietileno poroso usados na técnica de tubulização influenciaria na reinervação de músculos de contração lenta e rápida de ratos. (Dissertação), Bauru, Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo; 2011.

Dow DE, Carlson BM, Hassett CA, Dennis RG and Faulkner JA. Electrical stimulation of denervated muscles of rats maintains mass and force, but not recovery following grafting. **Res Neurol Neuroscience**. 2006; 24, 41-54.

Durigan JLQ, et al. estudo morfométrico do músculo sóleo de ratos submetidos à imobilização aguda associado à estimulação elétrica neuromuscular. **Fisioterapia em Movimento.** 2006; 19(2): 117-26.

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

Fernandes KCBG, et al. Análise morfométrica dos tecidos muscular e conjuntivo após desnervação e estimulação elétrica de baixa freqüência . **Rev. bras. fisioter**. 2005; 9(2):235-41.

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

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

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

Gasparini ALP, BarbierI CH & Mazzer N. Correlação entre diferentes métodos de avaliação funcional da marcha de ratos com lesão por esmagamento do nervo isquiático. **Acta Ortop Bras.** 2007; 15, 5:285-289.

Gaster M, Handberg A, Beck-Nielsen H, Schroder HD. Glucose transporter expression in human skeletal muscle fibers. **American Journal Endocrinology and Metabolism.** 2000; 279:529-38.

Ghayemi N, Haghighat 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.**, v. 12, n. 5, p. 457-463, 2014.

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

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

Gordon T, Sulaiman GAR, Ladak A. Electrical stimulation for improving nerve regeneration: where do we stand?. **International Review of Neurobiology**,2009; 87:433-44.

Gordon T, Tyreman N & Raji MA. The basis for diminished functional recovery after delayed peripheral nerve repair. **J Neurosci**, 2011; 31: 5325–5334.

Gordon T, English AW. Strategies to promote peripheral nerve regeneration: electrical stimulation and/or exercise. **Eur J Neurosci**. 2016; 43(3):336-50

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

Guo BS, Cheung KK, Yeung SS, Zhang BT, Yeung EW. Electrical stimulation influences satellite cell proliferation and apoptosis in unloading-induced muscle atrophy in mice. **PLoS One**. 2012; 7(1) DOI: 10.1371/ournal.pone.0030348

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

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

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

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

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

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

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

Kang H, Lichtman JW. Motor axon regeneration and muscle reinnervation in young and aged animals. **J. Neurosci. 2013;** 33(50):19480- 19491.

Kavlak E. et al. Effects of pulsed electromagnetic field and swimming exercise on rats with experimental sciatic nerve injury**. J. Phys. Ther. Sci;** 2014; 26 (9): 1355-1361.

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

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

Lim J, Han TR. Effect of electromyostimulation on apoptosis-related factors in denervation and reinnervation of rat skeletal muscles. **Muscle Nerve**.2010; 42, 422-30.

Liu K, Chen L, Seaber AV, Goldner RV, Urbaniak JR. Motor Functional and Morphological findings following End-To-Side Neurorrhaphy in the Rat Model. **J Orthop Res.** 1999;17(2):293-300.

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

Lutz BS, Chuang DCC, Hsu JC, Ma SF, Wei FC. Selection of donor nerves – an important factor in end-to-side neurorrhaphy. **Brith Journal Of Plastic Surgery.** 2000;53:149-54.

Maciel FO, Viterbo F, Chinaque LFC, Souza BM. Effect of electrical stimulation of the cranial tibial muscle after end-to-side neurorrhaphy of the peroneal nerve in rats. **Acta Cirúrgica Brasileira**.2013;28:39-47.

Maeda T, Hori S, Sasaki S, Maruo S. Effects of tension at site of coaptation on recovery of sciatic nerve function after neurorrhaphy: evaluation by walkingtrack measurement. **Microsurgery**. 1999; 19(4):200-7.

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

Margreth A, Salviati G, Di Mauro S, Turati G. Early biochemical consequences of denervation in fast and slow skeletal muscle and relationship to neural control over muscle differentiation. **J Biochem**. 1972; 126:1099-110.

Mccallister WV, Tang P, Trumble TE. Is end-to-side neurorraphy effective? A study of axonal sprouting stimulated from intact nerves. **Journal of Reconstructive Microsurgery.** 1999;15(8):597-604.

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

Midrio M. The denervated muscle: facts and hypotheses. A historical review. **Eur J Appl Physiol.** 2006; 98:1-21.

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

Minamoto VB. Efeitos da desnervação no músculo esquelético: uma revisão. **Fisioterapia em Movimento**. 2007; 20(3):63-9.

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.

Monte-Raso VV, Barbieri CH, Mazzer N. Sciatic functional index in smashing injuries of rats' sciatic nerves. Evaluation of method reproducibility among examiners. **Acta Ortop Bras.** 2006;14(3):133-6.

Murphy MM, lawson JA, Mathew SJ, Hutcheson DA, Kardon G. Satellite cells, connective tissue fibroblasts and their interactions are crucial for muscle regeneration. **Development, USA.** 2011; 138(17):3625-37.

Nacu E, et al. Connective tissue cells, but not muscle cells, are involved in establishing the proximo-distal outcome of limb regeneration in the axolotl. **Developmen**t, **Alemanha**. 2013; 140(3):513-18.

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

Neto JC, Vasconcelos BC, Sobral AP, da Silva VA Jr, Nogueira RV. Clinical and histopathologic study of the use of gangliosides for nerve regeneration in rats after axonotmesis. **J Oral Maxillofac Surg.** 2007; 65:870-4.

Paiva GR. **Células-tronco na neurorrafia látero-terminal. Estudo experimental em ratos.** (Tese), Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de Botucatu, 2016.

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

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.

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

Radtke C, Kocsis JD, Vogt PM. Transplantation of olfactory ensheating cells for peripheral nerve regeneration. **Int Rev Neurobiol.** 2009;87:405-15.

Ribeiro CMBI; Vasconcelos BCEII; Silva JC, et al. Histopathological analysis of gangliosides use in peripheral nerve regeneration after axonotmesis in rats. **Acta Cir. Bras.** 2008; vol.23 no.4

Robinson AJ, Snyder-Mackler, L. Eletrofisiologia clínica. 3 ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

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

Rosa-Junior GM. **Enxerto venoso preenchido com gordura no reparo de nervo periférico: Uma nova proposta.** (Dissertação), Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, 2010.

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

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

Russo TL, PevianI SM, Freria CM, Benato DG, Geuna S & SalvinI TF. Electrical stimulation based on chronaxie reduces atrogin-1 and myod gene expressions in denervated rat muscle. **Muscle nerve.** 2007; 35: 87-97.

Salmons S & Jarvis J. Functional electrical stimulation of denervated muscles: an experimental evaluation. **Artif Organs.** 2008; 32 (8) 597-603.

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.

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

Sendtner M, Stöckli KA, Thoenen H. Synthesis and localization of ciliary neurotrophic factor in the sciatic nerve of the adult rat after lesion and during regeneration. **J Cell Biol**. 1992; 118: 139-148.

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

Sobral LL, Oliveira LS, Takeda SYM, Somaz MC, Montebelo MIL, Teodori RM. Exercício imediato versus tardio na regeneração do nervo isquiático de ratos após axoniotmese: análise histomorfométrica e funcional. **Rev Bras Fisioter**. 2008; 12(4):311-6.

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

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

Stoll G and Muller H W. Nerve Injury, Axonal Degeneration and Neural Regeneration. **Brain Pathology.** 1999; 9:313-325.

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

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

Takekura H, et al. Plasticity of the transverse tubules following denervation and subsequent reinnervation in rat slow and fast muscle fibres. **J Muscle Res Cell Motil.** 2003; 24:439-51.

Terenghi G. Peripheral nerve regeneration and neurotrophic factors. **J Anat.** 1999;194(1):1- 14.

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

Tham SK, Morrison WA. Motor collateral sprouting through an endo-to-side nerve repair. J Hand Surg. 1998; 23A:844-51.

Tomori K, et al. Low-intensity electrical stimulation ameliorates disruption of transverse tubules and neuromuscular junctional architecture in denervated rat skeletal muscle fibers. **J Mucle Res Cell Motil**. 2010; 31:195-205.

Varejão AS, Meek MF, Robinson PH, Gramsbergen A. Methods to evaluate functional nerve recovery in adult rats: Walking track analysis, video analysis and withdrawal reflex. **J neurosci methods.** 2001; 96:89-96.

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

Viterbo F, Trindade JC, Hoshino K, Mazzoni Neto A. End-to-side neurorraphy with removal of the epineurial sheath: an experimental study in rats. **Plastic and Reconstructive Surgery.** 1994b; 94:1038-47.

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

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

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

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

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.

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.

Wishart TM, Pemberton HN, James SR, Chris J Mccabe CJ, Gillingwater TH. Modified cell cycle status in a mouse model of altered neuronal vulnerability (slow Wallerian degeneration; Wlds). **Genome Biol.** 2008; 9(6): p101.

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

Yuvrbova G, Mehra N, Shanmuganathan H, Tyreman N et al. Chemical communication between regenerating motor axons and Shwann cells in the growth pathway. **European Journal of Neuroscience.** 2009 v 30; pp 366-375.

Yang DP, Zhang DP, Mark K, Bonder DE, Pomeroy SL AND Kim H. Schwann cell proliferation during Wallerian degeneration is not necessary for regeneration and remyelination of the peripheral nerves: axon-dependent removal of newly generated Schwann cells by apoptosis. **Mol Cell Neurosci.** 2008; May ; 38(1): 80- 88.

Zhang BT, Yeung SS, Liu Y, Wang HH, Wan YU, Ling SK et al. The effects of low frequency electrical stimulation on satellite cell activity in rat skeletal muscle during hindlimb suspension.**Cell Biology**. 2010; 87(11):1-9.

8 ANEXO

8. 1 Aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa

unesp

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE BOTUCATU
FACULDADE DE MEDICINA

FMB
FACULDADE DE MEDICINA
BOTUCATU

CEUA
Ética
Comissão de Ética no Uso de Animais

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

Certificado

CERTIFICAMOS que o **(Protocolo CEUA 1042-2013)** "Efeito da estimulação elétrica de média freqüência na regeneração muscular após neurorrafia término-lateral do nervo fibular de ratos", a ser conduzido por Luis Henrique Simionato, 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 Santos Capelluppi
Secretário da CEUA

Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu – S.P. CEP: 18.618-970 Fone: (14) 3880-1608/3880-1609 e-mail secretaria: capelluppi@fmb.unesp.br

8.2 Análise estatística gerada pelo software Graphpad Prism Pad 5.1

Análise Funcional - Intensidade de Contato
45 dias

Table Analyzed					
One-way analysis of variance					
P value	< 0.0001				
P value summary	***				
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes				
Number of groups	6				
F	173,1				
R squared	0,9537				
Bartlett's test for equal variances					
Bartlett's statistic (corrected)	1,720				
P value	0,8864				
P value summary	ns				
Do the variances differ signif. (P < 0.05)	No				
ANOVA Table	SS	df	MS		
Treatment (between columns)	1621	5	324,1		
Residual (within columns)	78,63	42	1,872		
Total	1699	47			
Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	Significant? P < 0.05?	Summary	95% CI of diff
GCI vs GENLT45	8,125	16,80	Yes	***	6.081 to 10.17
GCI vs GEA45	4,500	9,303	Yes	***	2.456 to 6.544
GCI vs GER45	4,625	9,561	Yes	***	2.581 to 6.669
GCI vs GCF45	-0,1250	0,2584	No	ns	-2.169 to 1.919
GCI vs GD45	17,00	35,14	Yes	***	14.96 to 19.04
GENLT45 vs GEA45	-3,625	7,494	Yes	***	-5.669 to -1.581
GENLT45 vs GER45	-3,500	7,235	Yes	***	-5.544 to -1.456
GENLT45 vs GCF45	-8,250	17,05	Yes	***	-10.29 to -6.206
GENLT45 vs GD45	8,875	18,35	Yes	***	6.831 to 10.92
GEA45 vs GER45	0,1250	0,2584	No	ns	-1.919 to 2.169
GEA45 vs GCF45	-4,625	9,561	Yes	***	-6.669 to -2.581
GEA45 vs GD45	12,50	25,84	Yes	***	10.46 to 14.54
GER45 vs GCF45	-4,750	9,819	Yes	***	-6.794 to -2.706
GER45 vs GD45	12,38	25,58	Yes	***	10.33 to 14.42
GCF45 vs GD45	17,13	35,40	Yes	***	15.08 to 19.17

Análise Funcional - Intensidade de Contato - 90 dias

Table Analyzed					
One-way analysis of variance					
P value	< 0.0001				
P value summary	***				
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes				
Number of groups	6				
F	222,4				
R squared	0,9636				
Bartlett's test for equal variances					
Bartlett's statistic (corrected)	2,042				
P value	0,8433				
P value summary	ns				
Do the variances differ signif. (P < 0.05)	No				
ANOVA Table	SS	df	MS		
Treatment (between columns)	2478	5	495,7		
Residual (within columns)	93,63	42	2,229		
Total	2572	47			
Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	Significant? P < 0.05?	Summary	95% CI of diff
GCI vs GENLT90	11,38	21,55	Yes	***	9.145 to 13.61
GCI vs GEA90	3,000	5,683	Yes	**	0.7697 to 5.230
GCI vs GER90	2,875	5,446	Yes	**	0.6447 to 5.105
GCI vs GCF90	-0,6250	1,184	No	ns	-2.855 to 1.605
GCI vs GD90	19,50	36,94	Yes	***	17.27 to 21.73
GENLT90 vs GEA90	-8,375	15,87	Yes	***	-10.61 to -6.145
GENLT90 vs GER90	-8,500	16,10	Yes	***	-10.73 to -6.270
GENLT90 vs GCF90	-12,00	22,73	Yes	***	-14.23 to -9.770
GENLT90 vs GD90	8,125	15,39	Yes	***	5.895 to 10.36
GEA90 vs GER90	-0,1250	0,2368	No	ns	-2.355 to 2.105
GEA90 vs GCF90	-3,625	6,867	Yes	***	-5.855 to -1.395
GEA90 vs GD90	16,50	31,26	Yes	***	14.27 to 18.73
GER90 vs GCF90	-3,500	6,630	Yes	***	-5.730 to -1.270
GER90 vs GD90	16,63	31,49	Yes	***	14.39 to 18.86
GCF90 vs GD90	20,13	38,12	Yes	***	17.89 to 22.36

Comparação intensidade de contato - Tempo 45 x Tempo 90

Table Analyzed					
One-way analysis of variance					
P value	< 0.0001				
P value summary	***				
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes				
Number of groups	6				
F	43,84				
R squared	0,8392				
Bartlett's test for equal variances					
Bartlett's statistic (corrected)	2,424				
P value	0,7879				
P value summary	ns				
Do the variances differ signif. (P < 0.05)	No				
ANOVA Table	SS	df	MS		
Treatment (between columns)	447,5	5	89,50		
Residual (within columns)	85,75	42	2,042		
Total	533,3	47			
Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	Significant? P < 0.05?	Summary	95% CI of diff
GENLT45 vs GENLT90	3,250	6,433	Yes	***	1.116 to 5.384
GENLT45 vs GEA45	-3,625	7,176	Yes	***	-5.759 to -1.491
GENLT45 vs GER45	-3,500	6,928	Yes	***	-5.634 to -1.366
GENLT45 vs GEA90	-5,125	10,14	Yes	***	-7.259 to -2.991
GENLT45 vs GER90	-5,250	10,39	Yes	***	-7.384 to -3.116
GENLT90 vs GEA45	-6,875	13,61	Yes	***	-9.009 to -4.741
GENLT90 vs GER45	-6,750	13,36	Yes	***	-8.884 to -4.616
GENLT90 vs GEA90	-8,375	16,58	Yes	***	-10.51 to -6.241
GENLT90 vs GER90	-8,500	16,83	Yes	***	-10.63 to -6.366
GEA45 vs GER45	0,1250	0,2474	No	ns	-2.009 to 2.259
GEA45 vs GEA90	-1,500	2,969	No	ns	-3.634 to 0.6344
GEA45 vs GER90	-1,625	3,217	No	ns	-3.759 to 0.5094
GER45 vs GEA90	-1,625	3,217	No	ns	-3.759 to 0.5094
GER45 vs GER90	-1,750	3,464	No	ns	-3.884 to 0.3844
GEA90 vs GER90	-0,1250	0,2474	No	ns	-2.259 to 2.009

Massa Inicial (g) - 45 dias

Table Analyzed					
One-way analysis of variance					
P value	0,9497				
P value summary	ns				
Are means signif. different? (P < 0.05)	No				
Number of groups	6				
F	0,2258				
R squared	0,02048				
Bartlett's test for equal variances					
Bartlett's statistic (corrected)	4,382				
P value	0,4958				
P value summary	ns				
Do the variances differ signif. (P < 0.05)	No				
ANOVA Table	SS	df	MS		
Treatment (between columns)	107,5	5	21,51		
Residual (within columns)	5142	54	95,23		
Total	5250	59			
Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	Significant? P < 0.05?	Summary	95% CI of diff
GCI vs GENLT45	-3,900	1,264	No	ns	-16.81 to 9.010
GCI vs GEA45	-1,400	0,4537	No	ns	-14.31 to 11.51
GCI vs GER45	-1,100	0,3565	No	ns	-14.01 to 11.81
GCI vs GCF45	-3,000	0,9722	No	ns	-15.91 to 9.910
GCI vs GD45	-3,000	0,9722	No	ns	-15.91 to 9.910
GENLT45 vs GEA45	2,500	0,8101	No	ns	-10.41 to 15.41
GENLT45 vs GER45	2,800	0,9074	No	ns	-10.11 to 15.71
GENLT45 vs GCF45	0,9000	0,2917	No	ns	-12.01 to 13.81
GENLT45 vs GD45	0,9000	0,2917	No	ns	-12.01 to 13.81
GEA45 vs GER45	0,3000	0,09721	No	ns	-12.61 to 13.21
GEA45 vs GCF45	-1,600	0,5185	No	ns	-14.51 to 11.31
GEA45 vs GD45	-1,600	0,5185	No	ns	-14.51 to 11.31
GER45 vs GCF45	-1,900	0,6157	No	ns	-14.81 to 11.01
GER45 vs GD45	-1,900	0,6157	No	ns	-14.81 to 11.01
GCF45 vs GD45	0,0000	0,0000	No	ns	-12.91 to 12.91

Massa Final (g) - 45 dias

Parameter					
Table Analyzed					
One-way analysis of variance					
P value	0,9571				
P value summary	ns				
Are means signif. different? (P < 0.05)	No				
Number of groups	5				
F	0,1606				
R squared	0,01407				
Bartlett's test for equal variances					
Bartlett's statistic (corrected)	0,4531				
P value	0,9779				
P value summary	ns				
Do the variances differ signif. (P < 0.05)	No				
ANOVA Table	SS	df	MS		
Treatment (between columns)	337,9	4	84,47		
Residual (within columns)	23670	45	526,0		
Total	24010	49			
Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	Significant? P < 0.05?	Summary	95% CI of diff
GCI vs GENLT45	-373,6	0,0000	No	ns	0.0000 to 0.0000
GCI vs GEA45	-369,3	0,0000	No	ns	0.0000 to 0.0000
GCI vs GER45	-365,4	0,0000	No	ns	0.0000 to 0.0000
GCI vs GCF45	-369,0	0,0000	No	ns	0.0000 to 0.0000
GCI vs GD45	-369,3	0,0000	No	ns	0.0000 to 0.0000
GENLT45 vs GEA45	4,300	0,5929	No	ns	-26.27 to 34.87
GENLT45 vs GER45	8,200	1,131	No	ns	-22.37 to 38.77
GENLT45 vs GCF45	4,600	0,6342	No	ns	-25.97 to 35.17
GENLT45 vs GD45	4,300	0,5929	No	ns	-26.27 to 34.87
GEA45 vs GER45	3,900	0,5377	No	ns	-26.67 to 34.47
GEA45 vs GCF45	0,3000	0,04136	No	ns	-30.27 to 30.87
GEA45 vs GD45	0,0000	0,0000	No	ns	-30.57 to 30.57
GER45 vs GCF45	-3,600	0,4964	No	ns	-34.17 to 26.97
GER45 vs GD45	-3,900	0,5377	No	ns	-34.47 to 26.67
GCF45 vs GD45	-0,3000	0,04136	No	ns	-30.87 to 30.27

Massa Inicial (g) - 90 dias

Table Analyzed					
One-way analysis of variance					
P value	0,4430				
P value summary	ns				
Are means signif. different? (P < 0.05)	No				
Number of groups	6				
F	0,9724				
R squared	0,08260				
Bartlett's test for equal variances					
Bartlett's statistic (corrected)	1,974				
P value	0,8528				
P value summary	ns				
Do the variances differ signif. (P < 0.05)	No				
ANOVA Table	SS	df	MS		
Treatment (between columns)	340,5	5	68,10		
Residual (within columns)	3782	54	70,03		
Total	4122	59			
Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	Significant? P < 0.05?	Summary	95% CI of diff
GCI vs GENLT90	-5,400	2,041	No	ns	-16.47 to 5.672
GCI vs GEA90	-0,2000	0,07558	No	ns	-11.27 to 10.87
GCI vs GER90	-6,000	2,267	No	ns	-17.07 to 5.072
GCI vs GCF90	-3,700	1,398	No	ns	-14.77 to 7.372
GCI vs GD90	-4,600	1,738	No	ns	-15.67 to 6.472
GENLT90 vs GEA90	5,200	1,965	No	ns	-5.872 to 16.27
GENLT90 vs GER90	-0,6000	0,2267	No	ns	-11.67 to 10.47
GENLT90 vs GCF90	1,700	0,6424	No	ns	-9.372 to 12.77
GENLT90 vs GD90	0,8000	0,3023	No	ns	-10.27 to 11.87
GEA90 vs GER90	-5,800	2,192	No	ns	-16.87 to 5.272
GEA90 vs GCF90	-3,500	1,323	No	ns	-14.57 to 7.572
GEA90 vs GD90	-4,400	1,663	No	ns	-15.47 to 6.672
GER90 vs GCF90	2,300	0,8691	No	ns	-8.772 to 13.37
GER90 vs GD90	1,400	0,5290	No	ns	-9.672 to 12.47
GCF90 vs GD90	-0,9000	0,3401	No	ns	-11.97 to 10.17

Massa Final (g) - 90 dias

Table Analyzed					
One-way analysis of variance					
P value	0,2051				
P value summary	ns				
Are means signif. different? (P < 0.05)	No				
Number of groups	5				
F	1,546				
R squared	0,1208				
Bartlett's test for equal variances					
Bartlett's statistic (corrected)	0,3724				
P value	0,9847				
P value summary	ns				
Do the variances differ signif. (P < 0.05)	No				
ANOVA Table	SS	df	MS		
Treatment (between columns)	580,1	4	145,0		
Residual (within columns)	4221	45	93,80		
Total	4801	49			
Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	Significant? P < 0.05?	Summary	95% CI of diff
GCI vs GENLT90	-411,2	0,0000	No	ns	0.0000 to 0.0000
GCI vs GEA90	-420,6	0,0000	No	ns	0.0000 to 0.0000
GCI vs GER90	-415,1	0,0000	No	ns	0.0000 to 0.0000
GCI vs GCF90	-419,0	0,0000	No	ns	0.0000 to 0.0000
GCI vs GD90	-414,0	0,0000	No	ns	0.0000 to 0.0000
GENLT90 vs GEA90	-9,400	3,069	No	ns	-22.31 to 3.508
GENLT90 vs GER90	-3,900	1,273	No	ns	-16.81 to 9.008
GENLT90 vs GCF90	-7,800	2,547	No	ns	-20.71 to 5.108
GENLT90 vs GD90	-2,800	0,9142	No	ns	-15.71 to 10.11
GEA90 vs GER90	5,500	1,796	No	ns	-7.408 to 18.41
GEA90 vs GCF90	1,600	0,5224	No	ns	-11.31 to 14.51
GEA90 vs GD90	6,600	2,155	No	ns	-6.308 to 19.51
GER90 vs GCF90	-3,900	1,273	No	ns	-16.81 to 9.008
GER90 vs GD90	1,100	0,3592	No	ns	-11.81 to 14.01
GCF90 vs GD90	5,000	1,633	No	ns	-7.908 to 17.91

Força (N) - 45 dias

Table Analyzed					
One-way analysis of variance					
P value	< 0.0001				
P value summary	***				
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes				
Number of groups	6				
F	271,9				
R squared	0,9742				
Bartlett's test for equal variances					
Bartlett's statistic (corrected)	20,61				
P value	0,0010				
P value summary	***				
Do the variances differ signif. (P < 0.05)	Yes				
ANOVA Table	SS	df	MS		
Treatment (between columns)	2,557	5	0,5115		
Residual (within columns)	0,06771	36	0,001881		
Total	2,625	41			
Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	Significant? P < 0.05?	Summary	95% CI of diff
GCI vs GENLT45	0,04857	2,963	No	ns	-0.02126 to 0.1184
GCI vs GEA45	-0,1600	9,761	Yes	***	-0.2298 to -0.09017
GCI vs GER45	-0,1700	10,37	Yes	***	-0.2398 to -0.1002
GCI vs GCF45	-0,3043	18,56	Yes	***	-0.3741 to -0.2345
GCI vs GD45	0,4671	28,50	Yes	***	0.3973 to 0.5370
GENLT45 vs GEA45	-0,2086	12,72	Yes	***	-0.2784 to -0.1387
GENLT45 vs GER45	-0,2186	13,33	Yes	***	-0.2884 to -0.1487
GENLT45 vs GCF45	-0,3529	21,53	Yes	***	-0.4227 to -0.2830
GENLT45 vs GD45	0,4186	25,53	Yes	***	0.3487 to 0.4884
GEA45 vs GER45	-0,01000	0,6100	No	ns	-0.07983 to 0.05983
GEA45 vs GCF45	-0,1443	8,802	Yes	***	-0.2141 to -0.07445
GEA45 vs GD45	0,6271	38,26	Yes	***	0.5573 to 0.6970
GER45 vs GCF45	-0,1343	8,192	Yes	***	-0.2041 to -0.06445
GER45 vs GD45	0,6371	38,87	Yes	***	0.5673 to 0.7070
GCF45 vs GD45	0,7714	47,06	Yes	***	0.7016 to 0.8413

Força (N) - 90 dias

Table Analyzed					
One-way analysis of variance					
P value	< 0.0001				
P value summary	***				
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes				
Number of groups	6				
F	936,3				
R squared	0,9924				
Bartlett's test for equal variances					
Bartlett's statistic (corrected)	14,10				
P value	0,0150				
P value summary	*				
Do the variances differ signif. (P < 0.05)	Yes				
ANOVA Table	SS	df	MS		
Treatment (between columns)	3,801	5	0,7602		
Residual (within columns)	0,02923	36	0,0008119		
Total	3,830	41			
Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	Significant? P < 0.05?	Summary	95% CI of diff
GCI vs GENLT90	-0,01714	1,592	No	ns	-0.06302 to 0.02874
GCI vs GEA90	-0,2629	24,41	Yes	***	-0.3087 to -0.2170
GCI vs GER90	-0,2657	24,67	Yes	***	-0.3116 to -0.2198
GCI vs GCF90	-0,4429	41,12	Yes	***	-0.4887 to -0.3970
GCI vs GD90	0,4971	46,16	Yes	***	0.4513 to 0.5430
GENLT90 vs GEA90	-0,2457	22,82	Yes	***	-0.2916 to -0.1998
GENLT90 vs GER90	-0,2486	23,08	Yes	***	-0.2945 to -0.2027
GENLT90 vs GCF90	-0,4257	39,53	Yes	***	-0.4716 to -0.3798
GENLT90 vs GD90	0,5143	47,75	Yes	***	0.4684 to 0.5602
GEA90 vs GER90	-0,002857	0,2653	No	ns	-0.04874 to 0.04302
GEA90 vs GCF90	-0,1800	16,71	Yes	***	-0.2259 to -0.1341
GEA90 vs GD90	0,7600	70,57	Yes	***	0.7141 to 0.8059
GER90 vs GCF90	-0,1771	16,45	Yes	***	-0.2230 to -0.1313
GER90 vs GD90	0,7629	70,83	Yes	***	0.7170 to 0.8087
GCF90 vs GD90	0,9400	87,28	Yes	***	0.8941 to 0.9859

Comparação Força (N) - Tempo 45 x Tempo 90

Table Analyzed					
One-way analysis of variance					
P value	< 0.0001				
P value summary	***				
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes				
Number of groups	6				
F	61,83				
R squared	0,8957				
Bartlett's test for equal variances					
Bartlett's statistic (corrected)	20,74				
P value	0,0009				
P value summary	***				
Do the variances differ signif. (P < 0.05)	Yes				
ANOVA Table	SS	df	MS		
Treatment (between columns)	0,5935	5	0,1187		
Residual (within columns)	0,06911	36	0,001920		
Total	0,6626	41			
Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	Significant? P < 0.05?	Summary	95% CI of diff
GNLT45 vs GNLT90	-0,07286	4,399	Yes	*	-0.1434 to -0.002308
GNLT45 vs GEA45	-0,2086	12,59	Yes	***	-0.2791 to -0.1380
GNLT45 vs GER45	-0,2186	13,20	Yes	***	-0.2891 to -0.1480
GNLT45 vs GEA90	-0,3186	19,24	Yes	***	-0.3891 to -0.2480
GNLT45 vs GER90	-0,3214	19,41	Yes	***	-0.3920 to -0.2509
GNLT90 vs GEA45	-0,1357	8,195	Yes	***	-0.2063 to -0.06516
GNLT90 vs GER45	-0,1457	8,799	Yes	***	-0.2163 to -0.07516
GNLT90 vs GEA90	-0,2457	14,84	Yes	***	-0.3163 to -0.1752
GNLT90 vs GER90	-0,2486	15,01	Yes	***	-0.3191 to -0.1780
GEA45 vs GER45	-0,01000	0,6038	No	ns	-0.08055 to 0.06055
GEA45 vs GEA90	-0,1100	6,642	Yes	***	-0.1805 to -0.03945
GEA45 vs GER90	-0,1129	6,815	Yes	***	-0.1834 to -0.04231
GER45 vs GEA90	-0,1000	6,038	Yes	**	-0.1705 to -0.02945
GER45 vs GER90	-0,1029	6,211	Yes	**	-0.1734 to -0.03231
GEA90 vs GER90	-0,002857	0,1725	No	ns	-0.07341 to 0.06769

Área Fibra Muscular 45 dias

Table Analyzed					
One-way analysis of variance					
P value	< 0.0001				
P value summary	***				
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes				
Number of groups	6				
F	108,1				
R squared	0,8897				
Bartlett's test for equal variances					
Bartlett's statistic (corrected)	22,31				
P value	0,0005				
P value summary	***				
Do the variances differ signif. (P < 0.05)	Yes				
ANOVA Table	SS	df	MS		
Treatment (between columns)	17370000	5	3474000		
Residual (within columns)	2153000	67	32130		
Total	19520000	72			
Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	Significant? P < 0.05?	Summary	95% CI of diff
GCI vs GNLT45	560,7	11,56	Yes	***	359.1 to 762.2
GCI vs GEA45	136,3	2,810	No	ns	-65.26 to 337.9
GCI vs GER45	140,0	2,887	No	ns	-61.54 to 341.6
GCI vs GCF45	-816,5	16,83	Yes	***	-1018 to -614.9
GCI vs GD45	815,5	16,81	Yes	***	613.9 to 1017
GNLT45 vs GEA45	-424,4	7,851	Yes	***	-648.9 to -199.8
GNLT45 vs GER45	-420,6	7,782	Yes	***	-645.2 to -196.1
GNLT45 vs GCF45	-1377	25,48	Yes	***	-1602 to -1153
GNLT45 vs GD45	254,8	4,715	Yes	*	30.23 to 479.4
GEA45 vs GER45	3,727	0,06896	No	ns	-220.9 to 228.3
GEA45 vs GCF45	-952,8	17,63	Yes	***	-1177 to -728.2
GEA45 vs GD45	679,2	12,57	Yes	***	454.6 to 903.8
GER45 vs GCF45	-956,5	17,70	Yes	***	-1181 to -732.0
GER45 vs GD45	675,5	12,50	Yes	***	450.9 to 900.0
GCF45 vs GD45	1632	30,19	Yes	***	1407 to 1857

Área Fibra Muscular 90 dias

Table Analyzed					
One-way analysis of variance					
P value	< 0.0001				
P value summary	***				
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes				
Number of groups	6				
F	137,4				
R squared	0,8707				
Bartlett's test for equal variances					
Bartlett's statistic (corrected)	83,40				
P value	< 0.0001				
P value summary	***				
Do the variances differ signif. (P < 0.05)	Yes				
ANOVA Table	SS	df	MS		
Treatment (between columns)	109300000	5	21870000		
Residual (within columns)	16230000	102	159100		
Total	125600000	107			
Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	Significant? P < 0.05?	Summary	95% CI of diff
GCI vs GNLT90	434,3	4,619	Yes	*	47.30 to 821.3
GCI vs GEA90	-421,0	4,478	Yes	*	-808.0 to -34.02
GCI vs GER90	-438,3	4,662	Yes	*	-825.3 to -51.35
GCI vs GCF90	-1635	17,39	Yes	***	-2022 to -1248
GCI vs GD90	1693	18,00	Yes	***	1306 to 2079
GNLT90 vs GEA90	-855,3	9,097	Yes	***	-1242 to -468.3
GNLT90 vs GER90	-872,6	9,282	Yes	***	-1260 to -485.6
GNLT90 vs GCF90	-2069	22,01	Yes	***	-2456 to -1682
GNLT90 vs GD90	1258	13,38	Yes	***	871.2 to 1645
GEA90 vs GER90	-17,33	0,1844	No	ns	-404.3 to 369.6
GEA90 vs GCF90	-1214	12,91	Yes	***	-1601 to -827.2
GEA90 vs GD90	2114	22,48	Yes	***	1727 to 2500
GER90 vs GCF90	-1197	12,73	Yes	***	-1584 to -809.9
GER90 vs GD90	2131	22,66	Yes	***	1744 to 2518
GCF90 vs GD90	3328	35,39	Yes	***	2941 to 3715

Comparação Área Fibra Muscular 45X90 dias

Table Analyzed					
One-way analysis of variance					
P value	< 0.0001				
P value summary	***				
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes				
Number of groups	6				
F	17,18				
R squared	0,5146				
Bartlett's test for equal variances					
Bartlett's statistic (corrected)	85,46				
P value	< 0.0001				
P value summary	***				
Do the variances differ signif. (P < 0.05)	Yes				
ANOVA Table	SS	df	MS		
Treatment (between columns)	13890000	5	2779000		
Residual (within columns)	13100000	81	161800		
Total	27000000	86			
Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	Significant? P < 0.05?	Summary	95% CI of diff
GNLT45 vs GNLT90	-126,4	1,161	No	ns	-576.9 to 324.2
GNLT45 vs GEA45	-424,4	3,499	No	ns	-926.4 to 77.63
GNLT45 vs GER45	-420,6	3,469	No	ns	-922.6 to 81.35
GNLT45 vs GEA90	-981,7	9,019	Yes	***	-1432 to -531.1
GNLT45 vs GER90	-999,0	9,179	Yes	***	-1450 to -548.5
GNLT90 vs GEA45	-298,0	2,738	No	ns	-748.5 to 152.6
GNLT90 vs GER45	-294,2	2,703	No	ns	-744.8 to 156.3
GNLT90 vs GEA90	-855,3	9,022	Yes	***	-1248 to -462.9
GNLT90 vs GER90	-872,6	9,205	Yes	***	-1265 to -480.2
GEA45 vs GER45	3,727	0,03074	No	ns	-498.3 to 505.7
GEA45 vs GEA90	-557,3	5,120	Yes	**	-1008 to -106.8
GEA45 vs GER90	-574,6	5,280	Yes	**	-1025 to -124.1
GER45 vs GEA90	-561,0	5,155	Yes	**	-1012 to -110.5
GER45 vs GER90	-578,4	5,314	Yes	**	-1029 to -127.8
GEA90 vs GER90	-17,33	0,1828	No	ns	-409.8 to 375.1

Diâmetro Fibra Muscular 45 dias

Table Analyzed					
One-way analysis of variance					
P value	< 0.0001				
P value summary	***				
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes				
Number of groups	6				
F	601,1				
R squared	0,9788				
Bartlett's test for equal variances					
Bartlett's statistic (corrected)	9,816				
P value	0,0806				
P value summary	ns				
Do the variances differ signif. (P < 0.05)	No				
ANOVA Table	SS	df	MS		
Treatment (between columns)	9157	5	1831		
Residual (within columns)	198,0	65	3,047		
Total	9355	70			
Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	Significant? P < 0.05?	Summary	95% CI of diff
GCI vs GNLT45	18,03	37,29	Yes	***	16.02 to 20.04
GCI vs GEA45	4,483	9,274	Yes	***	2.473 to 6.493
GCI vs GER45	4,392	9,086	Yes	***	2.382 to 6.402
GCI vs GCF45	-9,699	20,06	Yes	***	-11.71 to -7.689
GCI vs GD45	25,66	53,09	Yes	***	23.66 to 27.67
GNLT45 vs GEA45	-13,55	25,74	Yes	***	-15.73 to -11.36
GNLT45 vs GER45	-13,64	25,91	Yes	***	-15.82 to -11.45
GNLT45 vs GCF45	-27,73	52,69	Yes	***	-29.92 to -25.54
GNLT45 vs GD45	7,636	14,51	Yes	***	5.448 to 9.824
GEA45 vs GER45	-0,09091	0,1727	No	ns	-2.279 to 2.097
GEA45 vs GCF45	-14,18	26,95	Yes	***	-16.37 to -11.99
GEA45 vs GD45	21,18	40,25	Yes	***	18.99 to 23.37
GER45 vs GCF45	-14,09	26,77	Yes	***	-16.28 to -11.90
GER45 vs GD45	21,27	40,42	Yes	***	19.08 to 23.46
GCF45 vs GD45	35,36	67,20	Yes	***	33.18 to 37.55

Diâmetro Fibra Muscular 90 dias

Table Analyzed					
One-way analysis of variance					
P value	< 0.0001				
P value summary	***				
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes				
Number of groups	6				
F	1314				
R squared	0,9865				
Bartlett's test for equal variances					
Bartlett's statistic (corrected)	21,97				
P value	0,0005				
P value summary	***				
Do the variances differ signif. (P < 0.05)	Yes				
ANOVA Table	SS	df	MS		
Treatment (between columns)	22980	5	4597		
Residual (within columns)	314,8	90	3,497		
Total	23300	95			
Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	Significant? P < 0.05?	Summary	95% CI of diff
GCI vs GNLT90	5,563	11,90	Yes	***	3.632 to 7.493
GCI vs GEA90	-3,125	6,684	Yes	***	-5.056 to -1.194
GCI vs GER90	-3,375	7,219	Yes	***	-5.306 to -1.444
GCI vs GCF90	-14,19	30,35	Yes	***	-16.12 to -12.26
GCI vs GD90	35,38	75,66	Yes	***	33.44 to 37.31
GNLT90 vs GEA90	-8,688	18,58	Yes	***	-10.62 to -6.757
GNLT90 vs GER90	-8,938	19,12	Yes	***	-10.87 to -7.007
GNLT90 vs GCF90	-19,75	42,24	Yes	***	-21.68 to -17.82
GNLT90 vs GD90	29,81	63,77	Yes	***	27.88 to 31.74
GEA90 vs GER90	-0,2500	0,5347	No	ns	-2.181 to 1.681
GEA90 vs GCF90	-11,06	23,66	Yes	***	-12.99 to -9.132
GEA90 vs GD90	38,50	82,35	Yes	***	36.57 to 40.43
GER90 vs GCF90	-10,81	23,13	Yes	***	-12.74 to -8.882
GER90 vs GD90	38,75	82,88	Yes	***	36.82 to 40.68
GCF90 vs GD90	49,56	106,0	Yes	***	47.63 to 51.49

Comparação Diâmetro Fibra Muscular 45X90 dias

Table Analyzed					
One-way analysis of variance					
P value	< 0.0001				
P value summary	***				
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes				
Number of groups	6				
F	194,4				
R squared	0,9284				
Bartlett's test for equal variances					
Bartlett's statistic (corrected)	7,276				
P value	0,2009				
P value summary	ns				
Do the variances differ signif. (P < 0.05)	No				
ANOVA Table	SS	df	MS		
Treatment (between columns)	3868	5	773,5		
Residual (within columns)	298,5	75	3,980		
Total	4166	80			
Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	Significant? P < 0.05?	Summary	95% CI of diff
GNLT45 vs GNLT90	-12,47	22,56	Yes	***	-14.76 to -10.18
GNLT45 vs GEA45	-13,55	22,52	Yes	***	-16.04 to -11.05
GNLT45 vs GER45	-13,64	22,67	Yes	***	-16.13 to -11.14
GNLT45 vs GEA90	-21,15	38,29	Yes	***	-23.44 to -18.86
GNLT45 vs GER90	-21,40	38,74	Yes	***	-23.69 to -19.11
GNLT90 vs GEA45	-1,080	1,954	No	ns	-3.370 to 1.211
GNLT90 vs GER45	-1,170	2,118	No	ns	-3.461 to 1.120
GNLT90 vs GEA90	-8,688	17,42	Yes	***	-10.76 to -6.620
GNLT90 vs GER90	-8,938	17,92	Yes	***	-11.01 to -6.870
GEA45 vs GER45	-0,09091	0,1511	No	ns	-2.585 to 2.403
GEA45 vs GEA90	-7,608	13,77	Yes	***	-9.899 to -5.317
GEA45 vs GER90	-7,858	14,22	Yes	***	-10.15 to -5.567
GER45 vs GEA90	-7,517	13,61	Yes	***	-9.808 to -5.226
GER45 vs GER90	-7,767	14,06	Yes	***	-10.06 to -5.476
GEA90 vs GER90	-0,2500	0,5013	No	ns	-2.318 to 1.818

Tecido Conjuntivo (%) - 45 dias

Table Analyzed					
One-way analysis of variance					
P value	< 0.0001				
P value summary	***				
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes				
Number of groups	6				
F	167,3				
R squared	0,9404				
Bartlett's test for equal variances					
Bartlett's statistic (corrected)	31,43				
P value	< 0.0001				
P value summary	***				
Do the variances differ signif. (P < 0.05)	Yes				
ANOVA Table	SS	df	MS		
Treatment (between columns)	2505	5	501,0		
Residual (within columns)	158,7	53	2,994		
Total	2664	58			
Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	Significant? P < 0.05?	Summary	95% CI of diff
GCI vs GENLT45	-0,4489	0,8038	No	ns	-2.787 to 1.890
GCI vs GEA45	-1,985	3,245	No	ns	-4.547 to 0.5764
GCI vs GER45	-2,912	4,598	Yes	*	-5.564 to -0.2602
GCI vs GCF45	-0,08775	0,1434	No	ns	-2.649 to 2.474
GCI vs GD45	-15,49	29,24	Yes	***	-17.71 to -13.27
GENLT45 vs GEA45	-1,536	2,751	No	ns	-3.875 to 0.8021
GENLT45 vs GER45	-2,463	4,232	Yes	*	-4.900 to -0.02628
GENLT45 vs GCF45	0,3612	0,6467	No	ns	-1.977 to 2.700
GENLT45 vs GD45	-15,04	32,19	Yes	***	-17.00 to -13.08
GEA45 vs GER45	-0,9265	1,463	No	ns	-3.578 to 1.725
GEA45 vs GCF45	1,898	3,102	No	ns	-0.6641 to 4.459
GEA45 vs GD45	-13,50	25,49	Yes	***	-15.72 to -11.29
GER45 vs GCF45	2,824	4,460	Yes	*	0.1725 to 5.476
GER45 vs GD45	-12,58	22,68	Yes	***	-14.90 to -10.26
GCF45 vs GD45	-15,40	29,07	Yes	***	-17.62 to -13.18

Tecido Conjuntivo (%) - 90 dias

Table Analyzed					
One-way analysis of variance					
P value	< 0.0001				
P value summary	***				
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes				
Number of groups	6				
F	557,9				
R squared	0,9845				
ANOVA Table	SS	df	MS		
Treatment (between columns)	10030	5	2006		
Residual (within columns)	158,2	44	3,596		
Total	10190	49			
Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	Significant? P < 0.05?	Summary	95% CI of diff
GCI vs GENLT90	-0,6058	0,9723	No	ns	-3.234 to 2.022
GCI vs GEA90	-3,638	4,008	No	ns	-7.467 to 0.1911
GCI vs GER90	-0,9787	1,192	No	ns	-4.442 to 2.485
GCI vs GCF90	-0,05500	0,08204	No	ns	-2.883 to 2.773
GCI vs GD90	-30,96	53,32	Yes	***	-33.41 to -28.51
GENLT90 vs GEA90	-3,032	3,472	No	ns	-6.716 to 0.6518
GENLT90 vs GER90	-0,3730	0,4764	No	ns	-3.675 to 2.929
GENLT90 vs GCF90	0,5508	0,8841	No	ns	-2.077 to 3.179
GENLT90 vs GD90	-30,35	57,79	Yes	***	-32.57 to -28.14
GEA90 vs GER90	2,659	2,597	No	ns	-1.661 to 6.979
GEA90 vs GCF90	3,583	3,947	No	ns	-0.2461 to 7.412
GEA90 vs GD90	-27,32	32,38	Yes	***	-30.88 to -23.76
GER90 vs GCF90	0,9237	1,125	No	ns	-2.540 to 4.387
GER90 vs GD90	-29,98	39,99	Yes	***	-33.14 to -26.82
GCF90 vs GD90	-30,90	53,22	Yes	***	-33.35 to -28.45

Comparação Tecido conjuntivo (%) 45x90 dias

Table Analyzed					
One-way analysis of variance					
P value	0,0188				
P value summary	*				
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes				
Number of groups	6				
F	3,103				
R squared	0,2846				
ANOVA Table	SS	df	MS		
Treatment (between columns)	51,69	5	10,34		
Residual (within columns)	129,9	39	3,332		
Total	181,6	44			
Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	Significant? P < 0.05?	Summary	95% CI of diff
GENLT45 vs GENLT90	-0,2444	0,4536	No	ns	-2.528 to 2.039
GENLT45 vs GEA45	-1,536	2,608	No	ns	-4.034 to 0.9608
GENLT45 vs GER45	-2,463	4,012	No	ns	-5.065 to 0.1391
GENLT45 vs GEA90	-3,277	3,933	No	ns	-6.808 to 0.2551
GENLT45 vs GER90	-0,6173	0,8285	No	ns	-3.776 to 2.541
GENLT90 vs GEA45	-1,292	2,154	No	ns	-3.834 to 1.250
GENLT90 vs GER45	-2,219	3,555	No	ns	-4.864 to 0.4267
GENLT90 vs GEA90	-3,032	3,607	No	ns	-6.596 to 0.5314
GENLT90 vs GER90	-0,3730	0,4949	No	ns	-3.567 to 2.821
GEA45 vs GER45	-0,9265	1,387	No	ns	-3.758 to 1.905
GEA45 vs GEA90	-1,740	1,991	No	ns	-5.444 to 1.964
GEA45 vs GER90	0,9191	1,163	No	ns	-2.431 to 4.269
GER45 vs GEA90	-0,8135	0,9134	No	ns	-4.589 to 2.962
GER45 vs GER90	1,846	2,281	No	ns	-1.584 to 5.275
GEA90 vs GER90	2,659	2,698	No	ns	-1.519 to 6.838

8.3 Artigo a ser enviado para Acta cirurgica

Correntes russa e aussie na recuperação do músculo tibial cranial após neurorrafia látero-terminal em ratos

Luís Henrique Simionato[I], Carlos Henrique Facchin Bortolucci[II], Geraldo Marco Rosa Júnior [III], Fausto Viterbo [IV]

[I] Professor assistente de Fisioterapia, Centro de Ciências da Saúde da Universidade Sagrado Coração. Concepção e delineamento; Aquisição dos dados; Procedimentos técnicos; Interpretação dos dados; Redação do manuscrito.

[II] Professor assistente de Fisioterapia, Centro de Ciências da Saúde da Universidade Sagrado Coração. Aquisição de dados; Revisão crítica.

[III] Departamento de Ciências da Saúde, Universidade Sagrado Coração, Bauru. Contribuição científica e intelectual efetiva para o estudo; Revisão crítica.

[IV] Departamento de Cirurgia e Ortopedia, Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Júlio de Mesquita Filho. Concepção e delineamento; Revisão crítica; Avaliação Final.

ABSTRACT

OBJETIVO: Este trabalho descreve, avalia e compara a eficiência entre as correntes russa e aussie na recuperação do músculo tibial cranial após neurorrafia látero-terminal em ratos.

MÉTODO: Foram utilizados 120 ratos Wistar machos (*Rattus norvergicus*), eletroestimulados com corrente russa e aussie, após neurorrafia látero-terminal, em dois períodos diferentes 45 e 90 dias, distribuídos em 11 grupos: Controle Grupo Controle Inicial (GCI); Grupo Neurorrafia Látero-terminal 45 (GNLT45); Grupo Neurorrafia Látero-terminal com Estimulação Aussie 45 dias (GEA45); Grupo Neurorrafia Látero-terminal com Estimulação Russa 45 dias (GER45); Grupo Desnervado 45 dias (GD45); Grupo Controle Final 45 (GCF45); Grupo Neurorrafia Látero-terminal 90 (GNLT90); Grupo Neurorrafia Látero-terminal com Estimulação Aussie 90 dias (GEA90); Grupo Neurorrafia Láatero-terminal com Estimulação Russa

90 dias (GER90); Grupo Desnervado 90 dias (GD90); Grupo Controle Final 90 (GCF90). Foram realizadas análises funcionais e morfométricas dos tecidos musculares dos ratos comparando a resposta da regeneração trófica do tecido muscular entre os diferentes tratamentos.

RESULTADOS: A comparação entre os grupos com períodos de eletroestimulção diferentes 45 e 90 dias, apontaram que entre grupos de mesmo período de eletroestimulação não houve diferença significativa, mas entre os grupos com períodos diferentes, 45 e 90 dias, e que ocorreu uma influência positiva no período maior.

CONCLUSÃO: Com o modelo experimental utilizado nesta pesquisa, conclui-se que existe uma relação direta na melhora das características morfológicas e funcionais do tecido muscular pós NLT com o aumento do período de eletroestimulação.

Palavras-chaves: Neurorrafia Látero-terminal. Eletroestimulação. Nervo Fibular Músculo Tibial Cranial.

Introdução

As lesões nos nervos periféricos causam alterações na estrutura, metabolismo e atividade fisiológica do corpo celular neuronal, podendo interromper a inervação dos órgãos distais à lesão e, tratando-se de neurônio motor, o órgão comprometido é o músculo.[1, 2]

Técnicas terapêuticas para recuperação dessas lesões nervosas, são desenvolvidas por profissionais de diversas áreas da medicina, pesquisando a fisiopatologia das lesões nervosas periféricas com o intuito de promover a regeneração destes nervos e a recuperação funcional.[3]

Viterbo[4] e Viterbo et al.[5] propuseram a neurorrafia látero-terminal (NLT) sem lesão no nervo doador e, até mesmo, sem a remoção do epineuro.[6] Com trabalho experimental em ratos, realizaram a secção do nervo fibular, que inerva o músculo tibial cranial (MTC), e seu coto distal foi suturado à face lateral do nervo tibial intacto, sem a remoção do epineuro. Obtiveram, pela primeira vez, reinervação muscular sem prejuízo ao nervo doador. 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. A técnica de neurorrafia látero-terminal chamou a atenção da comunidade científica por apresentar resultados expressivos em relação a regeneração da fibra nervosa[7] diversos estudos experimentais estão sendo realizados reproduzindo a NLT. [8, 9, 10, 11, 12]

A estimulação elétrica (EE) com finalidade regenerativa, embora controvertida 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. [13, 14, 15, 16, 17, 18, 19]

Existe atualmente no mercado dois tipos distintos de corrente de média frequência, a corrente Russa e corrente Aussie. A corrente Russa apresenta os seguintes dados: frequência de 2500Hz, ciclo de trabalho de 50%, estímulo de 10 segundos, seguido por outro de 50 segundos ou descanso, pulso de 4ms e burst ajustável. É recomendado que a corrente seja utilizada durante 10 minutos por sessão e alternadamente, podendo ser utilizada no tratamento da atrofia muscular e aumento

de força sendo que com a associação de exercícios físicos esse aumento de força tem um resultado significativo.[20]

A corrente Aussie é uma corrente elétrica terapêutica alternada com frequência na faixa de 1000Hz com alguma semelhança em relação a Corrente Russa. A diferença está no valor da corrente em Hz utilizada, bem como no formato de onda. A corrente Russa é apresenta duração de pulso de 4ms, já a corrente Aussie apresenta duração de 2ms. Estudos sugerem ainda, 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.[21]

Considerando as pesquisas atuais, que apresentam a eletroestimulação como coadjuvante importante na regeneração das lesões nervosas periféricas, mas que ainda suscita diversas questões; e a neurorrafia látero-terminal uma importante técnica no tratamento de lesão nervosa periférica, sobretudo em casos críticos, mas que ainda demanda aprimoramento, decidiu-se estudar o efeito da eletroestimulação, com dois tipos diferentes de correntes, na reinervação periférica por meio da neurorrafia látero-terminal.

Métodos

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 após análise do Comitê de Ética da Faculdade de Medicina de Botucatu, sob o número 1042/2013.

Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade do Sagrado Coração – USC/BAURU. Foram utilizados 120 ratos (*Rattus norvergicus*) da linhagem Wistar, machos com 80 dias de vida, eletroestimulados com corrente russa e aussie, após neurorrafia látero-terminal, em dois períodos diferentes 45 e 90 dias, divididos em 11 grupos (figuras 1 e 2).

Figura 1 - Grupos experimentais, 45 dias.

Grupos Experimentais 45 Dias	Grupos/N° Animais
Grupo Controle Inicial	(GCI) 08 animais
Grupo Neurorrafia Látero-Terminal 45 dias	(GNLT45) com 08 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 08 animais
Grupo Controle Final 45 dias	(GCF 45) com 08 animais

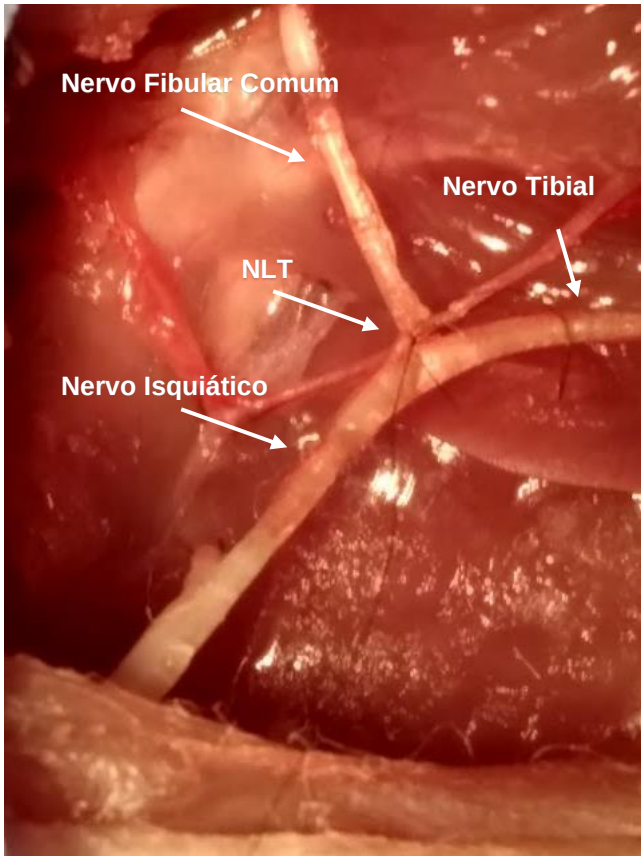
Figura 2 - Grupos experimentais, 90 dias.

Grupos Experimentais 90 Dias	Grupos/N° Animais
Grupo Controle Inicial	(GCI) 08 animais
Grupo Neurorrafia Látero-Terminal 90 dias	(GNLT90) com 08 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 08 animais
Grupo Controle Final 90 dias	(GCF 90) com 08 animais

Os animais dos grupos CGI, CGF 45 e CGF 90 não sofreram nenhum procedimento cirúrgico ou protocolo de eletroestimulação, os animais do grupo CGI foram eutanasiados com 80 dias, os dos grupos CGF 45 e CGF 90 foram eutanasiados, respectivamente, afinal da aplicação do protocolo de eletroestimulação, com 45 e 90 dias.

Nos grupos (GNLT 45 e 90), apresentando 08 animais cada, o nervo fibular foi seccionado e seu coto proximal encurvado medialmente 100 graus, sendo sepultado à musculatura adjacente, 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 não receberam os protocolos de eletroestimulação (figura 3).

Figura 3 - Procedimento cirúrgico realizado nos Grupos GNLT 45 e GNLT 90



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 (figura 4).

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, sendo sepultdo à musculatura adjacente, 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 (figura 5).

Figura 4 - Procedimento cirúrgico dos grupos desnervado GD45 e GD 90.

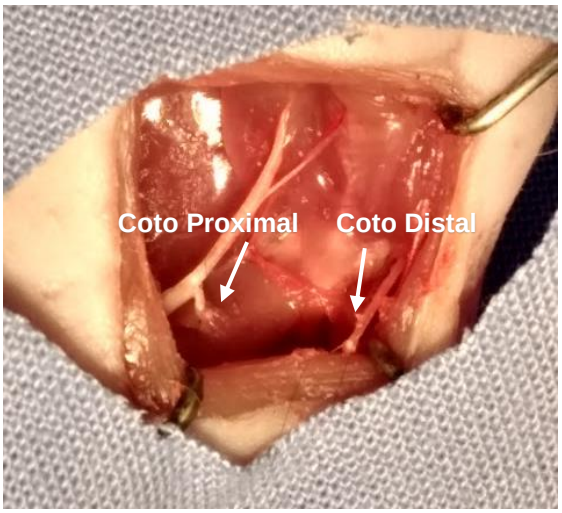
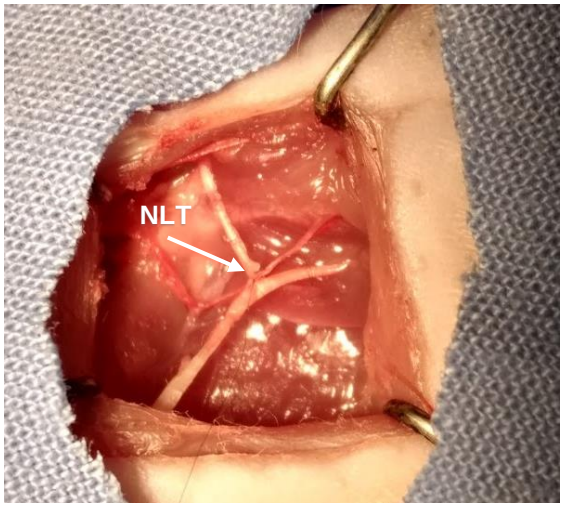


Figura 5 - Processo cirúrgico da neurorrafia latero-terminal (NLT) dos grupos eletro estimulados (GEA 45, GEA 90, GER 45 e GER 90).



Procedimento cirúrgico

Para cada procedimento cirúrgico, os animais foram anestesiados com ketamina (80mg/Kg) e xilazina (30mg/Kg) intraperitoneal .

No pós-operatório os animais foram observados quanto à dor, considerando os seguintes sinais: vocalização, piloereção, postura encurvada, hipotermia, descarga ocular, ato de lamber-se, maior agressividade, relutância em interagir, alteração no consumo de água e ração e por último, a perda de massa. A

analgesia pós-operatória foi feita com acetominofenol (paracetamol) 2 mg/mL de água, na água do bebedouro a cada 4 horas na água oferecida. A medicação foi usada até não haver mais sinais de dor.

A face dorso-lateral do membro pélvico direito, marcado adequadamente, sofreu 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 ± 2ºC), ciclo claro-escuro de 12 horas, com ração e água *ad libitum*, até o momento da eutanásia.

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 alternância nos dias de aplicação das correntes, segundas, quartas e sextas no período vespertino, 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, para fibras musculares tipo I, e 100 Hz, para fibras musculares tipo II, com duração do pulso de 2 ms, tempo de contração de 10 segundos por 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 mA. Foi utilizado estimulador elétrico Neurodyn® 4 canais da empresa Ibramed.

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 alternância nos dias de aplicação das correntes, segundas,

quartas e sextas no período vespertino, 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 para estimular fibras musculares Tipo I, e 100 Hz para estimular fibras musculares Tipo II, com duração de burst de 4 ms, tempo de contração de 10 segundos por 20 segundos de relaxamento, durante 10 minutos cada modulação. A corrente inicial foi aquela suficiente para promover a contração muscular, sendo padronizada em 40 mA. Foi utilizado estimulador elétrico Endophasys® da empresa KLD.

Os animais foram estimulados acordados e sem anestesia. Para isto foi utilizada uma cápsula metálica com abertura posterior para a cauda e duas aberturas laterais para fixação dos membros posteriores. Após esta imobilização, os eletrodos de um centímetro quadrado de área foram fixados sobre o ventre do respectivo músculo. Para aplicação da estimulação elétrica foram utilizados eletrodos autoadesivos.

Análise da marcha – "CatWalk®" – intensidade máxima de contato

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 encontra-se monitorizada com uma câmara de vídeo colocada sob si e conectada a um computador equipado com um programa de aquisição de imagem.[22]

Utilizando o CatWalk® realizou-se o estudo das pegadas e 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 três, 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 da pata em contato com a plataforma e aumenta com a pressão aplicada pela pata.[23]

Para o teste de força de contração máxima, o tendão distal do músculo tibial cranial foi seccionado na sua inserção. Um fio de náilon 4.0 foi suturado nesse tendão e a outra extremidade foi amarrada a um pequeno gancho ligado a um transdutor de força FT03 (Grass Technologies), para a coleta dos dados.

O comprimento do músculo foi mantido por um pré-tensionamento com carga de 0,18N e foi reajustado entre os testes. Este valor de pré-tensionamento foi determinado durante a calibração do dispositivo. Um estimulador elétrico Neurodyn de 10 canais da (Ibramed) foi posicionado diretamente no músculo exposto. O ensaio de contração muscular consistiu de três aplicações sequenciais de 1s. Um computador registrou os picos de força. A tensão muscular foi reajustada entre as medições. O teste de contração tetânica, foi realizado com 100mA e frequência de 100Hz.

Processamento histológico, análise morfométrica e cálculo da percentagem de tecido conjuntivo

Após a realização dos procedimentos cirúrgicos, os animais receberam dose letal de pentobarbital sódico, administrado intraperitonealmente.

Os músculos foram retirados e fixados por imersão em paraformaldeído 4% tamponado (PBS 0,1 M, pH 7,0), por 24 horas, e processado rotineiramente para inclusão em parafina.

Foram realizados cortes seriados de 5µm de espessura, obtidos a partir dos blocos de parafina e distendidos em lâminas de vidro. As lâminas foram codificadas e o código revelado somente após a obtenção dos dados quantitativos para garantir uma análise sem tendenciosidade.

Após hidratação, as lâminas foram coradas pela Hematoxilina-eosina (HE) para estudo morfométrico, segundo rotina de coloração. As imagens digitalizadas e salvas foram analisadas por meio de medidas de área, diâmetro mínimo das fibras

musculares. As medidas foram feitas de modo semiautomático, utilizando-se software Image Pro Plus 6.0. Foram registradas 5 fotos de campos diferentes de cada animal, na objetiva de 20x, para análise morfométrica das fibras musculares, foram aferidas aleatoriamente uma média de 220 fibras por animal, seguindo um sentido horizontal na lamina histológica da esquerda para a direita, e voltando pela fileira inferior no sentido contrário, até ser atingido o valor média de 220 fibras, descartando as fibras que não apareciam completas na imagem fragmentadas.

Com o uso da coloração de tricômico de Masson foi realizada uma foto da área de secção transversal total do músculo com objetiva de 2x, para aferição de sua área total e em seguida foi capturada fotos com a objetiva de 20x , também da área total do músculo com o objetivo de aproximar detalhes da coloração, para que o programa Image Pro-Plus® 6.2 (Media Cybernetics, Bethesda, MD, USA) reconhecesse com mais fidelidade o Azul de Anilina, responsável pela marcação do tecido conjuntivo nesta técnica. Após as aferições, foi realizado o cálculo para obtenção da percentagem de tecido conjuntivo existente no músculo.

Análise estatística

A análise estatística foi efetuada por meio do software Graphpad Prism 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 ± desvio padrão). O nível de significância considerado foi de 5%.

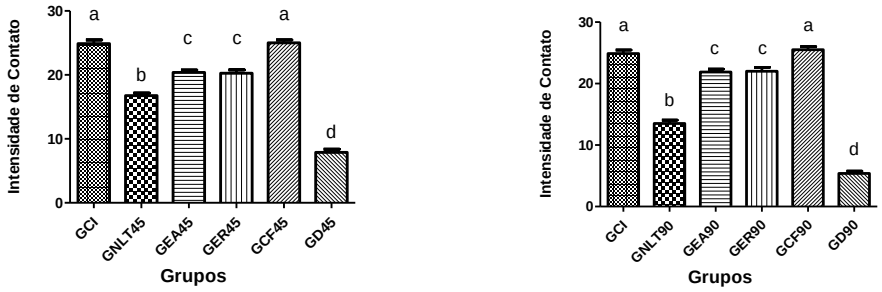
Resultados

As figuras apresentadas a seguir mostram os resultados de todos os grupos controles e experimentais (45 e 90 dias) em gráficos, médias e desvio padrão, respectivamente, dos seguintes parâmetros analisados: avaliação da marcha (intensidade máxima de contato), massa (inicial e final), teste de força de contração máxima muscular, morfometria das fibras musculares (área e diâmetro menor) e comparação dos resultados de todos os parâmetros entre os grupos 45 e 90 dias.

Intensidade máxima de contato

A Figura 6, apresentam os resultados da intensidade de contato obtidos na avaliação da marcha para o grupo 45 e 90 dias. Para os animais avaliados após 45 dias de eletroestimulação os grupos controle inicial e final apresentaram resultados superiores aos demais grupos, os grupos GNLT45, GEA45 e GER45 foram estatisticamente semelhantes entre si e superiores ao grupo desnervado. Após 90 dias de estimulação observa-se que os grupos controle inicial e final apresentaram resultados superiores aos demais grupos, os grupos GEA90 e GER90 foram estatisticamente semelhantes entre si e superiores aos GNLT 90 e GD90.

Figura 6 - Comparação da intensidade máxima de contato dos animais após 45 e 90 dias de aplicação das correntes, dos grupos GCI, GNLT, GEA, GER, GCF e GD. Letras diferentes entre si indicam diferenças estatisticamente significativas (p≤ 0,05).



A análise comparativa, observada na Tabela 1, da intensidade máxima de contato da avaliação da marcha, mostrou que o valor apresentado pelos grupos eletroestimulados 90 dias foi superior ao grupo 45 dias.

Tabela 1 – Valores da intensidade máxima de contato, na avaliação da marcha, entre os grupos 45 e 90 dias, média e desvio padrão. Letras diferentes entre si indicam diferenças estatisticamente significativas (p≤ 0,05).

GRUPOS	MÉDIA	DP
GNLT45	16,75[a]	± 1,16
GNLT90	13,50[b]	± 1,60
GEA45	20,38[c]	± 1,06
GER45	20,25[c]	± 1,49
GEA90	21,88[d]	± 1,36
GER90	22,00[d]	± 1,77

Massa corporal

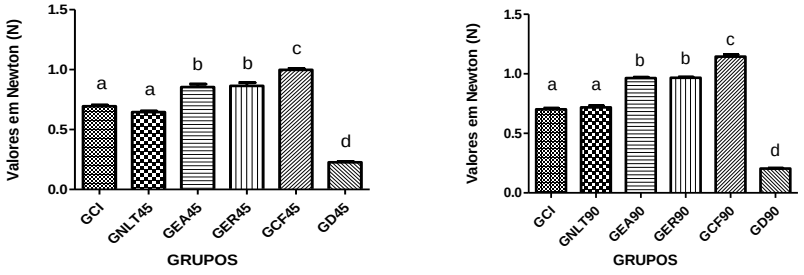
As massas foram comparadas entre os grupos, observou-se que houve uma homogeneidade entre os valores da massa entre os animais do mesmo grupo, com 45 e 90.

Força de contração máxima do MTC

A Figura 7 apresenta a força de contração máxima do MTC entre os grupos quando estimulados com frequência de 100 Hz. O GCF45 apresentou maior valor de força de contração em relação aos demais grupos, os grupos GEA45 e GER45 não apresentaram diferença significativa entre si, mas apresentaram valores significativamente maiores que os grupos (GCI = GNLT45) > GD45.

Observa-se que o grupo GCF90 apresenta o melhor resultado referente ao teste de força de contração, sendo maior que os grupos eletroestimulados GEA90 e GER90 , os quais não apresentam diferença significativa entre si mas mostram resultados superiores aos grupos CGI, GNLT90 e GD90.

Figura 7 - Comparação da força de contração máxima do MTC (expressa em Newton) dos grupos GCI, GNLT, GEA, GER, GCF e GD, 45 e 90 dias. Letras diferentes entre si indicam diferenças estatisticamente significativas (p≤ 0,05).



Os resultados da comparação, quanto à resposta de força contrátil (N) do músculo tibial cranial após estímulo no músculo e no nervo fibular, entre os grupos eletroestimulados 45 e 90 dias são observados na Tabela 2. Observa-se que não existe diferença significativa entre Grupos, GEA45 = GER45 e GEA90 = GER90,

contudo em relação ao tempo de eletroestimulação nos grupos eletroestimulados 90 dias os valores são significativamente maiores que os dos grupos 45 dias.

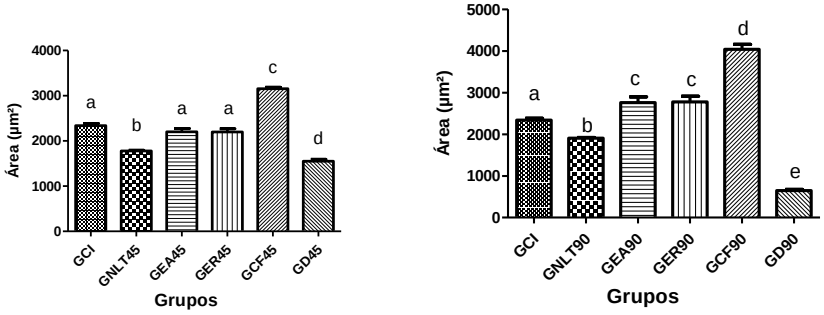
Tabela 2 - Comparação da força de contração máxima do MTC (expressa em Newton) entre os grupos experimentais 45 e 90 dias, média e desvio padrão. Letras diferentes entre si indicam diferenças estatisticamente significativas (p≤ 0,05).

GRUPOS	MÉDIA	DP
GCI	0,69[a]	± 0,03
GNLT90	0,72[a]	± 0,03
GEA90	0,96[b]	± 0,02
GER90	0,97[b]	± 0,01
GCF90	1,14[c]	± 0,05
GD90	0,20[d]	± 0,01

Quanto à área das fibras musculares do músculo tibial cranial dos animais eletroestimulados por 45 dias, pode-se observar na figura 8 e, que o grupo GCF45 apresenta melhor resultado que os demais grupos. Não existe diferença significativa entre os grupos GCI, GEA45 E GER45, que apresentaram valores maiores que os grupos GNLT45 e GD45.

Os valores referentes à área das fibras musculares do músculo tibial cranial, dos animais eletroestimulados 90 dias. O grupo GCF90 apresenta melhor resultado que os demais grupos. Não existe diferença significativa entre os grupos GCI, GEA90 E GER90, que apresentaram valores maiores que os grupos GNLT90 e GD90.

Figura 8 - Gráfico do diâmetro menor das fibras musculares dos animais, expressa em µm, após 45 e 90 dias de aplicação das correntes, dos grupos GCI, GNLT, GEA, GER, GCF e GD, 45 e 90 dias. Letras diferentes entre si indicam diferenças estatisticamente significativas (p≤ 0,05).



Os resultados da comparação referente à morfometria, área, entre os grupos eletroestimulados 45 e 90 dias são observados na tabela 3. Observa-se que

não existe diferença significativa entre os Grupos GEA45 = GER45 e GEA90 = GER90, mas em relação ao tempo de eletroestimulação, os grupos eletroestimulados por 90 dias apresentam valores maiores significativamente que os grupos 45 dias. E os dois grupos apresentam valores maiores que os grupos GNLT 45 e 90.

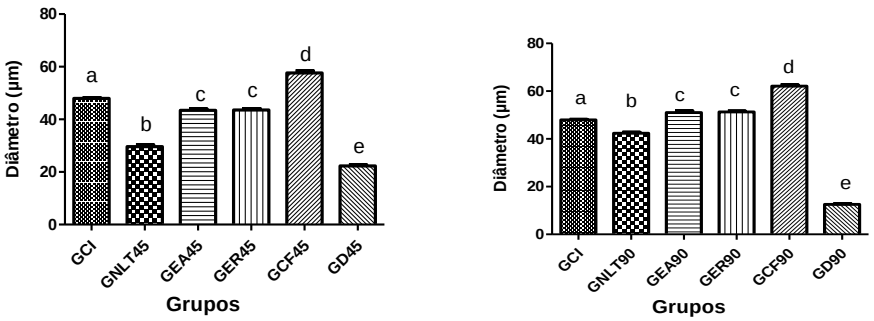
Tabela 3 - Valores da comparação da área das fibras musculares dos animais expressa em μm^2, entre os grupos 45 e 90 dias, média e desvio padrão. Letras diferentes entre si indicam diferenças estatisticamente significativas (p≤ 0,05).

GRUPOS	MÉDIA	DP
GNLT45	1778,27[a]	± 56,87
GNLT90	1904,67[a]	± 95,98
GEA45	2202,64[b]	± 239,06
GER45	2198,91[b]	± 233,47
GEA90	2759,94[c]	±589,75
GER90	2777,28[c]	± 590,36

A figura 9, a seguir, mostram os resultados referentes à morfometria, diâmetro menor, expressa em das fibras musculares do músculo tibial cranial, dos animais eletroestimulados 45 dias. Observa-se que o grupo GCF45 apresenta o melhor resultado, sendo maior que os demais grupos e não existindo diferença significativa entre os grupos GEA45 E GER45 e que estes apresentaram valores maiores que os grupos GNLT45 e GD45.

Os resultados referentes à morfometria, diâmetro menor, das fibras musculares do músculo tibial cranial dos animais eletroestimulados 90 dias indica que o grupo GCF90 apresenta o melhor resultado, sendo maior que os demais grupos e não existindo diferença significativa entre os grupos GEA90 E GER90, que apresentaram valores maiores que os grupos CGI, GNLT90 e GD90.

Figura 9 - Gráfico do diâmetro menor das fibras musculares dos animais, expressa em µm, após 45 e 90 dias de aplicação das correntes, dos grupos GCI, GNLT, GEA, GER, GCF e GD, 45 e 90 dias. Letras diferentes entre si indicam diferenças estatisticamente significativas (p≤ 0,05).



Observa-se, na tabela 4, que não existe diferença significativa entre os Grupos GEA45 = GER45 e GEA90 = GER90, referente à morfometria, diâmetro menor, mas em relação ao tempo de eletroestimulação, os grupos eletroestimulados por 90 dias apresentam valores maiores significativamente que os grupos 45 dias. E os dois grupos apresentam valores maiores que os grupos GNLT 45 e 90.

Tabela 4 - Valores da comparação da área das fibras musculares dos animais expressa em μm^2, entre os grupos 45 e 90 dias, média e desvio padrão. Letras diferentes entre si indicam diferenças estatisticamente significativas ($p \leq 0,05$).

GRUPOS	MÉDIA	DP
GNLT45	1778,27[a]	± 56,87
GNLT90	1904,67[a]	± 95,98
GEA45	2202,64[b]	± 239,06
GER45	2198,91[b]	± 233,47
GEA90	2759,94[c]	±589,75
GER90	2777,28[c]	± 590,36

A figura 10, mostra os resultados referentes à percentagem de tecido conjuntivo, em corte transversal do músculo tibial cranial, dos animais eletroestimulados 45 dias. Observa-se que o grupo GD45 apresenta percentagem de tecido conjuntivo em suas fibras musculares maior que todos os demais grupos, não existindo diferença significativa entre os grupos CGI, GNLT45, GEA45 e CGF45, os grupos GEA45 e GER45.

O grupo GD 90 apresenta valores da percentagem de tecido conjuntivo maior, significativamente, do que todos os demais grupos, os quais não apresentam diferença significativa entre si.

Na tabela 5, observa-se a análise comparativa da percentagem de tecido conjuntivo entre os grupos eletroestimulados por 45 e 90 dias. Não existe diferença significativa dos resultados da percentagem de tecido conjuntivo entre todos os grupos.

Figura 10 - Gráfico da percentagem de tecido conjuntivo das fibras musculares dos animais, expressa em %, após 45 e 90 dias de aplicação das correntes, dos grupos GCI, GNLT, GEA, GER, GCF e GD, 45 e 90 dias. Letras diferentes entre si indicam diferenças estatisticamente significativas (p≤ 0,05).

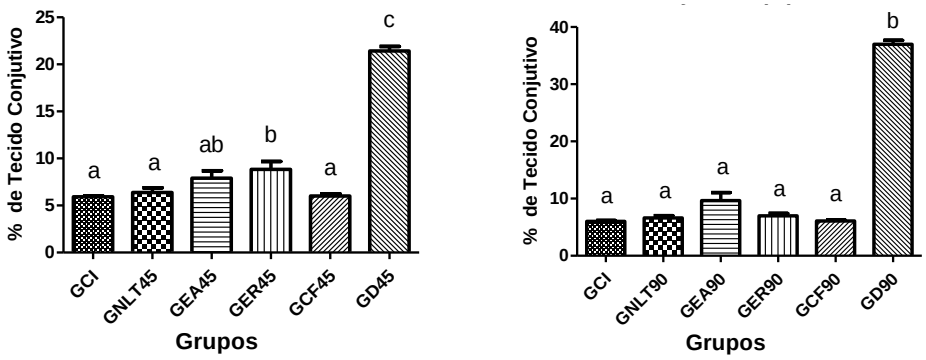


Tabela 5 - Valores da percentagem de tecido conjuntivo das fibras musculares dos animais, expressa em %, entre os grupos 45 e 90 dias, média e desvio padrão. Letras diferentes entre si indicam diferenças estatisticamente significativas (p≤ 0,05).

GRUPOS	MÉDIA	DP
GNLT45	6,38[a]	± 1,78
GNLT90	6,62[a]	± 1,30
GEA45	7,92[a]	± 2,23
GER45	8,84[a]	± 2,22
GEA90	9,66[a]	± 0,54
GER90	7,00[a]	± 2,87

Discussão

Modelo animal

Nesse estudo, foi utilizado o animal (*Rattus norvegicus*) da linhagem *Wistar* por sere de fácil obtenção, manipulação e manutenção, sendo o modelo mais utilizado para estudos de regeneração nervosa e reparo nervoso periférico por apresentarem semelhança de estruturas e de degeneração nervosa com o ser humano. [24,25,26,27]

Foram escolhidos animais do gênero masculino por apresentarem menor variação hormonal do que as fêmeas. Outros estudos já comprovaram que tal variação pode influenciar na regeneração nervosa através de efeitos neurotróficos.[28] Além do sexo masculino, é indicado também o uso de animais jovens, pois animais com idade mais avançada apresentam retardo do reparo nervoso periférico.[29]

Autofagia

Alguns autores relatam autofagia[30,31], os animais que apresentaram autofagia foram submetidos à secção do nervo isquiático, o qual é responsável pela inervação total da pata e possui outras estruturas que são diretamente ligadas a ele, como o nervo sural responsável pela inervação sensitiva dorso-lateral e consequente autofagia. Já neste estudo, nenhum animal foi detectado com autofagia devido ao fato que o nervo lesionado era o nervo tibial cranial.

Cirurgia

O modelo experimental utilizado neste trabalho foi o proposto por Viterbo[4] para estudos de neurorrafia término-lateral. Os nervos fibular comum e tibial são de fácil acesso, apresentam-se anatomicamente próximos e inervam músculos distintos. O músculo tibial cranial, inervado apenas pelo nervo fibular comum, também é de fácil acesso, superficial, palpável e não sofre a atuação de inervações secundárias.

A cirurgia de NLT foi realizada sem retirada de janela epineural, assim as fibras regeneradas após a NLT conseguiriam absorver e transpor as três camadas de tecido conjuntivo da fibra nervosa (endoneuro, perineuro e epineuro), em nervos com diâmetro inferior a 1,5 mm. [5, 32, 33]

É necessário que, nesses casos de cirurgia em animais sejam, utilizados anestésicos que atuem tanto como sedativo e também como relaxante muscular, que é responsável pela vasoconstrição, fazendo com que a cirurgia não cause intensos sangramentos no animal. Um sangramento intenso pode causar risco de morte em animais de pequeno porte. Portanto, esse estudo utilizou o cloridrato de xilazina e de ketamina que cumpre essas restrições.

Protocolo de eletroestimulação

As lesões nervosas periféricas levam à desnervação do músculo, os quais sofrem atrofia rapidamente. Vários recursos fisioterapêuticos podem ser empregados: cinesioterapia passiva e ativa, reeducação neuromuscular e eletroterapia, os quais podem auxiliar na recuperação funcional após a reinervação.[34] A atrofia atua como uma barreira ao crescimento axonal durante a reinervação muscular, já que impedir

essa atrofia e propiciar a recuperação são alguns dos objetivos da eletroestimulação. Quanto ao resultado, este depende do protocolo de intervenção.[35]

A revisão sistemática sobre o efeito da eletroestimulação no músculo desnervado de ratos elaborada por Cavalcante et al.[35], encontrou nove artigos sobre o tema no período entre 1990 a 2010. Entre os tipos mais utilizados de correntes estão a exponencial (33,3%) e a bipolar (33,3%). A frequência das sessões variou desde diariamente até a cada 48 horas. E o período de intervenção foi de seis dias até sete meses.

Outros autores[36] utilizaram a estimulação elétrica com corrente elétrica contínua, na frequência de 50 hertz, com duração de 0,5ms e intensidade de 3 volts, diariamente, durante 60 dias, por sete minutos, sobre o músculo tibial cranial direito de ratos após lesão do nervo fibular comum.

Utilizando corrente de alta voltagem, pesquisadores[37] após lesão do nervo ciático, eltroestimularam ratos sob anestesia, realizando estimulação catódica sobre a cicatriz, durante 30 minutos (100 Hz, tensão mínima de 100 V, 20 μs e intervalo interpulso de 100 μs), 5 dias por semana, durante 21 dias.

Neste trabalho, o diferencial foi o emprego de correntes de média frequência entre dois tipos Aussie e Russa, a frequência foi três vezes por semana, por dois períodos diferentes, 45 e 90 dias.

Avaliação funcional da marcha – intensidade máxima de contato da pegada

A avaliação da marcha foi desenvolvida por De Medinacelli et al.[38], que utilizavam um método quantitativo para avaliação do Índice Funcional do Isquiático. Em seguida, Bain et al.[39] aperfeiçoaram o método de De Medinacelli e desenvolveram específicas avaliações para o nervo fibular comum e nervo tibial. Fez também com que a distância entre as pegadas não fosse levada em consideração devido à velocidade da pegada.

Para a captura das pegadas do animal, utilizou-se um método semelhante ao de Varejão et al. [40] que possui uma câmera acoplada sob uma plataforma de vidro transparente para que os animais caminhem sobre ela e uma canaleta que os guia pelo percurso. Possui também um controle de velocidade que estabelece o tempo no

qual os animais devem cumprir o percurso para a aquisição de dados e é automatizada. Se o animal anda mais rápido que o estabelecido para a sua caminhada, os dados não são considerados . Esse método substituiu o de De Medinacelli et al.[38], que utilizavam filmes radiográficos ou a pintura da pata dos animais, pois o mesmo apresentava variações que causavam interferências no resultado.

A grande maioria dos estudos em lesões nervosas periféricas empregam os métodos histomorfométricos e eletrofisiológicos na análise dos tecidos nervosos e musculares para comparação dos grupos, mas é importante avaliar a recuperação da função motora. Esta avaliação pode ser realizada pelo “CatWalk®”, que permite avaliar parâmetros dinâmicos além dos parâmetros estáticos em modelos de neurotmese por meio de dados apresentados de forma menos trabalhosa. [41, 42]

Os resultados funcionais são imprescindíveis em um estudo da regeneração nervosa periférica, já que a volta da função normal é o objetivo máximo desta linha pesquisa.

Em um estudo semelhante, no qual os animais foram divididos em grupo controle, grupo desnervado, grupo neurorrafia látero-terminal e neurorrafia látero-terminal mais estimulação elétrica, também observaram uma grande melhora funcional no grupo que utilizou a eletroestimulação, nos dois períodos de avaliação da marcha, 30 e 180 dias. Com 30 dias após o início do experimento o grupo controle apresentou melhor resultado na avaliação da marcha, sendo que os demais apresentaram resultado avaliativo semelhante entre si. E com 180 dias de pós-operatório, o grupo que sofreu neurorrafia e estimulação elétrica foi o único a se igualar ao grupo Controle com uma melhora de 60,5%, enquanto o grupo que sofreu somente neurorrafia melhorou 9,5%.[33]

Análise histomorfométrica e funcional foram empregadas em um estudo para avaliar a influência do exercício físico em esteira, aplicado nas fases imediata e tardia da regeneração do nervo isquiático de ratos, após axoniotmese. Os animais foram divididos nos grupos: controle (CON); desnervado (D); desnervado+exercício+gaiola (DEG), o qual iniciou o exercício após 24 horas da cirurgia e desnervado+gaiola+exercício (DGE), que iniciou no 14º dia. Foi observado que todos os grupos, no período pré-operatório, mostraram avaliação da marcha normal entre -16,18 e -6,44. No 7º e 14º dias PO, os valores refletiram expressiva

perda funcional, com valores entre -92,840 e -64,93; enquanto entre o 21º e 28º dias PO esses valores mostraram recuperação funcional na avaliação da marcha, entre -20,20 e -9,91, do índice funcional do ciático (IFC)[43].

Os efeitos da tensão no sítio da sutura após secção do nervo ciático na recuperação funcional após neurorrafia, foi estudado em outra pesquisa para avaliar a marcha de três grupos experimentais: neurorrafia término-terminal, sem tensão, neurorrafia realizada sob tensão e no terceiro grupo, com enxerto de nervo entre os cotos proximal e distal do nervo seccionado. O resultado da avaliação da marcha evidenciou melhor recuperação no grupo submetido à neurorrafia término-terminal sem tensão, quando comparado com o grupo do enxerto. O grupo submetido à tensão apresentou a menor recuperação funcional.[44]

Um estudo experimental com células tronco em ratos, avaliou a intensidade máxima da pegada completa. Seus grupos experimentais 3 a 7 não diferiram estatisticamente entre si. Os valores dos resultados apresentados pelos animais dos grupos: 3 (somente neurorrafia) foi de 80,65; 4 (preenchimento com fascia) foi de 82,31; 5 (Gel de Plaqueta), 87,96 e 7 (célula tronco) foi de: 94,79; resultados estes estatisticamente semelhantes ao grupo 2 (desnervado) e inferior ao do grupo 1 (controle) 103,37. O grupo 6 (gel+fascia) apresentou resultado estatisticamente superior (96,90) ao do grupo 2 (desnervado), 73,27; e, estatisticamente semelhante ao do grupo 1.[45]

Neste trabalho, os animais eletroestimulados tanto com a corrente russa como com a aussie, apontaram que entre grupos de mesmo período de eletroestimulação não houve diferença significativa na avaliação da intensidade de pegada durante a avaliação da marcha (GEA45: 20,38; GER45: 20,25 de intensidade de contato); (GEA90: 21,88; GER90: 22,00 de intensidade de contato). Porém, entre os grupos com períodos diferentes de tempos de eletroestimulação, 45 e 90 dias, ocorreu uma influência positiva no período maior, o grupo 90, com média de 21,94 de intensidade de contato. Vale ressaltar também que os dois grupos eletroestimulados, 45 e 90, apresentaram resultados superiores aos grupos que sofreram apenas o processo cirúrgico (GNLT45 e GNLT90).

Portanto, neste trabalho, os resultados são semelhantes aos demais citados, em que os grupos que sofreram alguma intervenção após o processo cirúrgico apresentaram resultados superiores aos que não sofreram e aos grupos desnervados.

Teste de força de contração máxima do MTC

Foram seguidos os padrões de Isaacs et al.[46], para realização do teste de força máxima. Algumas adaptações foram feitas para haver adequação ao estudo. Eles realizaram o estímulo elétrico no nervo e não no músculo, como nesta pesquisa, porque queriam comprovar a passagem do estímulo pela NTL, pois não realizaram testes eletrofisiológicos da condução nervosa.

Em outros estudos[47, 48] foi empregado também o estímulo elétrico no nervo e não no músculo do animal, estimulando o nervo fibular comum intacto para provocar contração do MTC de ratos para verificar o processo de fadiga muscular.

Em pesquisa com ratos foi realizada neurorrafia látero-terminal, usaram o nervo fibular comum como receptor e o nervo tibial como doador, tendo o músculo gastrocnêmio como músculo-alvo. Os autores realizaram teste de força nos grupos experimentais e observaram força de contração do músculo gastrocnêmio no grupo experimental menor que no grupo controle.[49]

Em outras pesquisas,[45, 46, 50] o teste de força foi realizado apenas com estímulo no nervo, permitindo observar a passagem da corrente pela neurorrafia, possibilitando avaliar a força de contração independente da neurorrafia, determinando a reinervação e conservação de fibras musculares que permitiram a contração.

Resultados do teste de força de contração máxima do musculo em estudo experimental com células tronco em ratos após neurorrafia, quando o estímulo foi realizado no músculo tibial cranial apresentou os seguintes resultados: os grupos 3 (somente neurorrafia) 0,96N, 5 (Gel de Plaqueta) 0,90N, 6 (gel+fascia) e 7 (célula tronco) 1,08N - não apresentaram diferença estatística do grupo 1(controle) 0,96N. Os grupos 2 (desnervado) 0,60 e 4 (preenchimento com fáscia), 1,24N, foram estatisticamente diferentes de todos os outros. O grupo 2 possui a menor média (desnervado) e o grupo 4 a maior média.[45]

Nesta pesquisa, a escolha por estimular o músculo diretamente foi em função de alcançar a força de contração máxima do MTC dos animais, pois o grupo GD45 e GD90 foram desnervados e não seria possível obter resultados para comparação, entre todos os grupos, durante o teste de força máxima de contração do MTC.

Os grupos eletroestimulados GEA45, GER45, GEA90 e GER90 apresentaram resultados superiores ao grupo que somente realizou a neurorrafia, resultado semelhante ao encontrado por Maciel et al.[33] que sugerem que parte do efeito do treinamento realizado por EE pode estar na facilitação neural em função de um número maior de unidades motoras ativas e aumento na taxa de impulsos, ou um padrão mais eficiente de recrutamento, provavelmente devido a uma modificação do mecanismo de gradação de força, propiciando melhora da somação de estímulos nervosos. Em termos práticos, o músculo treinado com EE aprende a contrair com mais eficiência.

Observa-se, assim, a importância do teste de força como parâmetro de comparação entre modelos experimentais para estudos em reinervação periférica.

Análise histológica e morfométrica do músculo tibial cranial

Foi feita a opção por realizar a análise histológica com a determinação da área de secção transversa e não pesagem da massa do músculo, a qual reflete indiretamente o trofismo das fibras, visto que é influenciada por outros fatores, como a proliferação do tecido conjuntivo, mascarando assim a atrofia e, consequentemente, a análise histológica. A morfometria, por sua vez, é mais confiável para avaliação do trofismo muscular.[35]

Foi utilizada a coloração com HE, pois esta técnica evidencia bem a fibra muscular, o que é importante para a realização da morfometria.

Dentre os parâmetros morfométricos, foram analisados área e diâmetro menor das fibras musculares. A medida de diâmetro menor é mais confiável que a medida da área ou de diâmetro máximo, pois esta não sofre alteração devido à inclinação da navalha durante o corte histológico, nem tampouco sofre alterações durante o preparo histoquímico.[36, 51]

Utilizando o mesmo parâmetro de avaliação, outro estudo sobre a interferência da eletroestimulação em nervo periférico relacionados, ao músculo tibial cranial, concluíram que a análise desses parâmetros (Área e Diâmetro) não mostra diferença para os grupos experimentais entre si, grupo com lesão no nervo (17A-182,44,D-55,52), lesão mais eletroestimulação diária (A-177,56,D-51,83), lesão mais

eletroestimulação três vezes por semana (A-203,86, D-58,10), mas apresentaram diferença em relação ao grupo desnervado (A-99,60, D-29,51).[36]

Pesquisadores concluiram em seu trabalho[33] que o grupo que recebeu eletroestimulação (2901,2 μm² área, 49,35 μm diâmetro) apresentou resultado estatisticamente superior ao grupo cirúrgico que não a recebeu (2129,28 μm², 40,88 μm) e ao desnervado (672,99 μm², 22,67 μm) como neste trabalho, mostrando que a eletroestimulação foi eficiente e houve diferença significativa entre os grupos experimentais.

Em outra pesquisa[45], os autores observaram que os resultados referentes ao diâmetro menor das fibras musculares do músculo tibial cranial do lado direito em μm, para os grupos experimentais: somente com neurorrafia (41,32), preenchimento com fascia (42,01), Gel de Plaqueta (41,57), gel+fascia (41,40) e célula tronco (42,15) não mostraram diferença estatística entre si. Todos os grupos mostraram resultados estatisticamente superiores ao resultado observado no grupo desnervado (23,44) e inferiores ao resultado mostrado pelo grupo controle da normalidade (46,91). Quanto aos resultados média da área (μm2) das fibras musculares do músculo tibial cranial à direita, observaram que o resultado foi estatisticamente maior no controle de normalidade (3275,48), quando comparado aos grupos experimentais de neurorrafia (2547,94), preenchimento com fascia (2702,79), Gel de Plaqueta (2634,43), gel+fascia (2559,75) e célula tronco (2675,17). Os grupos experimentais mostraram valores de área que diferiram entre si e que foram estatisticamente superior ao observado no grupo desnervado (870,48).

Nesta pesquisa quando observados os valores da área e diâmetro menor da fibra muscular, notou-se que o grupo GCF90, grupo controle final que não sofreu nenhuma intervenção, apresentou um resultado superior aos demais grupos.

É observado neste trabalho que tanto os resultados das médias dos valores da área das fibras do MTC dos grupos eletroestimulados, GEA45 (2202,64μm^2), GER45 (2198,91μm^2), GEA90 (2759,94μm^2) e GER90 (2777,28 μm^2), sempre foram maiores que dos grupos controle cirúrgico GNLT45 (1778,27μm^2) e GNLT 90 (1904,67μm^2), repetindo a mesma relação de resultado em relação ao de diâmetro menor, GEA45 (44,14μm), GER45 (43,71μm), GEA90 (51,06μm) e GER90 (51,31μm), mantendo-se maiores que dos grupos controle cirúrgico GNLT45 (30,43μm) e GNLT 90 (42,38μm). Isso demonstra que o efeito da EE foi positivo para o MTC após a

neurorafia término-lateral, pois existe uma relação direta entre a secção transversal da fibra muscular com a força que um músculo pode produzir.[52]

Os dois grupos eletroestimulados GEA45, GER45 e GEA90 e GER90, apresentaram diferença significativa em relação aos grupos controles cirúrgicos GNLT45 e GNLT90 nas análises do parâmetros morfométricos do MTC, área e diâmetro menor da fibra muscular, existindo uma relação direta na melhora das características morfológicas com o aumento do período de eletroestimulação.

Densidade de tecido conjuntivo

O aumento da percentagem de tecido conjuntivo, principalmente no perimísio e no endomísio das fibras musculares é a alteração mais característica. Autores afirmam que essas alterações interferem na microcirculação sanguínea das fibras musculares, na recuperação funcional e na interação neuromuscular após a reinervação do músculo.[53] O valor de normalidade da percentagem de tecido conjuntivo em músculos sadios gira em torno de 1 a 10%.[54, 55]

O tecido conjuntivo em excesso, no músculo em regeneração, pode acarretar resultados funcionais ruins. Neste trabalho, a densidade do tecido conjuntivo na grande maioria dos grupos reinervados, apresentou percentagem acima do normal e na avaliação funcional, resultados ruins também foram vistos.[54]

A estimulação elétrica foi utilizada em pesquisa após desnervação do isquiático em ratos, observando a variação da percentagem do tecido conjuntivo no músculo sóleo. Os resultados obtidos de densidade de área do tecido conjuntivo foram significativamente menor no grupo desnervado mais estimulação elétrica (16,61%) em relação ao desnervado (34,49%), sendo que ambos os grupos apresentaram valores maiores que o grupo controle (9,55%).[56]

Pesquisadores avaliaram o efeito da estimulação elétrica (EE) na área das fibras e densidade do tecido conjuntivo do músculo sóleo de ratos submetidos à imobilização de tornozelo durante 3 dias. Seus animais foram divididos em 3 grupos: controle, imobilizado por 3 dias e imobilizado associado à EE por 3 dias. Os resultados encontrados de percentagem de TC foram: o grupo controle apresentou um valor médio de 8,93%; o grupo que foi imobilizado, 33,93%; e o grupo eletroestimulado

17,86%, observando o efeito positivo do uso da EE na minimização do aumento de tecido conjuntivo em músculos desnervados.[57]

Neste trabalho, com músculo tibial cranial o resultado obtido de densidade de tecido conjuntivo, nos grupos eletroestimulados, esteve entre 1 e 10%, sendo GEA45 (7,92%), GER45 (8,84%), GEA90 (9,66%) e GER90 (97,00%), resultado funcional bom como descrito por outros autores[54], e superior ao apresentado pelo grupo desnervado 45 (21,42%) e 90 (36,98%).

Portanto, a densidade de tecido conjuntivo nos músculos é um fator determinante na recuperação funcional e a sua comparação deve ser feita. Métodos mais sofisticados, os quais mostrem qual tipo de tecido conjuntivo está sendo substituído no músculo reinervado devem ser mais detalhadamente investigados.

Conclusão

Com o modelo experimental utilizado nesta pesquisa, a comparação entre os grupos com períodos de eletroestimulação diferentes, 45 e 90 dias, apontaram que entre grupos de mesmo período de eletroestimulação não houve diferença significativa, mas entre os grupos com períodos diferentes, 45 e 90 dias, ocorreu uma influência positiva no período maior, em todos os parâmetros avaliados. Constatando, assim, que existe uma relação direta na melhora das características morfológicas e funcionais com o aumento do período de eletroestimulação.

Correspondência:

Luís Henrique Simionato, Universidade Sagrado Coração, Rua Irmã Arminda 10-50, Jardim Brasil, Bauru – São Paulo, Brasil – CEP 17011-160, Tel.: (55 14) 21077042, luis.simionato@usc.br

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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

3 Radtke C, Kocsis JD, Vogt PM. Transplantation of olfactory ensheating cells for peripheral nerve regeneration. **Int Rev Neurobiol.** 2009;87:405-15.

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

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

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

7 Viterbo F, Trindade JC, Hoshino K, Mazzoni Neto A. End-to-side neurorraphy with removal of the epineurial sheath: an experimental study in rats. **Plastic and Reconstructive Surgery.** 1994b; 94:1038-47.

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

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

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

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

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

13 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.

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

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

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

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

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

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

20 Delitto A, Rose J. Comparative comfort of three waveforms used in electrically eleciting quadríceps femoris muscle contractions. **Phys Ther** 1986; 66:1704-7.

21 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.

22 Aguiar TMD. **Efeito antinociceptivo do Resveratrol num modelo experimental de osteoartrose.** (Dissertação), Faculdade de medicina, Universidade do Porto, Portugal, 2014.

23 Paiva GR. **Células-tronco na neurorrafia látero-terminal. Estudo experimental em ratos.** (Tese), Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, 2016.

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

25 Ghayemi N, Haghighat 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.**, v. 12, n. 5, p. 457-463, 2014.

26 Kavlak E. et al. Effects of pulsed electromagnetic field and swimming exercise on rats with experimental sciatic nerve injury**. J. Phys. Ther. Sci;** 2014; 26 (9): 1355-1361

27 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.

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

29 Kang H, Lichtman JW. Motor axon regeneration and muscle reinnervation in young and aged animals. **J. Neurosci. 2013;** 33(50):19480- 19491.

30 Dias DV. Tecido adipose a enxerto com tubo de polietileno poroso usados na técnica de tubulização influenciaria na reinervação de músculos de contração lenta e rápida de ratos. (Dissertação), Bauru, Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo; 2011.

31 Rosa-Junior GM. **Enxerto venoso preenchido com gordura no reparo de nervo periférico: Uma nova proposta.** (Dissertação), Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, 2010.

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

33 Maciel FO, Viterbo F, Chinaque LFC, Souza BM. Effect of electrical stimulation of the cranial tibial muscle after end-to-side neurorrhaphy of the peroneal nerve in rats. **Acta Cirúrgica Brasileira**.2013;28:39-47.

34 Gordon T, Sulaiman GAR, Ladak A. Electrical stimulation for improving nerve regeneration: where do we stand?. **International Review of Neurobiology**,2009; 87:433-44.

35 Cavalcante EVV, da Silva LGM, Montenegro EJN, Pontes NT Filho. Efeito da eletroestimulação no músculo desnervado de animais: revisão sistemática. **Fisioter Mov.** 2012 jul/set;25(3):669-78.

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

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

38 De Medinaceli LFW, Wyatt RJ. An index of the functional condition of rat sciatic nerve based an measurements made from walking tracks. **Experimental Neurology.** 1982; 77: 634-43.

39 Bain JR, Mackinnon SE, Hunter DA. Functional evaluation of complete sciatic, peroneal, and posterior tibial nerve lesions in the rat. **Plast Reconst Surg.** 1989; 83(1): 129-36.

40 Varejão AS, Meek MF, Robinson PH, Gramsbergen A. Methods to evaluate functional nerve recovery in adult rats: Walking track analysis, video analysis and withdrawal reflex. **J neurosci methods.** 2001; 96:89-96.

41 Monte-Raso VV, Barbieri CH, Mazzer N. Sciatic functional index in smashing injuries of rats' sciatic nerves. Evaluation of method reproducibility among examiners. **Acta Ortop Bras.** 2006;14(3):133-6.

42 Deumens R; Jaken RJP; Marcus MAE; Joosten EAJ. The CatWalk® gait analysis in assessment of both dynamic and static gait changes after adult rat sciatic nerve resection. **J Neurosci Meth.** 2007;164(1):120-130.

43 Sobral LL, Oliveira LS, Takeda SYM, Somaz MC, Montebelo MIL, Teodori RM. Exercício imediato versus tardio na regeneração do nervo isquiático de ratos após axoniotmese: análise histomorfométrica e funcional. **Rev Bras Fisioter**. 2008; 12(4):311-6.

44 Maeda T, Hori S, Sasaki S, Maruo S. Effects of tension at site of coaptation on recovery of sciatic nerve function after neurorrhaphy: evaluation by walkingtrack measurement. **Microsurgery**. 1999; 19(4):200-7.

45 Paiva GR. **Células-tronco na neurorrafia látero-terminal. Estudo experimental em ratos.** (Tese), Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de Botucatu, 2016.

46 Isaacs J, Allen D, Chen LE, Nunley J. Reverse End-to-Side Neurotization. **Journal of Reconstrutive Microsurgery**. 2005; 21(1):43-48.

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

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

49 Tham SK, Morrison WA. Motor collateral sprouting through an endo-to-side nerve repair. J Hand Surg. 1998; 23A:844-51.

50 Liu K, Chen L, Seaber AV, Goldner RV, Urbaniak JR. Motor Functional and Morphological findings following End-To-Side Neurorrhaphy in the Rat Model. **J Orthop Res.** 1999;17(2):293-300.

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

52 Neto JC, Vasconcelos BC, Sobral AP, da Silva VA Jr, Nogueira RV. Clinical and histopathologic study of the use of gangliosides for nerve regeneration in rats after axonotmesis. **J Oral Maxillofac Surg.** 2007; 65:870-4.

53 Minamoto VB. Efeitos da desnervação no músculo esquelético: uma revisão. **Fisioterapia em Movimento**. 2007; 20(3):63-9.

54 Murphy MM, lawson JA, Mathew SJ, Hutcheson DA, Kardon G. Satellite cells, connective tissue fibroblasts and their interactions are crucial for muscle regeneration. **Development, USA.** 2011; 138(17):3625-37.

55 Nacu E, et al. Connective tissue cells, but not muscle cells, are involved in establishing the proximo-distal outcome of limb regeneration in the axolotl. **Developmen**t, **Alemanha**. 2013; 140(3):513-18.

56 Fernandes KCBG, et al. Análise morfométrica dos tecidos muscular e conjuntivo após desnervação e estimulação elétrica de baixa freqüência . **Rev. bras. fisioter**. 2005; 9(2):235-41.

57 Durigan JLQ, et al. estudo morfométrico do músculo sóleo de ratos submetidos à imobilização aguda associado à estimulação elétrica neuromuscular. **Fisioterapia em Movimento.** 2006; 19(2): 117-26.