

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Lesão do nervo fibular comum. Avaliação neuronal, muscular e funcional após neurotmeese parcial. Estudo no rato”

Adriana Maria Romão

**Botucatu
2011**

ADRIANA MARIA ROMÃO

“Lesão do nervo fibular comum. Avaliação neuronal, muscular e funcional após neurotmeze parcial. Estudo no rato”

“Common fibular nerve injury. Neuromuscular and functional evaluation after partial neurotmesis. Study in rats”

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Bases Gerais da Cirurgia–Área: Reparação, Regeneração e Transplante de Tecidos e de Órgãos da Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP, para obtenção do título de Doutor (a).

Orientador: Prof. Adj. Fausto Viterbo

**Botucatu
2011**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE

Romão, Adriana Maria.

Lesão do nervo fibular comum. Avaliação neuronal, muscular e funcional após neurotmeze parcial : estudo no rato / Adriana Mara Romão. - Botucatu, 2011

Tese (doutorado) - Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2011

Orientador: Fausto Viterbo

Capes: 40102149

1. Nervos Periféricos - Estudos experimentais. 2. Cirurgia experimental.

Palavras-chave: Avaliação morfológica; Lesão nervosa; Músculo tibial cranial; Ratos; Regeneração nervosa; Walking Track Analysis.



Dedicatória

Ao meu querido e eterno professor, amigo, filósofo, ídolo, mestre, mentor e amado PAI – José Romão (in memorian). “Os que ensinam a muitos, um dia no céu, brilharão como estrelas (Profeta Daniel)”.

À minha melhor amiga e mãe querida, D. Munira, que com seu carinho, sua atenção e seu amor incondicional, me deu força e coragem para a realização deste trabalho.



Epígrafe

“É fazendo que se aprende a fazer
aquilo que se deve aprender a fazer”.

Aristóteles



Agradecimento Especial

Ao Professor Drº. Fausto Viterbo,

pelo respeito, profissionalismo, disposição e incentivo com que orientou este estudo.



Agradecimentos

À Minha Querida Irmã Ana Paula,

que mesmo distante sempre esteve presente em todos os momentos.

Aos Meus Sobrinhos e Sobrinhas,

jóias preciosas, sempre ao meu lado, motivações constantes para a realização deste trabalho.

Aos Meus Irmãos Eduardo e Gustavo,

pelo amor e amizade que sempre me dedicaram.

Ao Meu Querido Primo Manoel Henrique Salgado,

pela paciência, atenção e calma que sempre me dedicou.

A Equipe do Laboratório de Pesquisa em Nervos Periféricos e Reinervação

Urogenital do Departamento de Urologia da Faculdade de Medicina de Botucatu,

pela ajuda na obtenção dos dados deste trabalho.

À todos aqueles que mesmo não citados, direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.



Sumário

RESUMO	15
SUMMARY.....	17
1. INTRODUÇÃO.....	19
1.1 Nervos Periféricos.....	20
1.2 Lesão nervosa.....	22
1.3 Regeneração Nervosa.....	24
1.3.1 Plasticidade Neuronal.....	26
1.4 Reparação Nervosa Periférica.....	26
1.5 Análises Quantitativas das Lesões Nervosas Periféricas.....	28
1.5.1 Eletroneuromiografia (ENMG).....	29
1.5.2 Análise morfológica.....	31
1.5.3 Análise Funcional.....	32
1.5.3.1.Walking Track Analysis.....	33
2. OBJETIVO.....	36
3. MÉTODO.....	38
4. RESULTADOS	46
4.1. Massa inicial dos ratos.....	47
4.2. Massa final dos ratos.....	48
4.3. Massa do Músculo Tibial Cranial Direito (MTCd).....	49
4.4. Massa do Músculo Tibial Cranial Esquerdo (MTCe).....	50
4.5. Massa do Músculo Tibial Cranial Direito x Massa do Músculo Tibial Cranial Esquerdo	51
4.6. Morfometria do Músculo Tibial Cranial Direito.....	52
4.6.1. Área das fibras musculares.....	52
4.6.2. Diâmetro mínimo das fibras musculares.....	53
4.6.3. Diâmetro máximo das fibras musculares.....	54
4.7. Morfometria do Nervo Fibular Comum Direito.....	55
4.7.1. Área das fibras nervosas.....	55
4.7.2. Diâmetro mínimo das fibras nervosas.....	56
4.7.3. Diâmetro máximo das fibras nervosas.....	57
4.8. Contagem do número de fibras musculares por campo.....	58
4.9. Walking Track Analysis (Exame de Marcha).....	59
4.9.1. De Medinaceli	59
4.9.1.1. Período pré operatório.....	59
4.9.1.2. Período 30 dias- pós operatório.....	60

4.9.1.3. Período 60 dias- pós operatório.....	61
4.9.1.4. Período 90dias- pós operatório.....	62
4.9.1.5. WTA – Todos os Períodos.....	63
4.9.2. Bain	64
4.9.2.1. Período pré operatório.....	64
4.9.2.2. Período 30 dias-pós operatório.....	65
4.9.2.3. Período 60dias- pós operatório.....	66
4.9.2.4. Período 90dias- pós operatório.....	67
4.9.2.5. WTA–Todos os Períodos.....	68
4.10. Análise Neurofisiológica - condução nervosa motora.....	69
4.10.1. Momento 1 (Logo após o procedimento cirúrgico) Latência.	69
4.10.2 Momento 2 (Antes do Sacrifício).....	72
4.11. Exame Neurofisiológico/ambos os momentos.....	75
4.12. Temperatura.....	76
5. DISCUSSÃO.....	78
5.1. Discussão do Método.....	79
5.2. Discussão dos resultados.....	80
5.2.1. Massa inicial e final dos ratos.....	80
5.2.2. Massa do músculo tibial cranial	80
5.2.3. Temperatura.....	82
5.2.4. Morfometria do músculo tibial cranial direito.....	82
5.2.5. Contagem do número de fibras musculares.....	83
5.2.6. Morfometria do nervo fibular comum direito.....	83
5.2.7. Estudo neurofisiológico.....	83
5.2.8. Análise Funcional da Marcha/ Walking Track Analysis	84
6. CONCLUSÃO.....	86
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	88



Resumo

Inúmeras patologias determinam lesões musculares parciais. Exemplos são as paralisias faciais, lesões do plexo braquial, entre outras. Até o momento não se tinha modelo experimental capaz de determinar lesão muscular parcial. O objetivo deste trabalho foi desenvolver um modelo de lesão parcial no nervo que determine uma lesão parcial no músculo por ele innervado. Foram utilizados 60 ratos distribuídos em três grupos com 20 animais cada. O grupo 1 foi o controle de normalidade, o grupo 2 sofreu lesão no nervo fibular comum e o grupo 3 foi o controle de desnervação. Foram analisados os seguintes atributos: massa inicial e final, massa dos músculos tibiais craniais direito e esquerdo, morfometria do músculo tibial cranial e do nervo fibular comum, temperatura, contagem do número de fibras musculares, estudo neurofisiológico e avaliação de marcha (Walking Track Analysis). Os resultados obtidos para a massa do músculo tibial cranial direito, em gramas, no grupo 1 foi 0,82g, no grupo 2 foi 0,44g e no grupo 3 foi 0,17g: $G1 > G2 > G3$ ($p < 0,05$); a média da área das fibras musculares, em μm^2 , no grupo 1 foi de 81,4, no grupo 2 foi de 74,1 e no grupo 3 foi de 28,5: $G1 = G2 > G3$ ($p < 0,05$); a média da área das fibras nervosas, em μm^2 , no grupo 1 foi de 34,2, no grupo 2 foi de 24,7 e no grupo 3, no coto proximal foi de 15,3, no coto distal foi de 13,5: $G1 > G2 = G3$ ($p < 0,05$); a média para o exame funcional da marcha dos ratos, conforme Bain et al.³⁹ no período de 90 dias de pós-operatório no grupo 1 foi de 10,04, no grupo 2 foi de 10,22 e no grupo 3 foi de -40,30: $G1 = G2 < G3$. ($p < 0,05$); a média da contagem do número de fibras musculares no grupo 1 foi de 25,95, no grupo 2 foi de 27,00 e no grupo 3 foi de 138,15: $G1 = G2 < G3$. ($p < 0,05$); a média para amplitude, em milivolts, do potencial de ação muscular no grupo 1 foi de 25,71, no grupo 2 foi de 16,77 e no grupo 3 foi de 3,94: $G1 > G2 > G3$ ($p < 0,05$). Com o modelo experimental utilizado, concluiu-se que a lesão parcial realizada no nervo fibular comum determinou lesão parcial no músculo tibial cranial; o teste de Bain et al.³⁹ foi mais sensível que o teste de De Medinaceli et al.⁴⁰; a amplitude do potencial de ação muscular, a massa do músculo tibial cranial e a análise de marcha (teste de Bain et al.³⁹) foram mais sensíveis do que os outros atributos.

Palavras-chaves: Avaliação morfológica; Lesão nervosa; Músculo tibial cranial; Ratos; Regeneração nervosa; Walking Track Analysis.



Summary

Several pathologies determine partial muscle injuries. Examples are the facial paralysis, brachial plexus injuries, among others. So far there was not an experimental model to determine partial muscle injury. The aim of this study was to develop a model of partial nerve injury to determine a partial lesion in the muscle innervated. We used 60 rats divided into three groups with 20 animals each. Group 1 was normal control, group 2 suffered lesion on common fibular nerve and group 3 was the denervation control. We analyzed the following attributes: initial mass and final mass of the tibial cranial muscle, right and left tibial cranial muscle morphology and common fibular nerve, temperature, total number of muscular fibres count, neurophysiological assessment and Walking Track Analysis. The results for the mass of the right tibial cranial muscles, in grams, in group 1 was 0.82 g in group 2 was 0.44 g and in group 3 was 0.17 g: $G1 > G2 > G3$ ($P < 0.05$), the average area of muscle fibers in μm^2 , in group 1 was 81.4 in group 2 was 74.1 and in group 3 was 28.5: $G1 = G2 > G3$ ($p < 0.05$), the mean area of nerve fibers, in μm^2 , in group 1 was 34.2, in group 2 was 24.7 and in group 3, the proximal stump was 15.3 in the distal stump was 13.5: $G1 > G2 = G3$ ($p < 0.05$) and the average for the functional examination of walking track of rats according to Bain et al.³⁹ in the period of 90 days postoperatively in group 1 was -10.04 in group 2 was 10.22 and in group 3 was -40.30: $G1 = G2 < G3$ ($P < 0.05$) and the average of total number of muscular fibres count in group 1 was 25.95 in group 2 was 27.00 and in group 3 was 138.15: $G1 = G2 < G3$. ($P < 0.05$) for the average of amplitude, in millivolts, the potential of the muscular action in group 1 was 25.71 in group 2 was 16.77 and in group 3 was 3.94: $G1 > G2 > G3$ ($p < 0.05$). With the experimental model used, it was concluded that the partial lesion held in common fibular nerve injury determined partial tibial cranial muscle; test Bain et al.³⁹ was more sensitive than the test of De Medinaceli et al.⁴⁰, the amplitude of the potential of the muscular action, the tibial cranial muscle mass and walking track analysis (Bain et al.³⁹) were more sensitive than other attributes.

Keywords: Morphological evaluation, nerve injury, tibial cranial muscle; Rats; Nerve regeneration; Walking Track Analysis.



1. Introdução

A regeneração nervosa vem sendo amplamente estudada e novas técnicas e métodos tanto de coaptação quanto de avaliação vêm sendo aprimorados. Com isso, as lesões do Sistema Nervoso Periférico têm sido alvo de inúmeros estudos para compreensão e entendimento do processo de reparação nervosa, pois podem acarretar distúrbios importantes à função dos membros superiores e inferiores.

1.1 Nervos Periféricos

Nervos são cordões esbranquiçados constituídos por feixes de fibras nervosas reforçadas por tecido conjuntivo, que unem o sistema nervoso central aos órgãos periféricos. A função dos nervos é conduzir, através de suas fibras, impulsos nervosos do sistema nervoso central para a periferia e da periferia para o sistema nervoso central. São três as bainhas que entram na constituição de um nervo: epineuro, perineuro e endoneuro¹ (Fig.1).

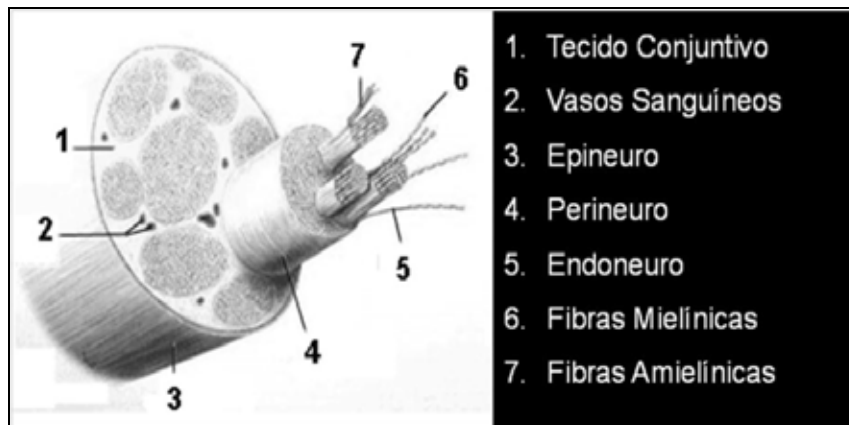


Figura1- Representação esquemática do nervo periférico.

Os nervos são muito vascularizados, sendo percorridos longitudinalmente por vasos que se anastomosam, o que permite a retirada do epineuro em um trecho sem que ocorra lesão nervosa¹.

É sabido que os impulsos nervosos não são os únicos que circulam ao longo das fibras nervosas, contudo o axônio representa também uma via através da qual se encontram continuamente em movimento uma grande variedade de componentes celulares, que utilizam mecanismos de transporte para alcançar seu destino e produzir seus efeitos² (Fig.2).

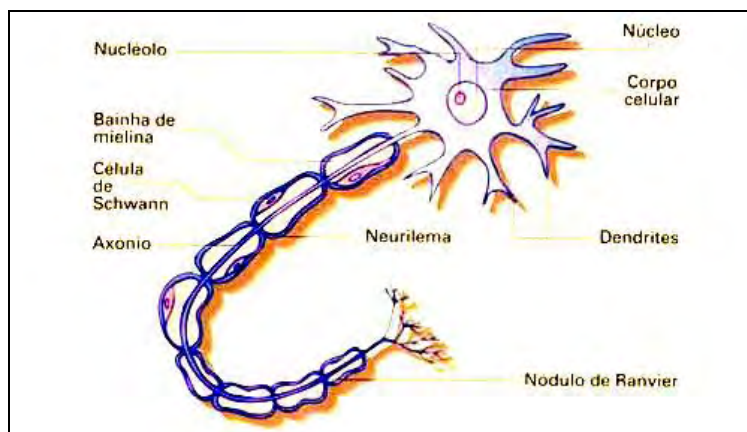


Figura2 – Unidade estrutural do sistema nervoso.

Portanto, parece evidente que a sobrevivência e bom estado do axônio e as estruturas que inervam dependem destes mecanismos de transporte, mesmo que não se conheça a maneira que isto ocorre. Ignoramos igualmente qual é a sutil relação que seguramente existe entre estes mecanismos de transporte e as propriedades condutoras das fibras nervosas² (Tab.1).

NUCLÉOLO	TRANSCRIÇÃO DO MATERIAL GENÉTICO EM PROTEÍNA
BAINHA DE MIELINA	ACELERA A VELOCIDADE DA CONDUÇÃO DO IMPULSO NERVOSO
CÉLULA DE SCHUWANN	DETERMINAM A FORMAÇÃO DA BAINHA DE MIELINA
AXÔNIO	TRANSMISSÃO DO IMPULSO NERVOSO
NEURILEMA	MEMBRANA ENVOLTÓRIA: CÉLULAS DE SCHUWANN
NÚCLEO	CONTÉM MATERIAL GENÉTICO
CORPO CELULAR	CENTRO METABÓLICO DO NEURÔNIO: SÍNTESE PROTEICA
DENDRITOS	PROLONGAMENTOS DOS NEURÔNIOS: RECEPÇÃO DO IMPULSO NERVOSO
NÓDULO DE RANVIER	GARANTEM A CONDUÇÃO SALTATÓRIA DO IMPULSO NERVOSO

Tabela 1 – Fisiologia celular do neurônio.

A extensão dos axônios varia desde muito curta até muito longa. Os neurônios também variam quanto ao diâmetro, sendo que o diâmetro quanto maior, mais rápido é na condução do impulso nervoso. Contudo, mesmo axônios de grande diâmetro, conduzem o impulso nervoso a uma velocidade baixa, porém devido à "mielinização" os impulsos nervosos são acelerados na sua condução. Grande parte dos axônios encontra-se envolvidos por uma "bainha de mielina", que é constituída por diversas camadas de membrana celular de outras células, que envolvem os axônios. As "bainhas de mielina" têm interrupções, que são chamadas de "nódulos de Ranvier" que faz com que os impulsos ao saltarem de nó em nó tornem-se mais rápidos. A perda da "bainha de mielina" afeta a transmissão dos impulsos nervosos, seja atrasando-os ou até bloqueando-os, alterando o funcionamento do sistema nervoso³.

1.2 Lesão nervosa

Devido à sua distribuição por todo o corpo, as lesões dos nervos são relativamente freqüentes. Quando um nervo é seccionado, ocorrem alterações degenerativas, seguidas de uma fase de reparação.

Nervos periféricos sujeitos à aplicação de uma força deformante intensa e abrupta podem sofrer um bloqueio fisiológico rapidamente reversível, um bloqueio local com desmielinização ou, até mesmo, uma degeneração walleriana. Os neurônios são dependentes de um transporte bidirecional de substâncias, que é conhecido como transporte axonal, ou seja, de informações provenientes do sistema nervoso central para a periferia e em sentido contrário, garantindo a sua função normal. Quando existe um bloqueio dessas informações a função nervosa pode estar deteriorada⁴⁻⁷.

Os nervos periféricos, assim como os demais tecidos do organismo, estão sujeitos a doenças inflamatórias, traumáticas, metabólicas, tóxicas, genéticas e neoplásicas⁴. Estas doenças levam a diferentes tipos e graus de lesões⁵⁻⁷.

A atrofia muscular é a mudança mais drástica encontrada após a lesão e varia consideravelmente entre indivíduos da mesma espécie e entre músculos do mesmo indivíduo⁸.

Novak et al.⁹ relata que as lesões de nervos periféricos são freqüentes, decorrentes de traumas ou compressões agudas. Com isso, ocorrem perdas ou diminuições de sensibilidade e motricidade da estrutura innervada, resultando em degeneração axonal e de sua bainha de mielina.

As lesões de nervos periféricos são classificadas histopatologicamente, segundo Seddon¹⁰, em neuropraxia, axonotmese e neurotmese. Mais tarde, Sunderland em 1951², ampliou esta classificação para outra com cinco graus. A neuropraxia, caracterizada pelo bloqueio funcional da condução elétrica devido à degeneração mielinica, corresponde ao grau um. A axonotmese, na qual ocorre à interrupção da continuidade dos axônios, corresponde ao grau dois. A neurotmese, corresponde ao grau três, quatro e cinco. No grau três o endoneuro é comprometido junto com o axônio. No grau quatro ocorre ruptura do perineuro e no grau cinco ocorre a interrupção completa da continuidade nervosa, no qual todas as estruturas são seccionadas² (Tab.2).

SEDDON (1943)	SUNDERLAND (1951)
Neuropraxia	Grau I – desmielinização local
Axonotmese	Grau II – interrupção da continuidade axonal
Neurotmese	Grau III – destruição do endoneuro
	Grau IV – destruição do perineuro
	Grau V – interrupção da continuidade de todas as estruturas nervosas

Tabela 2: Classificações histopatológicas das lesões nervosas periféricas segundo Seddon e Sunderland.

Quando se tem uma lesão periférica além da perda funcional o mapa cortical referente à área lesada sofre alterações. Estudos na área da reabilitação têm sido realizados para buscar uma melhor efetividade no processo de recuperação tanto funcional quanto sensorial e a velocidade na regeneração axonal¹¹.

Um dano severo no axônio leva à interrupção de sua integridade. Os axônios do coto proximal degeneram de maneira retrógrada até chegar ao próximo nódulo de Ranvier do local da lesão, criando uma pequena área de degeneração^{12,13}. As fibras distais à lesão sofrem degeneração em 48–96 horas após a transecção do nervo, por meio de um processo conhecido como degeneração Walleriana¹². A degeneração Walleriana conduz à remoção e reciclagem axonal e do material mielínico-derivado e prepara o ambiente através do qual os axônios em regeneração irão crescer^{14,15}.

Após uma lesão, a expressão gênica nervosa é alterada pela presença de fatores com a GAP-43 (*growth-associated protein 43*) e do BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*), dentre outros, e tem-se a diminuição na síntese do citoesqueleto¹⁶.

Quando um nervo periférico é lesionado, a injúria provoca mudanças celulares em toda parte do nervo, desde as células localizadas centralmente até as periféricas¹¹.

A lesão no tecido nervoso periférico diferencia-se da lesão no sistema nervoso central por apresentar grande potencial de regeneração axonal¹⁷.

1.3 Regeneração Nervosa

A recuperação nervosa periférica depende de fatores como o tipo, grau e extensão da lesão, técnica cirúrgica aplicada e a tensão aplicada ao reparo cirúrgico⁷.

Os nervos periféricos podem se recuperar de três diferentes maneiras, tais como, remielinização, brotamento axonal e reparação cirúrgica nervosa⁶.

Na remielinização ocorre a recomposição da camada de mielina lesada através da desmielinização segmentar. Esta é a forma mais rápida de recuperação, ocorrendo entre 2 e 12 semanas após a lesão⁶.

Quando acontece a interrupção da continuidade axonal, parcial ou total, ocorre a degeneração axonal distal à lesão, logo nos primeiros minutos após a

lesão. Nas lesões axonais parciais encontramos um fenômeno chamado brotamento axonal, onde axônios vizinhos intactos passam a inervar a área desnervada pela lesão. Este fenômeno demora de dois a seis meses para ocorrer^{1,2,4}.

Após uma lesão completa do nervo periférico há necessidade do reparo cirúrgico.

O processo de degeneração e consequente regeneração nervosa periférica estão diretamente ligados ao tipo, grau e extensão da lesão nervosa (Tab.3).

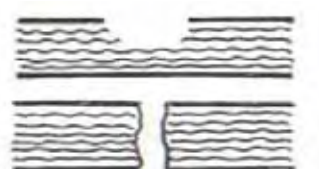
NEUROPAXIA 	• Desmielinização segmentar • Bloqueio local de condução	• Remielinização espontânea • 2-12 semanas • Prognóstico favorável
AXONOTMESE 	• Lesão axonal • Degeneração walleriana	• Brotamento axonal • Regeneração lenta • Recuperação incompleta
NEUROTMESE 	• Secção parcial ou total do nervo	• Recuperação limitada • 18 meses

Tabela 3 – Representação esquemática das lesões nervosas periféricas e sua recuperação.

A regeneração nervosa periférica resulta de eventos sincronizados que dependem de fatores de crescimento, síntese e reajustes dos componentes da matriz extracelular (MEC), e a interação entre axônios regenerativos com as células não-neurais presentes no nervo. Nesse sentido, a comunicação celular após uma lesão nervosa, devido a trauma ou doença, é de fundamental importância na orientação das alterações morfológicas e químicas que ocorrem no tecido nervoso¹⁸.

1.3.1 Plasticidade Neuronal

A plasticidade neural pode ser definida como uma mudança adaptativa na estrutura e nas funções do sistema nervoso, que ocorre em qualquer estágio da ontogenia, como função de interações com o ambiente interno ou externo ou, ainda, como resultado de injúrias, de traumatismos ou de lesões que afetam o ambiente neural¹⁹.

Em linhas gerais, o processo se resume no seguinte. Uma vez estimulados, os neurônios geram impulsos de natureza elétrica e liberam íons e substâncias químicas que lançadas nas sinapses (espaços vazios entre um neurônio e outro) estabelecem ligações entre eles. A cada novo estímulo, a rede de neurônios se recompõe e reorganiza o que possibilita uma diversidade enorme de respostas²⁰.

O sistema nervoso periférico, por suas características citológicas e fisiológicas, apresenta uma maior capacidade de regeneração do que o sistema nervoso central. A regeneração do nervo é um forte exemplo de plasticidade dentro do sistema nervoso^{21,22}.

1.4 Reparação Nervosa Periférica

A recuperação funcional depende da regeneração neural, porém, esse processo é lento, o que determina a inatividade do músculo por um tempo considerável e, conseqüentemente, o estabelecimento da atrofia muscular²³⁻²⁵.

Com avanço tecnológico, dos materiais e das técnicas microcirúrgicas houve um aperfeiçoamento na reconstrução das estruturas lesadas, com melhora parcial da recuperação funcional do nervo²⁶.

A recuperação completa da função motora após uma lesão de nervo periférico pressupõe a ocorrência de um conjunto de processos morfológicos e fisiológicos que determinam o retorno da atividade elétrica dos axônios sobre os músculos paralisados. Apesar de todo o avanço técnico obtido com a microcirurgia ainda não se obtém total recuperação motora, por melhor que tenha sido realizada a reparação do nervo lesado².

Desde o século XIX, a regeneração nervosa e as reinervações são desafios que têm estimulado cientistas como Waller em 1851 e Ballance em 1895 a iniciar o desenvolvimento desses estudos. Atualmente, as abordagens clínicas e cirúrgicas diante dos diversos tipos de lesões nervosas periféricas têm evoluído a cada ano. Quando ocorre secção total do nervo, as técnicas para sutura direta dos nervos são as neurorrafias término-terminais^{27,28}.

De acordo com Viterbo²⁹, desde que William de Saliceto no século XIII realizou a primeira neurorrafia em Bolonha, várias formas de unir os cotos de nervos seccionados vêm sendo estudadas. Sutura epineural, perineural ou interfunicular, epiperineural, envelope venoso ou tubo de silicone ou outros aloplásticos, cola de fibrina e cola acrílica. Inúmeras opções para reparar nervos, mas sempre de modo término-terminal, coto proximal ao coto distal.

Quando não se dispõem do coto proximal, alternativa é a neurorrafia término-lateral^{27,29-38}.

A neurotmeze pode ser completa ou incompleta, dependendo do grau de acometimento das estruturas nervosas.

As lesões de nervos periféricos, devido a sua alta incidência, são muito estudadas, inclusive experimentalmente^{39,40}.

Bridge et al.⁴¹ estudaram seis técnicas de esmagamento em ratos. Todos os animais apresentaram axonotmeze sem diferenças significativas.

Ciges et al.⁴² realizaram compressão da porção extratemporal do nervo facial de coelhos. A degeneração axonal e de mielina foram os primeiros eventos observados. Basicamente, todos os nervos foram transformados em tecido fibroso. A mielina foi desintegrada pelas células de Schwan. Essas células têm função importante nos processos de degeneração e regeneração. Os aspectos finais das fibras regeneradas apresentaram-se semelhantes ao normal, porém com mais tecido colágeno, bainha de mielina mais fina e grande proporção de fibras desmielinizadas.

Romão et al.⁴³ realizaram um estudo sobre os efeitos da eletroestimulação no músculo tibial cranial após lesão nervosa por esmagamento no rato. Concluiu que a lesão por esmagamento não foi efetiva para determinar atrofia muscular.

Inúmeros trabalhos comprovaram os efeitos causados após lesão nervosa periférica, seja por esmagamento, compressão, secção e outros. Porém, não foram encontrados estudos os quais acompanharam detalhadamente os efeitos de uma

lesão nervosa após longo período de evolução, sem que houvesse intervenções com finalidades regenerativas.

Atualmente, com o acréscimo de todos os tipos de acidentes, houve aumento do número e da gravidade das lesões traumáticas dos nervos periféricos, determinando incapacidade física em indivíduos em plena capacidade física.

Várias lesões determinam déficits parciais ou incompletos nos músculos, como por exemplo, a paralisia facial, lesões de plexo braquial, entre outras. Estas lesões parciais no nervo periférico estabelecem atrofias parciais nos músculos e estas atrofias podem ou não ser beneficiadas com a eletroestimulação.

No levantamento bibliográfico realizado por Krueger-Beck et al.¹⁷, durante o período de 1972 a 2009, avaliado na pesquisa sobre campos elétricos (CE) e campos magnéticos (CM) aplicados sobre tecido nervoso, concluíram que os grupos experimentais obtiveram superioridade em relação aos grupos controle na maioria dos estudos. A revisão bibliográfica realizada mostra a efetividade do uso de CE e CM no processo de regeneração nervosa em animais. A seleção dos parâmetros de CE e CM é, ainda, heterogênea, não havendo consenso nem padronização de seu uso¹⁷.

1.5 Análises Quantitativas das Lesões Nervosas Periféricas

O tratamento e a conduta a ser adequada em decorrência de uma lesão nervosa periférica dependem da correta localização da injúria e da estimativa da extensão da lesão. Além disso, as análises das alterações funcionais provocadas pela lesão nos darão subsídios para adequada intervenção. Estes direcionamentos são primordiais no processo de reabilitação.

1.5.1 Eletroneuromiografia (ENMG)

A avaliação eletrofisiológica tem sido utilizada em muitos trabalhos experimentais fornecendo importantes dados sobre a regeneração neural e reinervação muscular^{38,44-49}.

O principal propósito do estudo neurofisiológico, também chamado eletroneuromiografia (ENMG), é determinar e quantificar a integridade de componentes da unidade motora⁵⁰, e os principais dados fornecidos pelo exame são os estudos de condução nervosa motora, sensitiva e eletromiografia⁵¹.

Para que o estudo neurofisiológico possa ser otimamente interpretado, o conhecimento da sequência temporal dos eventos após uma lesão nervosa é fundamental (Tab.4).

3 a 5 dias de lesão – Fase Hiperaguda	• Amplitudes do Potencial de ação motor (PAM) diminuem • Velocidade de condução é normal • Alterações leves da condução nervosa • Impossível classificar a lesão (neuropraxia, axonotmese e neurotmese)
Após o 5º dia da lesão	• Os potenciais nervosos motores e sensoriais distais a lesão são perdidos na axonotmese e neurotmese • Neuropraxia: preservação dos potenciais motores
Aproximadamente 14 dias de lesão	• Primeiros sinais de desnervação ativos • Presença de ondas agudas e fibrilações (axonotmese e neurotmese) • Lesão puramente neuroprática: não há sinais de desnervação
Fase de regeneração	• Lesões incompletas: surgimento de unidades motoras polifásicas de pequena amplitude e duração normal – potenciais nascentes

Tabela 4—Tabela de evolução ENMG após lesão nervosa.

Não encontramos na literatura estudos padronizados para a realização do exame eletroneuromiográfico experimental.

Finsterer no ano de 2001 relatou que o modelo de interferência eletromiográfica constituída de uma unidade de potencial de ação motora, pode ser analisado subjetivamente ou objetivamente através da análise computadorizada. Possuem métodos quantitativos, medidas de amplitude, integração da área sob a curva, técnicas de decomposição e espectros potentes de análise. Os padrões que interferem nos músculos saudáveis dependem de fatores como a idade, sexo, força, músculo, temperatura, fadiga, nível de aptidão, tipo de eletrodo, sensibilidade, filtro, nível de frequência e medida. Todos os métodos de análise devem ser padronizados⁵².

Os métodos favoráveis para o diagnóstico são aqueles utilizados com eletrodos de agulha, os quais não necessitam de monitoramento e medidas de força muscular. A ENMG de agulha examina a atividade elétrica da via muscular. Quando ocorrem desnervações, há o decréscimo dos potenciais de unidades motoras e na reinervação os potenciais de unidades motoras aumentam de amplitude e são freqüentemente polifásicos⁵².

De acordo com Robinson⁵³, os potenciais de ação compostos nervosos ou musculares podem ser caracterizados por sua forma, amplitude e duração. O atraso entre o estímulo elétrico e o surgimento do potencial evocado também pode ser medido. As medidas desses parâmetros, obtidos durante os procedimentos da avaliação eletrofisiológica, podem ser comparadas com valores normais estabelecidos, identificando condições como desnervação, desmielinização, bloqueio de condução e perda axonal.

A diferenciação entre lesões parciais e completas é de extrema importância para o direcionamento da conduta, seja ela clínica ou cirúrgica e se não houver melhora na ENMG por volta de cinco a doze meses o prognóstico é ruim⁵⁴.

1.5.2 Análise morfológica

Hipóteses arcaicas do século XX defendiam que apenas o coto distal e os primeiros nódulos de Ranvier sofreriam alterações morfológicas proporcionadas pela lesão⁵⁵. Atualmente, esta afirmação é errônea, pois ocorrem alterações em todo o seguimento anterior à secção, ocorrendo tardiamente em relação às modificações do coto distal^{17,56}.

As alterações morfológicas e histológicas após lesão parcial ou total do nervo periférico envolvem a diminuição da massa muscular, alterações no diâmetro mínimo das fibras nervosas e musculares, contagem do número de fibras nervosas e musculares, aumento do tecido conjuntivo, dentre outras⁵⁷⁻⁵⁹.

A fraqueza muscular após desnervação é decorrente da perda de ação trófica do neurônio motor sobre o músculo, sendo agravada pela atrofia das fibras musculares e/ou pela proliferação de tecido conjuntivo⁶⁰. O acúmulo de tecido conjuntivo intersticial dificulta a troca de substâncias entre o leito vascular e as fibras musculares. Esse tecido pode afetar a extensão do crescimento axonal durante a reinervação⁶¹.

Viterbo et al. avaliaram a desnervação pela contagem do número de fibras musculares por campo microscópico. Afirmaram ser um método simples e eficiente⁶².

Além da ENMG existem métodos tradicionais, descritos por Gersh⁶³, para quantificar a atrofia muscular. Inicialmente o peso do músculo desnervado é comparado com o peso do músculo contralateral. Posteriormente, a análise microscópica contrasta o diâmetro e/ou área transversos da fibra muscular desnervada com o músculo contralateral. O peso do músculo pode induzir a resultados questionáveis, pois variáveis como edema e presença de tecido conjuntivo fibroso podem estar presentes. Contudo, a microscopia permite quantificar as alterações tanto nas fibras musculares quanto no tecido conjuntivo.

1.5.3 Análise Funcional

Em condições experimentais, a recuperação das lesões nervosas periféricas é estudada principalmente através de técnicas de eletrofisiologia, histologia e

morfometria. Embora os parâmetros eletrofisiológicos e morfológicos sejam úteis, é importante conhecer o grau de recuperação funcional que eles implicam. As avaliações funcionais são relativamente fáceis de empregar em humanos, mas são pouco difundidas em animais, o que motivou a busca por técnicas de avaliação funcional em condições experimentais⁶⁴.

Segundo estudos, o diâmetro muscular não pode ser utilizado como parâmetro de capacidade de produção de força, mesmo sendo um dos fatores para uma boa reinervação⁶⁵.

A regeneração nervosa periférica observada em estudos experimentais apresenta aspectos controversos, porque nem sempre é possível estabelecer uma correlação clara entre os resultados obtidos pelas diferentes metodologias empregadas, particularmente aqueles obtidos em estudos diferentes, conduzidos por autores diferentes. A maioria dos estudos sobre a regeneração dos nervos periféricos emprega métodos histomorfométricos e eletrofisiológicos, os quais, embora essenciais, não adiantam nenhuma informação sobre a recuperação funcional correspondente. As avaliações funcionais são muito difíceis em animais, por motivos óbvios, mas De Medinaceli et al.⁴⁰ introduziram o método do índice funcional do ciático de ratos, modificado por outros autores^{39,66}, que permite avaliar satisfatoriamente a recuperação do nervo ciático lesado em função do tempo. Um estudo anteriormente conduzido por Oliveira et al.⁶⁷ mostrou haver clara correlação entre a regeneração morfológica, avaliada pela morfometria dos nervos, e a recuperação funcional, medida pelo índice funcional do ciático⁶⁴.

Há aproximadamente sete décadas atrás Gutmann e Gutmann descreveram que em lesão de nervo fibular de coelhos ocorreria perda da capacidade de espalhar os dedos durante avaliação de marcha e, consideraram esse fator confiável para avaliar o grau da lesão⁶⁸.

O nervo isquiático de ratos é usado amplamente como modelo para a avaliação da função motora e sensorial do nervo. Métodos tradicionais que avaliam a recuperação de nervos após um dano periférico e reparação como a eletroneuromiografia e a histomorfometria, são empregados universalmente em experimentação de regeneração neural, porém não são necessariamente correlacionados com um retorno motor e sensorial funcional. Hruska et. al. em 1979⁶⁹ usaram um passadiço para analisar a marcha de ratos, desenvolveram um método simples para estudar em modelo animal com problemas neurológicos que

causam disfunção na locomoção. Newby-Schmidt & Norton⁷⁰ elaboraram um novo método para registrar marca dos pés de galinhas para avaliar a função motora dos mesmos animais.

1.5.3.1.Walking Track Analysis

Em 1982, De Medinaceli et al.⁴⁰ desenvolveram um método quantitativo para analisar o desempenho do membro posterior de ratos, examinando suas pegadas, conhecido como índice funcional do isquiático (IFI). Para este estudo De Medinaceli et al.⁴⁰ baseou-se em pegadas deixadas em filmes de raios-X. Mais tarde, esse método foi modificado por diferentes autores, conforme suas necessidades particulares⁷¹. Contudo, muitos pesquisadores usam o IFI como uma maneira de avaliar a função dos membros posteriores depois de uma lesão e recuperação do nervo isquiático, que pode ser quantificada e facilmente determinada pela análise da marcha através das pegadas.

De acordo com a proposta De Medinaceli et al.⁴⁰ os ratos deveriam ser colocados em um corredor escuro com 43 cm de comprimento e 8,7 cm de largura com um final cego. Após condicionamento dos ratos, é colocada uma lâmina de raio-X não exposto na base do passadiço e as patas traseiras dos ratos são então mergulhadas em um prato contendo líquido revelador. As pegadas impressas aparecem imediatamente no filme e se tornam permanentes depois de secas. Quatro variáveis são medidas na pata experimental (E) e na pata controle ou normal (N). As medidas averiguadas são à distância da pata oposta (TOF), à distância entre o 1º e o 5º artelhos (TS), à distância entre o 2º e o 4º artelhos (IT) e o tamanho da pegada (PL) (Fig.3).

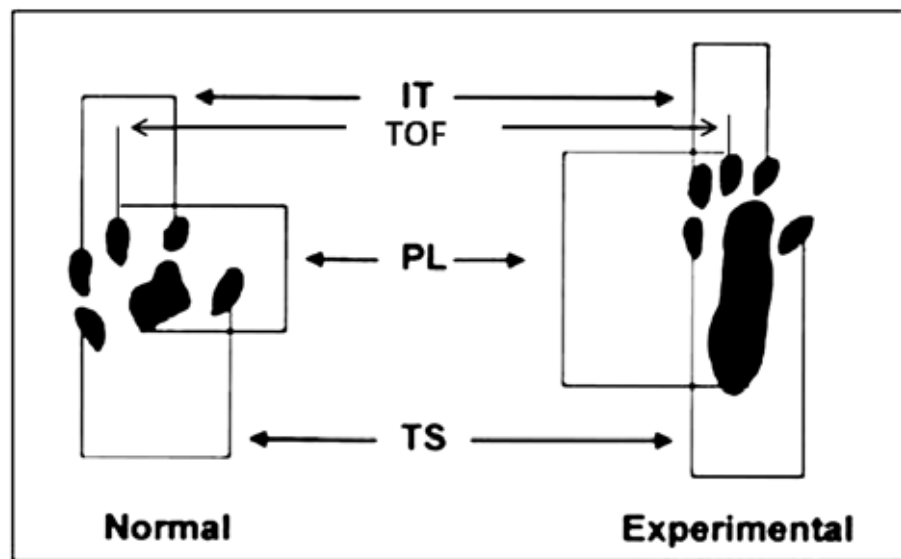


Figura3—Representação esquemática para calcular o índice Funcional do Cíatico (IFC).

Através destas medidas De Medinaceli et. al.⁴⁰ desenvolveram a primeira fórmula que quantifica o índice funcional do isquiático (IFI). Esta foi desenvolvida empiricamente e assumido um valor de igual importância para as quatro variáveis. Zero representa uma função normal ou zero por cento ($\pm 11\%$) de perda de função e -100 representam uma perda total na função ou 100% de perda de função o que resulta de uma transecção completa do nervo isquiático.

Desde que esse método foi desenvolvido, sua validade tem sido questionada por muitos pesquisadores. Um dos motivos desse questionamento reside no fato de que para obtenção de informações claras das variáveis do IFI são necessárias inúmeras repetições dos procedimentos inerentes, principalmente por conta da recorrente produção de artefatos indesejáveis à avaliação das pegadas.

Quando o IFI tender a zero é considerado normal, quando tender a -100 consideram-se dano total, resultado de uma completa secção do nervo isquiático.

Uma função similar foi criada por Bain et al.³⁹ para lesões no nervo fibular comum e no tibial posterior. Análises de múltiplos lineares e regressão foram feitas usando os fatores descritos acima para determinar a significância e o peso apropriado para cada valor na forma, em ratos com o tipo de lesão definido³⁹.

Uma completa lesão do nervo tibial posterior resulta em maior significância na piora da marcha dos animais, pois não apresentam flexão plantar dos calcanhares, patas invertidas, uma pegada maior do que o normal, e uma significativa perda dos

músculos intrínsecos da pata o que causa uma diminuição da abertura dos artelhos^{39,72}.

Não encontramos na literatura modelos experimentais de lesão parcial de nervo que determinem lesão parcial no músculo. Existem modelos de compressão nervosa que causam lesões temporárias no nervo e consequentemente no músculo e também lesões definitivas no nervo e músculo de forma completa e não parcial. Portanto, é de suma importância o desenvolvimento destes modelos para realização de estudos sobre os possíveis efeitos da utilização da eletroestimulação ou drogas nesta situação.

Com isso, este estudo busca caracterizar e acompanhar o processo de regeneração nervosa da recuperação neuronal no local da lesão e suas respectivas respostas motoras após lesão muscular. Um modelo adequado de lesão e aprimorado em sua metodologia permitiria examinar grande variabilidade de respostas e com isso avaliar e testar inúmeros agentes terapêuticos.



2. Objetivo

Desenvolver modelo de lesão parcial no nervo que determine lesão parcial no músculo por ele inervado.



3. Método

Modelo experimental

Foram utilizados neste estudo 60 ratos da raça Wistar, machos, com massa inicial de 200 g, fornecidos pelo Biotério da Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP, estado de São Paulo.

Os animais tiveram suas massas iniciais aferidas e foram distribuídos aleatoriamente em três grupos de 20 ratos, denominados G1, G2, G3.

O grupo 1 foi o controle de normalidade.

O grupo 2 sofreu lesão no nervo fibular comum.

O grupo 3 foi o controle de desnervação.

Todos os animais foram sacrificados com 90 dias.

Todos os animais permaneceram em gaiolas apropriadas, alojados no biotério, com temperatura constante de 24° Celsius (Fig.4).



Figura 4: Animal sendo alojado.

Nos grupos submetidos à cirurgia G2 e G3, a face dorsal dos membros posteriores de cada rato foi submetida à tonsura, e o animal foi posicionado em decúbito ventral, sobre uma placa de cortiça, sendo fixado por fita adesiva e alfinete nas quatro patas (Fig.5).



Figura 5: Animal preparado para cirurgia.

Os procedimentos cirúrgicos foram efetuados sob anestesia intra-peritoneal por injeção de Ketamina (0,3 ml/kg) e xilazina (0,2 ml/kg).

O procedimento operatório foi iniciado por meio de uma incisão de aproximadamente três centímetros na face dorsal e na direção do maior eixo do membro posterior direito, comprometendo pele, tecido celular subcutâneo e músculo glúteo máximo (Fig.6). Após fez-se a dissecação cuidadosa do nervo ciático e seus ramos, nervo fibular comum, nervo tibial e nervo cutâneo caudal da sura, numa extensão de cerca de dois centímetros e meio (Fig.7).



Figura 6: Incisão na face dorsal do membro posterior direito.



Figura 7: Trifurcação do nervo ciático.

A lesão foi realizada no nervo fibular comum dos animais do grupo G2. Foi realizada ressecção de um segmento de um centímetro e meio de comprimento por 0,3 mm de diâmetro do nervo, restando um segmento de nervo com diâmetro de 0,1 mm aproximadamente. A lesão foi feita com auxílio de tesoura microcirúrgica (Fig.8 e 9).



Figura 8: Tesoura microcirúrgica.



Figura 9: Lesão do nervo fibular comum direito.

No grupo 3, que foi o controle de desnervação, foi realizada a secção do nervo fibular distando um centímetro da trifurcação do nervo ciático. Seu coto proximal foi invertido em aproximadamente 120°, sepultado, nas fibras do músculo adutor, sendo fixado com um ponto de fio polipropileno 6-0. O coto distal foi sepultado, da mesma forma, no músculo adutor, porém em sentido contrário (Fig.10).



Figura 10: Secção e sepultamento do nervo fibular comum.

O fechamento da incisão foi idêntico em todos os grupos, realizado por planos, com pontos separados de fio monofilamentar de náilon 5-0.

Todos os ratos receberam água e ração *ad libitum* durante o período de observação.

Foi aferida a temperatura, em graus Celsius, de todos os animais em estudo. Este procedimento foi realizado antes do exame neurofisiológico. A aferição foi retal e feita pelo termômetro digital da marca Braille-biomédica, modelo AG-100, série 762 e tensão 9 Volts.

O exame neurofisiológico foi realizado após a dissecação do nervo ciático e seus ramos e antes do sacrifício dos animais, o qual analisou a latência motora e neurocondução fibular. Para este exame foi utilizado eletromiógrafo marca Medelec, modelo Sapphire II (Fig.11).



Figura 11: Exame neurofisiológico.

Para o registro do potencial de ação, os eletrodos foram introduzidos no músculo tibial cranial, com a distância de um centímetro aproximadamente entre o eletrodo ativo e o de referência. O eletrodo terra foi posicionado entre os eletrodos ativo e referência. Foram registradas a latência, duração e amplitude do potencial de ação motor composto.

Para avaliação da marcha (*Walking track analysis*) os animais de cada grupo foram induzidos a andar por um corredor de 78 cm X 9 cm, sobre uma folha de papel branco com dimensões apropriadas e as patas traseiras de cada animal foram umedecidas em tinta nanquim preta (Fig.12).

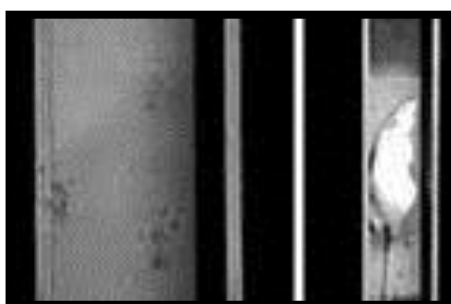


Figura 12: Walking Track Analysis.

As pegadas deixadas na folha de papel branco foram analisadas através das medidas da distância dos dedos da pata experimental (E) para os dedos da pata normal (N) à frente (TOF); distância do calcanhar aos dedos (PL); distância do primeiro ao quinto dedo (TS); distância entre o segundo e quarto dedos (IT) e realizados os cálculos do índice funcional do ciático conforme a fórmula de Medinaceli et al.⁴⁰ (Fig.13):

$$SFI = \left[\frac{(ETOF - NTOF)}{NTOF} + \frac{(NPL - EPL)}{EPL} + \frac{(ETS - NTS)}{NTS} + \frac{(EIT - NIT)}{NIT} \right] \times \frac{220}{4}$$

Figura 13: Fórmula De Medinaceli et al.⁴⁰

Esta avaliação foi realizada em todos os animais a cada 30 dias.

Foi aplicado o índice funcional do Isquiático conforme descrito por De Medinaceli et al.⁴⁰ e também conforme Bain et al.³⁹, sendo os valores comparados entre as duas técnicas.

Após avaliação funcional os animais foram sacrificados com doses letais de ketamina e xilazina injetados intra-peritonealmente. Os músculos tibiais craniais direito e esquerdo e os nervos fibulares direitos de todos os animais foram removidos.

Todos os procedimentos realizados com os animais obedeceram aos princípios éticos na experimentação animal, preconizados pelo COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal), com protocolo de número 620, da Faculdade de Medicina de Botucatu/UNESP.

Foram analisados os seguintes atributos: massa inicial e final dos ratos, massas dos músculos tibiais craniais direito e esquerdo, área das fibras do músculo tibial cranial direito, diâmetro mínimo e máximo das fibras do músculo tibial cranial direito, contagem do número de fibras musculares, área das fibras do nervo fibular comum direito, diâmetro mínimo e máximo das fibras do nervo fibular comum direito, temperatura, amplitudes, latências e durações dos potenciais de ação do músculo tibial cranial direito e o índice funcional do ciático.

Análise histológica dos nervos

Os nervos fibulares direitos de todos os animais foram removidos e submetidos a cortes transversais.

Para obtenção destes cortes, após imersão em solução de Karnovsky por 48 horas, os segmentos coletados passaram por um protocolo. Foram lavados em tampão fosfato 0,2 M, pH=7,3, três vezes por cinco minutos, pós-fixados em tetróxido de ósmio a 1% diluído em tampão fosfato de sódio, 0,1M, pH=7,3, por 2 horas, lavados em água destilada, três vezes de cinco minutos, desidratados em série de concentração crescente de álcool 70% por 24 horas e álcool 95% por 12 horas e, a seguir incluídos em historesina. Estes blocos foram submetidos a cortes transversais semifinos de 0,5 µm e corados em solução de azul de toluidina 0,5%. Esses procedimentos foram realizados no Laboratório de pesquisa em nervos periféricos e reinervação urogenital do Departamento de Urologia da Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP.

Foram aferidos, sob aumento de 800 vezes (com auxílio do Zoom do aplicativo), áreas e diâmetros mínimo e máximo de 50 fibras nervosas de cada animal. Foram selecionadas dez imagens movendo-se o cursor para cima, ora para

direita, ora para esquerda, e de cada uma destas imagens foram escolhidas ao acaso cinco fibras, sendo uma na região central e uma em cada quadrante.

A digitalização foi feita por um sistema de captura de imagens, Ipwint 32, acoplado a um microcomputador Pentium III com processador de 700 MHz. As imagens digitalizadas foram analisadas usando software da Jandel Scientific Corporation, o SigmaScan Pro Image Analysis, versão 5.

Análise histológica dos músculos

Os músculos tibiais craniais dos lados direito e esquerdo dos três grupos foram removidos, pesados e tiveram suas massas aferidas. Em seguida, foram divididos em três segmentos tomando-se o medial. Este foi diminuído até que restasse um segmento cilíndrico da parte central com aproximadamente oito milímetros de comprimento por três milímetros de diâmetro.

Após serem resfriados em nitrogênio líquido, a 180°Celsius negativos, e montados em suportes especiais, os músculos foram cortados transversalmente em criostato Leica (CM1850) com 5 µm de espessura e foram corados pela técnica de Hematoxilina-Eosina.

Foi realizada a contagem do número total de fibras musculares que apareciam por inteiro na tela do monitor. Estas imagens haviam sido digitalizadas previamente com microscópio de luz, da marca Leica-DMLB, ajustado com objetiva de 40 vezes, em um aumento original de 400 vezes.

Os cortes transversais dos músculos tibiais craniais direito foram analisados com microscópio de luz, da marca Leica-DMLB, ajustado com objetiva de 40 vezes, em um aumento original de 400 vezes. Foram aferidas áreas e diâmetros mínimo e máximo de 50 fibras musculares de cada animal. Foram selecionadas dez imagens movendo-se o cursor para cima, ora para direita, ora para esquerda, e de cada uma destas imagens foram escolhidas ao acaso cinco fibras, sendo uma na região central e uma em cada quadrante.

Análise estatística

A partir dos resultados obtidos foram calculadas medidas representativas tais como médias e desvios padrões. Em relação às variáveis diâmetros, área, peso, latência, duração e amplitude, os grupos foram comparados através da técnica da análise de variância. Quando esta análise detectou diferenças significativas, foram aplicados os testes de Tukey e Dunnett para as comparações múltiplas entre as médias. Especificamente, o teste de Dunnett foi utilizado para as comparações envolvendo os tratamentos com o grupo controle. As discussões foram realizadas em nível de 5% de significância⁷³.



4. Resultados

4.1. Massa inicial dos ratos

A média e o desvio padrão da massa inicial dos ratos, em gramas, no grupo 1, foi 184,50 g (+/- 18,35), no grupo 2 foi 187,10 g (+/- 18,57), no grupo 3 foi 190,50 g (+/- 22,35), não apresentando diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$) (Fig.14 e Tab.5).

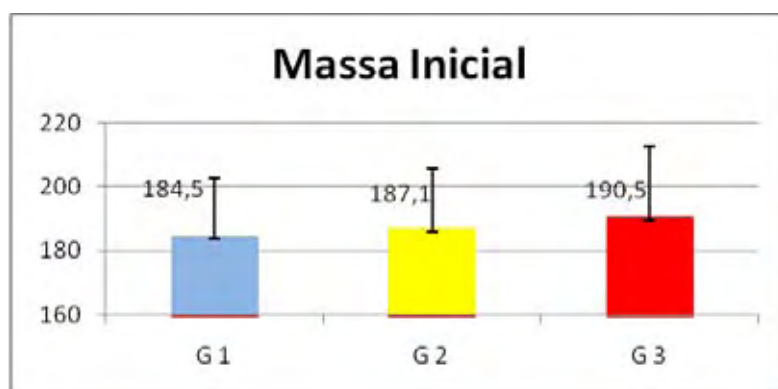


Figura14: Médias das massas iniciais dos ratos

Tabela 5: Grupos, valores médios e desvios padrões referentes à massa inicial dos ratos dos três grupos.

Grupos	Valores médios	Desvios padrões
1	184,50 x	18,35
2	187,10 x	18,57
3	190,50 x	22,35

Para cada variável, médias seguidas da mesma letra não indicam diferenças estatisticamente significativas.

4.2. Massa final dos ratos

A média e o desvio padrão da massa final dos ratos, em gramas, no grupo 1 foi 466,50 g (+/- 50,12), no grupo 2 foi 450,30 g (+/- 32,90), no grupo 3 foi 466,80 g (+/- 53,26), não apresentando diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$) (Fig.15 e Tab.6).

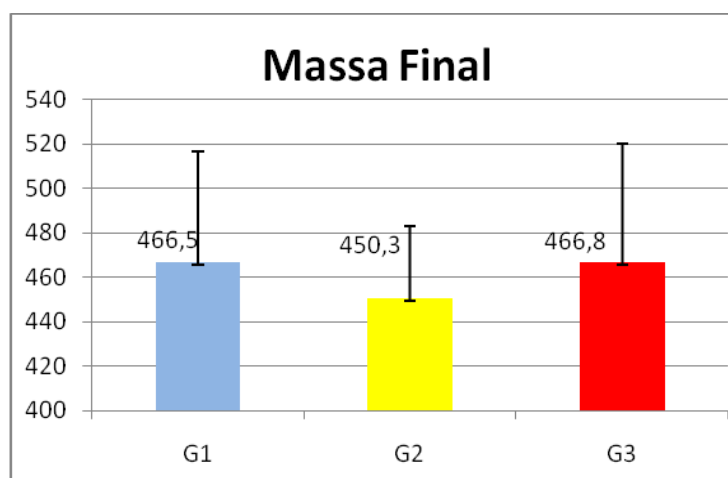


Figura 15: Médias das massas finais dos ratos.

Tabela 6: Grupos, valores médios e desvios padrões referentes à massa final dos ratos dos três grupos.

Grupos	Valores médios	Desvios padrões
1	466,50 x	50,12
2	450,30 x	32,90
3	466,80 x	53,26

Para cada variável, médias seguidas da mesma letra não indicam diferenças estatisticamente significativas.

4.3. Massa do Músculo Tibial Cranial Direito (MTCd)

A média e o desvio padrão da massa do músculo tibial cranial direito, em gramas, no grupo 1 foi 0,82g (+/- 0,10), no grupo 2 foi 0,44g (+/- 0,11), no grupo 3 foi 0,17g (+/- 0,07).

O resultado da análise de variância (ANOVA), para a massa do MTCd, foi significativo em nível de 5% de probabilidade ($p < 0,05$). A diferença foi entre os grupos 1, 2 e 3. Quando comparados os grupos 1, 2 e 3 a diferença foi do grupo 1 superior ao grupo 2 e superior ao grupo 3, sendo este inferior para os demais ($p < 0,05$) (Fig.16 e Tab.7).

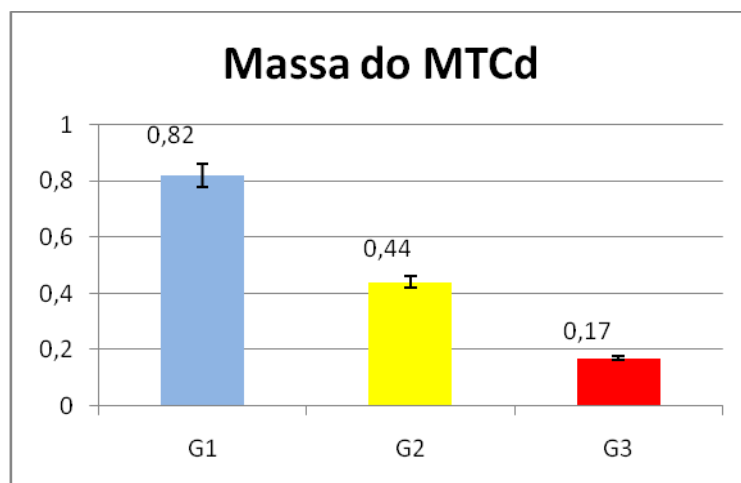


Figura16: Médias das massas dos MTCd, para os grupos 1,2 e 3.

Tabela 7: Grupos, valores médios e desvios padrões referentes à massa do MTCd dos três grupos.

Grupos	Valores médios	Desvios padrões
1	0,82 x	0,10
2	0,44 y	0,11
3	0,17 z	0,07

Para cada variável, médias seguidas da mesma letra não indicam diferenças estatisticamente significativas.

4.4. Massa do Músculo Tibial Cranial Esquerdo (MTCe)

A média e o desvio padrão da massa do músculo tibial cranial esquerdo, em gramas, no grupo 1 foi 0,77g (+/- 0,10), no grupo 2 foi 0,75g (+/- 0,07), no grupo 3 foi 0,76g (+/- 0,11), não apresentando diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$) (Fig.17 e Tab.8).

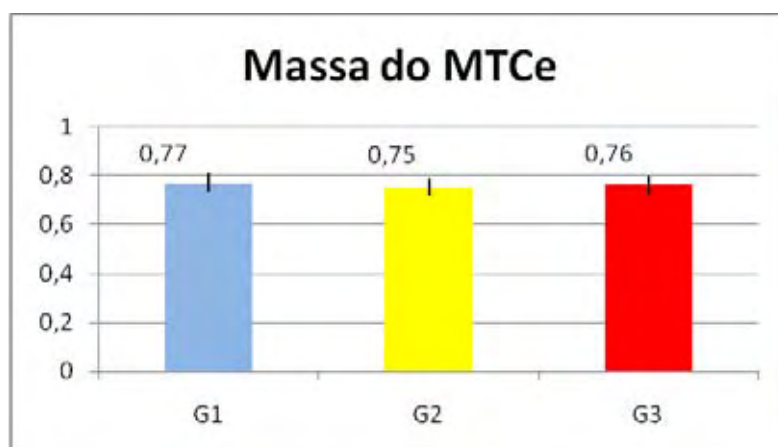


Figura17: Médias das massas dos MTCe, para os grupos 1,2 e 3.

Tabela 8: Grupos, valores médios e desvios padrões referentes à massa do MTCe dos três grupos.

Grupos	Valores médios	Desvios padrões
1	0,77 x	0,10
2	0,75 x	0,07
3	0,76 x	0,11

Para cada variável, médias seguidas da mesma letra não indicam diferenças estatisticamente significativas.

4.5. Massa do Músculo Tibial Cranial Direito x Massa do Músculo Tibial Cranial Esquerdo

O resultado da análise de variância (ANOVA), para a massa do MTCd versus MTCE foi significativo em nível de 5% de probabilidade ($p < 0,05$). A diferença foi entre os grupos 2 e 3 ($p < 0,05$) (Fig.18 e Tab.9).

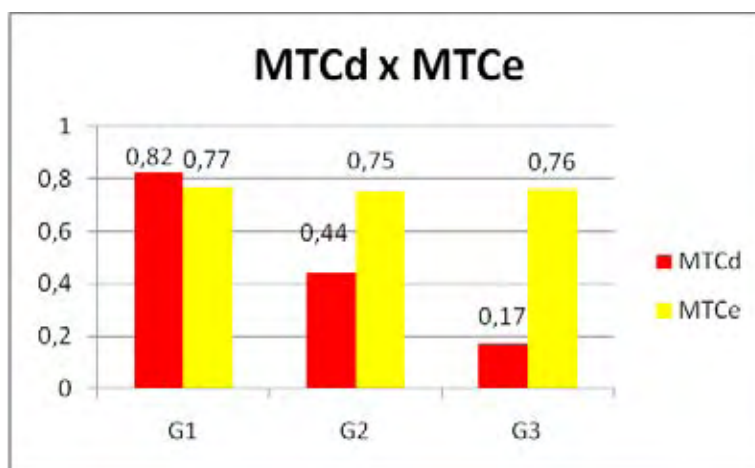


Figura18: Médias das massas dos MTCd x MTCE, para os grupos 1,2 e 3.

Tabela 9: Grupos, valores médios e desvios padrões referentes à massa do MTCd versus MTCE dos três grupos.

Grupos	Valores médios	Desvios padrões	Valores médios	Desvios padrões
	Lado direito	Lado Direito	Lado Esquerdo	Lado Esquerdo
1	0,82 x	0,10	0,77 x	0,10
2	0,44 y	0,11	0,75 xz	0,07
3	0,17 w	0,07	0,76 xv	0,11

Para cada variável, médias seguidas da mesma letra não indicam diferenças estatisticamente significativas.

4.6. Morfometria do Músculo Tibial Cranial Direito

4.6.1. Área das fibras musculares

No grupo 1, a média da área das fibras musculares, em μm^2 , foi de 81,4 (+/- 44,02); no grupo 2 foi de 74,1 (+/- 63,25); no grupo 3 foi de 28,5 (+/- 20,82).

O teste de análise de variância foi aplicado e mostrou diferenças significantes nas comparações entre os grupos. Quando comparamos os grupos, ocorreu diferença entre o grupo 3, que teve média inferior aos demais grupos ($p < 0,05$) (Fig.19 e Tab.10).

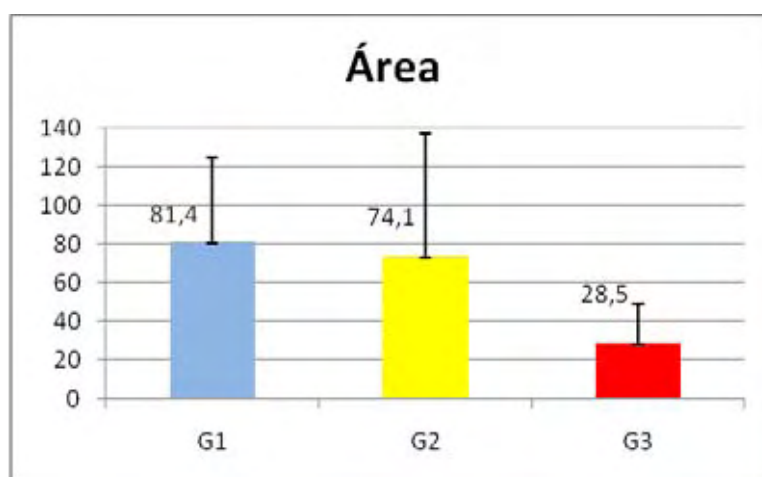


Figura 19: Médias das áreas das fibras do músculo tibial cranial direito.

Tabela 10: Grupos, valores médios e desvios padrões referentes à área das fibras do MTCd dos três grupos.

Grupos	Valores médios	Desvios padrões
1	81,4 x	44,02
2	74,1 x	63,25
3	28,5 y	20,82

Para cada variável, médias seguidas da mesma letra não indicam diferenças estatisticamente significativas.

4.6.2. Diâmetro mínimo das fibras musculares

No grupo 1, a média e o respectivo desvio padrão do diâmetro mínimo das fibras musculares, em μm , foi de 8,3 (+/- 18,01); no grupo 2 foi de 7,9 (+/- 33,59); no grupo 3 foi de 2,9 (+/- 15,86).

O resultado da análise de variância para esta variável indicou diferenças significativas ($p < 0,05$). O grupo 3 foi inferior e diferente dos demais. Não houve diferenças entre os grupos 1 e 2 (Fig.20 e Tab.11).

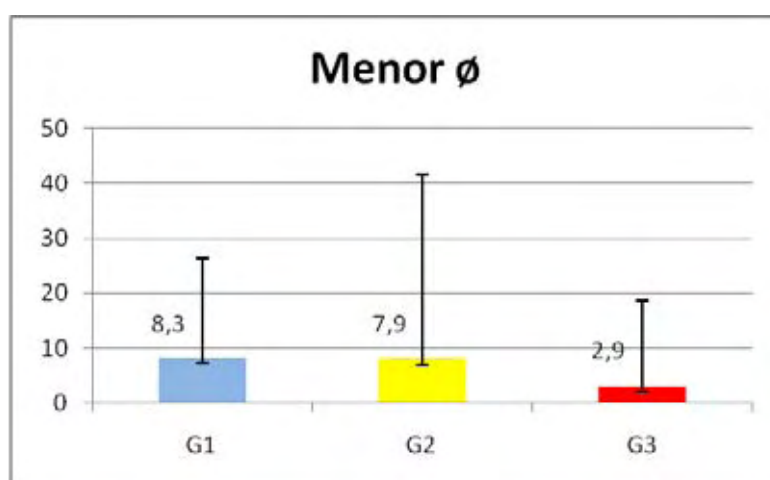


Figura 20: Médias do menor diâmetro das fibras do MTCd.

Tabela 11: Grupos, valores médios e desvios padrões referentes ao menor diâmetro das fibras do MTCd dos três grupos.

Grupos	Valores médios	Desvios padrões
1	8,3 x	18,01
2	7,9 x	33,59
3	2,9 y	15,86

Para cada variável, médias seguidas da mesma letra não indicam diferenças estatisticamente significativas.

4.6.3. Diâmetro máximo das fibras musculares

No grupo 1, a média e o desvio padrão do diâmetro máximo das fibras musculares, em μm , foi de 14,1 (+/- 44,52); no grupo 2 foi de 14,0 (+/- 75,92); no grupo 3 foi de 5,5 (+/- 31,40).

A análise de variância, para o diâmetro máximo, foi significativa ao nível de 5% de significância ($p < 0,05$). Os testes de Tukey e Dunnett foram aplicados e mostraram diferenças significantes nas comparações entre o grupo 3 e os demais. Entre os grupos 1 e 2 não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) (Fig.21 e Tab.12).

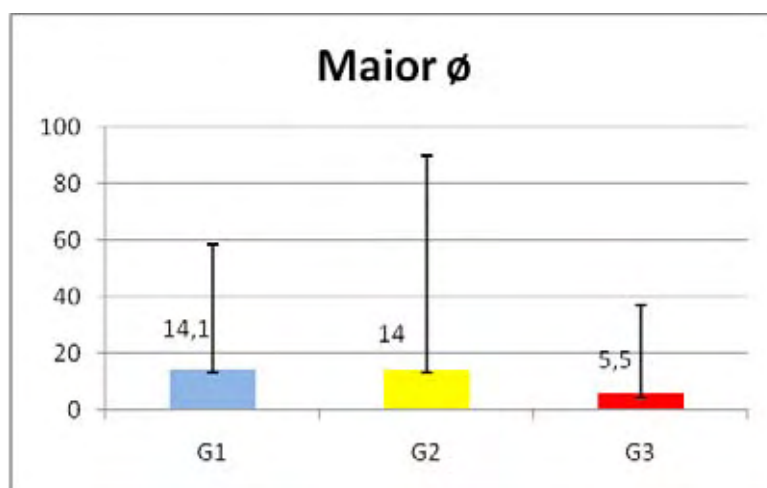


Figura 21: Médias do maior diâmetro das fibras do MTCd.

Tabela 12: Grupos, valores médios e desvios padrões referentes ao maior diâmetro das fibras do MTCd dos três grupos.

Grupos	Valores médios	Desvios padrões
1	14,1 x	44,52
2	14,0 x	75,92
3	5,5 y	31,4

Para cada variável, médias seguidas da mesma letra não indicam diferenças estatisticamente significativas.

4.7. Morfometria do Nervo Fibular Comum Direito

4.7.1. Área das fibras nervosas

No grupo 1, a média da área das fibras nervosas, em μm^2 , foi de 34,2 (+/- 30,18); no grupo 2 foi de 24,7 (+/- 35,96); no grupo 3, no coto proximal foi de 15,3 (+/- 26,12); no coto distal foi de 13,5 (+/- 25,17).

O teste de análise de variância foi aplicado e mostrou diferenças significantes nas comparações entre os grupos. O grupo 1 foi maior que os demais grupos. Não houve diferença entre os grupos 2 e 3 (Fig.22 e Tab.13).

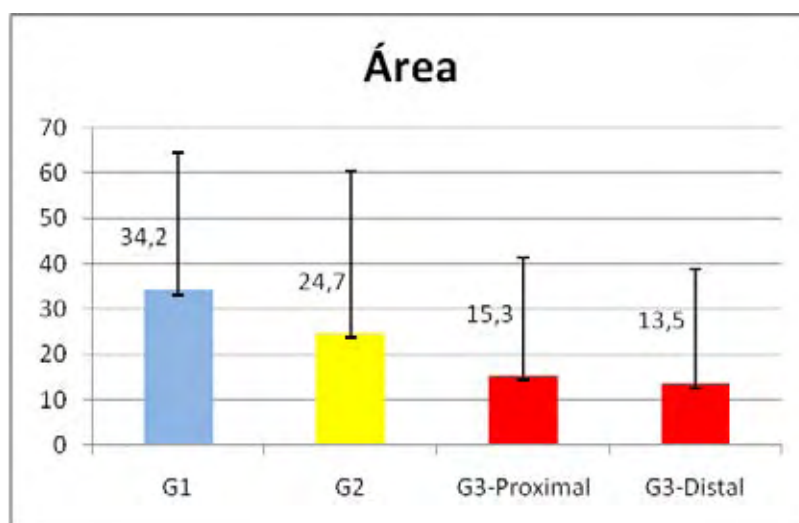


Figura22: Médias das áreas das fibras do nervo fibular comum direito.

Tabela 13: Grupos, valores médios e desvios padrões referentes à área das fibras nervosas do nervo fibular comum direito para os três grupos.

Grupos	Valores médios	Desvios padrões
1	34,2 x	30,1
2	24,7 y	35,9
3-Proximal	15,3 y	26,1
3-Distal	13,5 y	25,1

Para cada variável, médias seguidas da mesma letra não indicam diferenças estatisticamente significativas.

4.7.2. Diâmetro mínimo das fibras nervosas

No grupo 1, a média e o respectivo desvio padrão do diâmetro mínimo das fibras nervosas, em μm , foi de 4,5 (+/- 4,42); no grupo 2, foi de 2,6 (+/- 4,27); no grupo 3, no coto proximal foi de 2,0 (+/- 3,3), no coto distal foi de 1,8 (+/- 4,1).

O resultado da análise de variância para esta variável indicou diferenças entre os grupos. O grupo 1 foi maior que os demais grupos. Não houve diferença entre os grupos 2 e 3 (Fig.23 e Tab14).

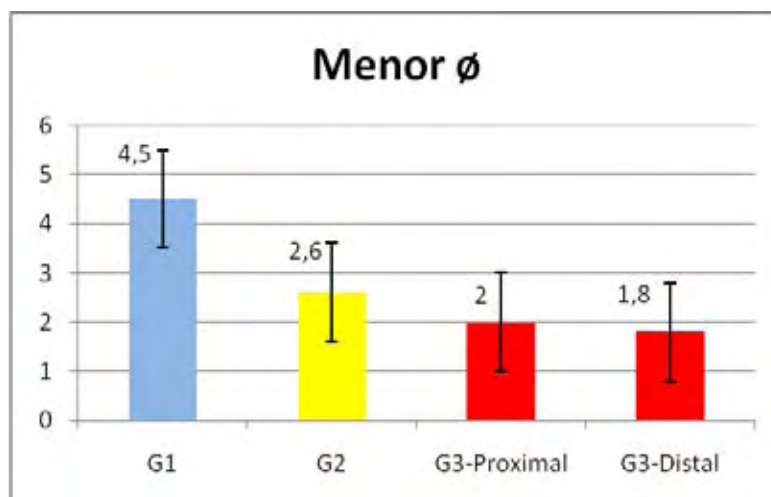


Figura 23: Médias do menor diâmetro das fibras do nervo fibular comum direito.

Tabela 14: Grupos, valores médios e desvios padrões referentes ao menor diâmetro das fibras nervosas do nervo fibular comum direito para os três grupos.

Grupos	Valores médios	Desvios padrões
1	4,5 x	4,4
2	2,6 y	4,2
3-Proximal	2,0 y	3,3
3-Distal	1,8 y	4,1

Para cada variável, médias seguidas da mesma letra não indicam diferenças estatisticamente significativas.

4.7.3. Diâmetro máximo das fibras nervosas

No grupo 1, a média e o desvio padrão do diâmetro máximo das fibras nervosas, em μm , foi de 6,1 (+/- 9,2); no grupo 2 foi de 4,8 (+/- 7,1); no grupo 3, no coto proximal foi de 2,8 (+/- 5,0); no coto distal foi de 2,6 (+/- 4,6).

O teste de análise de variância foi aplicado e mostrou diferenças significantes nas comparações entre os grupos. O grupo 1 foi maior que os demais grupos. Não houve diferença entre os grupos 2 e 3 (Fig.24 e Tab.15).

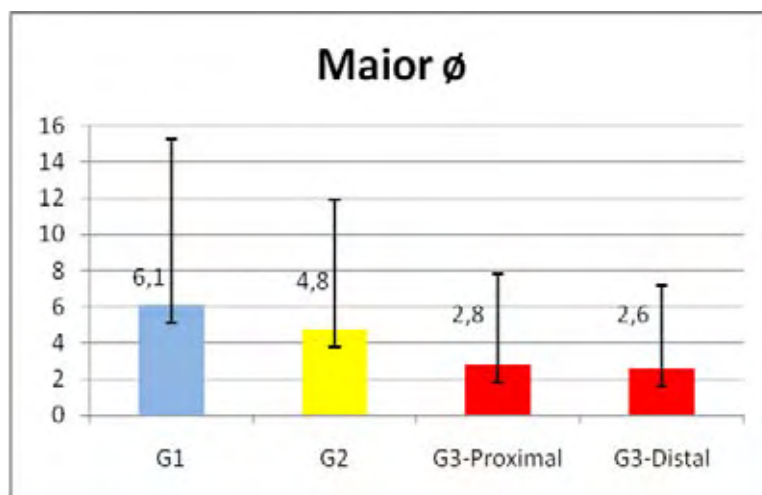


Figura 24: Médias do maior diâmetro das fibras do nervo fibular comum direito.

Tabela 15: Grupos, valores médios e desvios padrões referentes ao maior diâmetro das fibras nervosas do nervo fibular comum direito para os três grupos.

Grupos	Valores médios	Desvios padrões
1	6,1 x	9,2
2	4,8 y	7,1
3-Proximal	2,8 y	5,0
3-Distal	2,6 y	4,6

Para cada variável, médias seguidas da mesma letra não indicam diferenças estatisticamente significativas.

4.8. Contagem do número de fibras musculares por campo

No grupo 1, a média da contagem do número de fibras musculares foi de 25,95 (+/- 6,1); no grupo 2 foi de 27,00 (+/- 7,73) e no grupo 3 foi de 138,15 (+/- 58,16).

A análise de variância para a contagem do número de fibras musculares foi significativa ao nível de 5% de significância ($p < 0,05$). Os testes de Tukey e Dunnett foram aplicados e mostraram diferenças significantes nas comparações entre o grupo 3 e os demais. Entre os grupos 1 e 2 não houve diferença (Fig.25 e Tab.16).

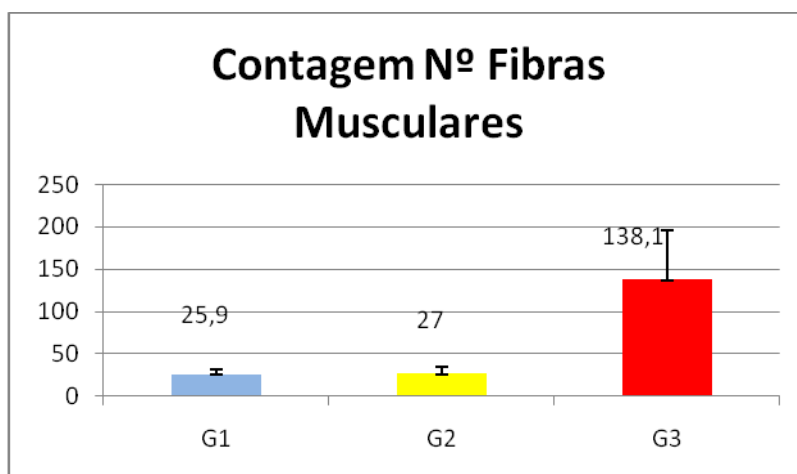


Figura25: Valores médios do número de fibras musculares.

Tabela 16: Grupos, valores médios e desvios padrões referentes à contagem do número de fibras musculares para os três grupos.

Grupos	Valores médios	Desvios padrões
1	25,9 x	6,10
2	27,0 x	7,73
3	138,1 y	58,16

Para cada variável, médias seguidas da mesma letra não indicam diferenças estatisticamente significativas.

4.9. Walking Track Analysis (Exame de Marcha)

4.9.1. De Medinaceli

4.9.1.1. Período pré operatório

Exame funcional e quantitativo da marcha dos ratos do grupo 1 segundo De Medicnaceli (IFI) no período pré operatório a média foi de -7,86 (+/- 23,35); no grupo 2 foi de -16,74 (+/- 33,33) e no grupo 3 foi de -4,88 (+/- 28,10), não apresentando diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$) (Fig.26 e Tab.17).

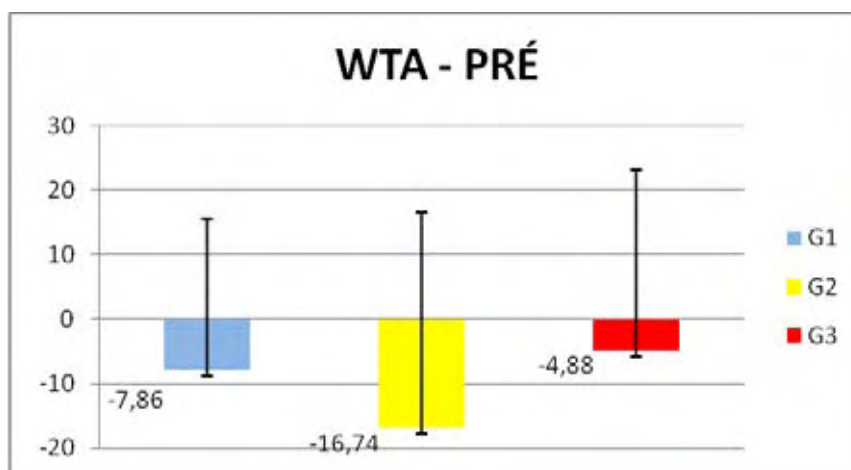


Figura26: Valores médios do WTA- período pré operatório.

Tabela 17: Grupos, valores médios e desvios padrões referentes ao Walking Track Analysis período pré operatório para os três grupos.

Grupos	Valores médios	Desvios padrões
1	-7,86 x	23,35
2	-16,74 x	33,33
3	-4,88 x	28,10

Para cada variável, médias seguidas da mesma letra não indicam diferenças estatisticamente significativas.

4.9.1.2. Período 30 dias- pós operatório

O índice funcional do isquiático no período de 30 dias de pós operatório no grupo 1 a média foi de -6,66 (+/- 36,32); no grupo 2 foi de -32,77 (+/- 48,17) e no grupo 3 foi de -119,28 (+/- 40,84).

A análise de variância para o exame de marcha foi significativa ao nível de 5% de significância ($p < 0,05$). Os testes de Tukey e Dunnett foram aplicados e mostraram diferenças significantes nas comparações entre o grupo 3 e os demais. Entre os grupos 1 e 2 não houve diferença (Fig.27 e Tab.18).

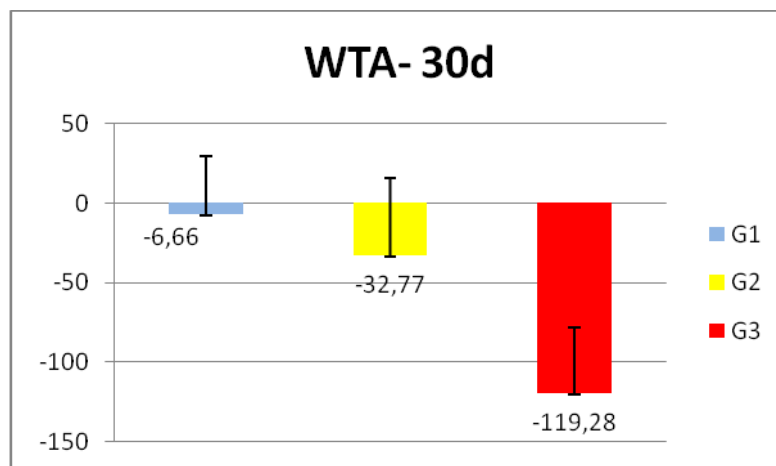


Figura 27: Valores médios do WTA- período 30 dias pós operatório.

Tabela 18: Grupos, valores médios e desvios padrões referentes ao Walking Track Analysis- período 30 dias pós operatório para os três grupos.

Grupos	Valores médios	Desvios padrões
1	-6,66 x	36,32
2	-32,77 x	48,17
3	-119,28 y	40,84

Para cada variável, médias seguidas da mesma letra não indicam diferenças estatisticamente significativas.

4.9.1.3. Período 60 dias- pós operatório

Exame funcional da marcha dos ratos do grupo 1 no período de 60 dias de pós operatório a média foi de -14,65 (+/- 30,03); no grupo 2 foi de -12,18 (+/- 56,19) e no grupo 3 foi de -124,82 (+/- 34,56).

O teste de análise de variância foi aplicado e mostrou diferenças significantes nas comparações entre os grupos. O grupo 3 foi maior que os demais grupos. Não houve diferença entre os grupos 1 e 2 (Fig.28 e Tab.19).

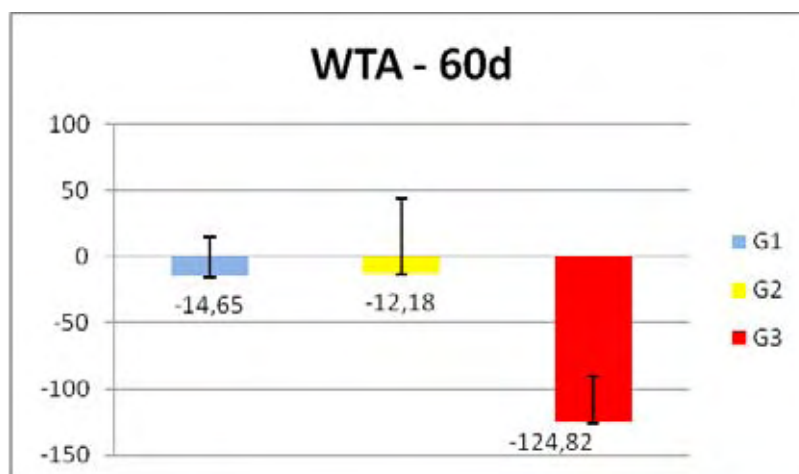


Figura 28: Valores médios do WTA- período 60 dias pós operatório.

Tabela 19: Grupos, valores médios e desvios padrões referentes ao Walking Track Analysis- período 60 dias pós operatório para os três grupos.

Grupos	Valores médios	Desvios padrões
1	-14,65 x	30,03
2	-12,18 x	56,19
3	-124,82 y	34,56

Para cada variável, médias seguidas da mesma letra não indicam diferenças estatisticamente significativas.

4.9.1.4. Período 90dias- pós operatório

O índice funcional do isquiático no período de 90 dias de pós operatório no grupo 1 a média foi de -0,93 (+/- 26,56); no grupo 2 foi de -18,23 (+/- 42,43) e no grupo 3 foi de -124,25 (+/- 35,40).

A análise de variância para o exame de marcha foi significativa ao nível de 5% de significância ($p < 0,05$). Os testes de Tukey e Dunnett foram aplicados e mostraram diferenças significantes nas comparações entre o grupo 3 e os demais. Entre os grupos 1 e 2 não houve diferença (Fig.29 e Tab.20).

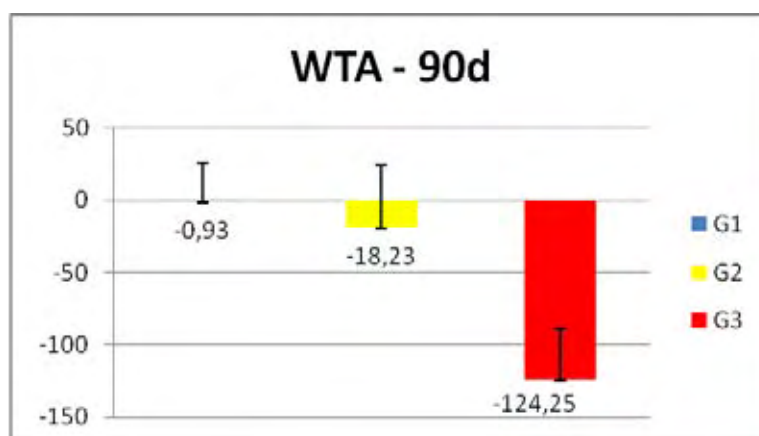


Figura 29: Valores médios do WTA- período 90 dias pós operatório.

Tabela 20: Grupos, valores médios e desvios padrões referentes ao Walking Track Analysis- período 90 dias pós operatório para os três grupos.

Grupos	Valores médios	Desvios padrões
1	-0,93 x	26,56
2	-18,23 x	42,43
3	-124,25 y	35,40

Para cada variável, médias seguidas da mesma letra não indicam diferenças estatisticamente significativas.

4.9.1.5. WTA – Todos os Períodos

Exame funcional da marcha dos ratos em todos os períodos estudados durante a pesquisa está representado na tabela abaixo (Fig.30 e Tab.21).

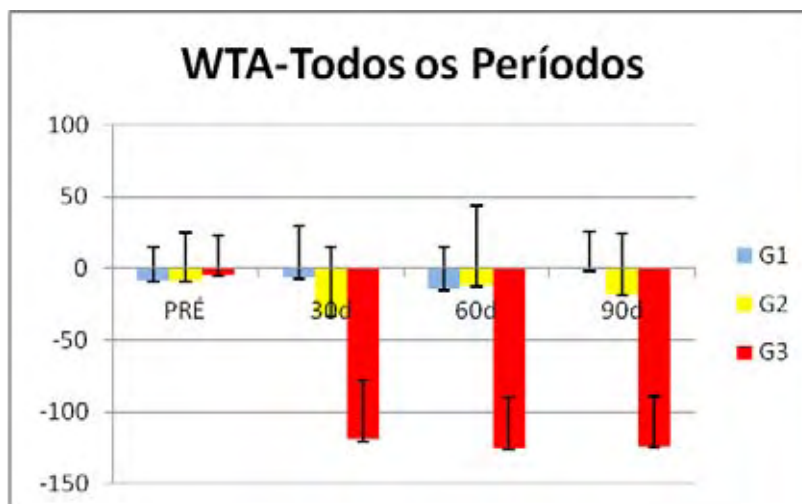


Figura 30: Valores médios do WTA- todos os períodos.

Tabela 21: Grupos e valores médios referentes ao Walking Track Analysis- todos os períodos em estudo

	Pré	30 Dias	60 Dias	90 Dias
Grupo 1	-7,86 x	-6,66 x	-14,65 x	-0,93 x
Grupo 2	-16,74 x	-32,77 x	-12,18 x	-18,23 x
Grupo 3	-4,88 x	-119,28 y	-124,82 y	-124,25 y

Para cada variável, médias seguidas da mesma letra não indicam diferenças estatisticamente significativas.

4.9.2. Bain

4.9.2.1. Período pré operatório

Exame funcional e quantitativo da marcha dos ratos do grupo 1 de acordo com a fórmula de Bain (SFI) no período pré operatório a média foi de 11,51 (+/- 20,74); no grupo 2 foi de 14,26 (+/- 26,18) e no grupo 3 foi de 3,29 (+/- 19,26), não apresentando diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$) (Fig.31 e Tab.22).

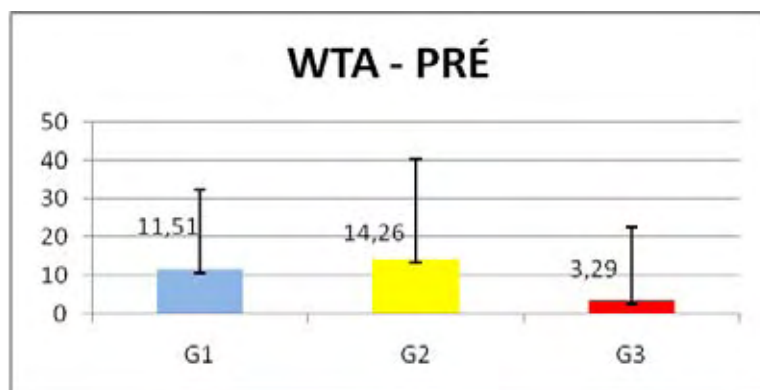


Figura 31: Valores médios do WTA- período pré operatório.

Tabela 22: Grupos, valores médios e desvios padrões referentes ao Walking Track Analysis período pré operatório para os três grupos.

Grupos	Valores médios	Desvios padrões
1	11,51 x	20,74
2	14,26 x	26,18
3	3,29 x	19,26

Para cada variável, médias seguidas da mesma letra não indicam diferenças estatisticamente significativas.

4.9.2.2. Período 30 dias-pós operatório

O índice funcional do isquiático no período de 30 dias de pós operatório no grupo 1 a média foi de 4,25 (+/- 39,08); no grupo 2 foi de -24,98 (+/- 36,56) e no grupo 3 foi de -43,60 (+/- 33,01).

A análise de variância para o exame de marcha foi significativa ao nível de 5% de significância ($p < 0,05$). Os testes de Tukey e Dunnett foram aplicados e mostraram diferenças significantes nas comparações entre o grupo 1 e os demais. Entre os grupos 2 e 3 não houve diferença (Fig.32 e Tab.23).

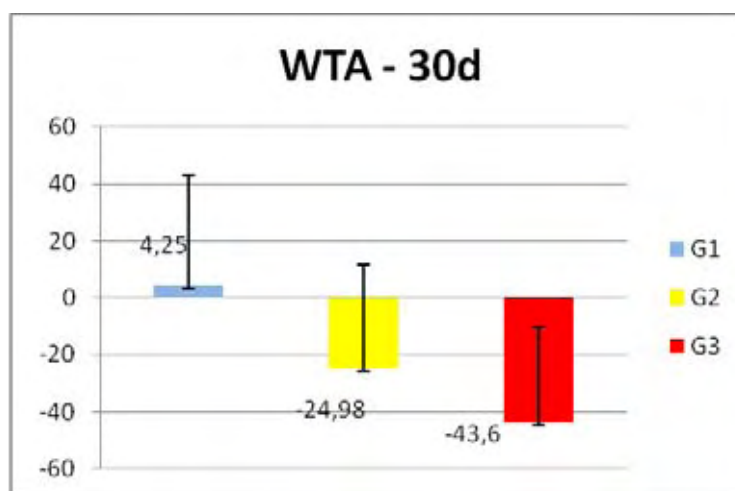


Figura 32: Valores médios do WTA- período 30 dias pós operatório.

Tabela 23: Grupos, valores médios e desvios padrões referentes ao Walking Track Analysis- período 30 dias pós operatório para os três grupos.

Grupos	Valores médios	Desvios padrões
1	4,25 y	39,08
2	-24,98 x	36,56
3	-43,60 x	33,01

Para cada variável, médias seguidas da mesma letra não indicam diferenças estatisticamente significativas.

4.9.2.3. Período 60dias- pós operatório

Exame funcional da marcha dos ratos do grupo 1 no período de 60 dias de pós operatório a média foi de 0,77 (+/- 25,93); no grupo 2 foi de 3,04 (+/- 28,00) e no grupo 3 foi de -37,07 (+/- 40,09).

O teste de análise de variância foi aplicado e mostrou diferenças significantes nas comparações entre os grupos. O grupo 3 foi menor que os demais grupos. Não houve diferença entre os grupos 1 e 2 (Fig.33 e Tab.24).

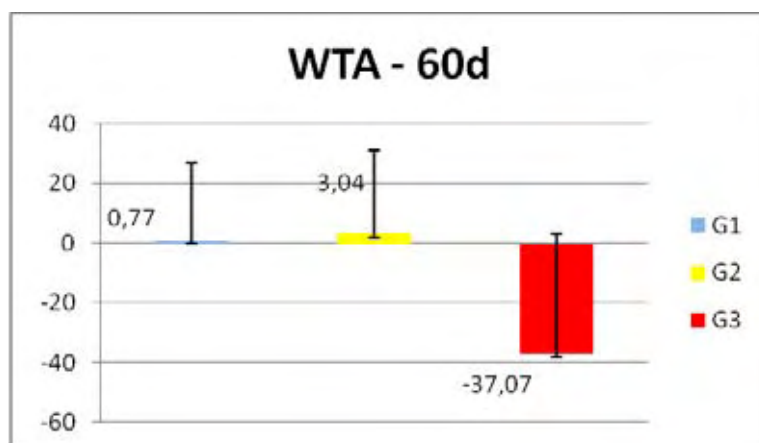


Figura 33: Valores médios do WTA- período 60 dias pós operatório.

Tabela 24: Grupos, valores médios e desvios padrões referentes ao Walking Track Analysis- período 60 dias pós operatório para os três grupos.

Grupos	Valores médios	Desvios padrões
1	0,77 x	25,93
2	3,04 x	28,00
3	-37,07 y	40,09

Para cada variável, médias seguidas da mesma letra não indicam diferenças estatisticamente significativas.

4.9.2.4. Período 90dias- pós operatório

O índice funcional do isquiático no período de 90 dias de pós operatório no grupo 1 a média foi de 10,04 (+/- 28,48); no grupo 2 foi de 10,22 (+/- 17,36) e no grupo 3 foi de -40,30 (+/- 39,98).

A análise de variância para o exame de marcha foi significativa ao nível de 5% de significância ($p < 0,05$). Os testes de Tukey e Dunnett foram aplicados e mostraram diferenças significantes nas comparações entre o grupo 3 e os demais. Entre os grupos 1 e 2 não houve diferença (Fig.34 e Tab.25).

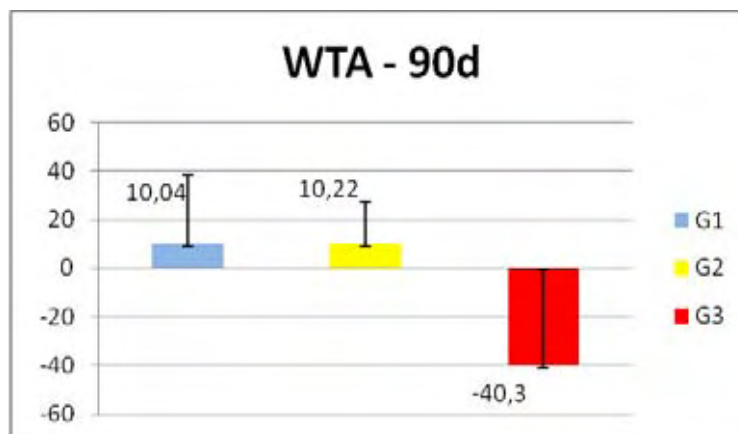


Figura 34: Valores médios do WTA- período 90 dias pós operatório.

Tabela 25: Grupos, valores médios e desvios padrões referentes ao Walking Track Analysis- período 90 dias pós operatório para os três grupos.

Grupos	Valores médios	Desvios padrões
1	10,04 x	28,48
2	10,22 x	17,36
3	-40,30 y	39,98

Para cada variável, médias seguidas da mesma letra não indicam diferenças estatisticamente significativas.

4.9.2.5. WTA–Todos os Períodos

Exame funcional da marcha dos ratos em todos os períodos estudados durante a pesquisa está representado na tabela abaixo (Fig.35 e Tab.26).

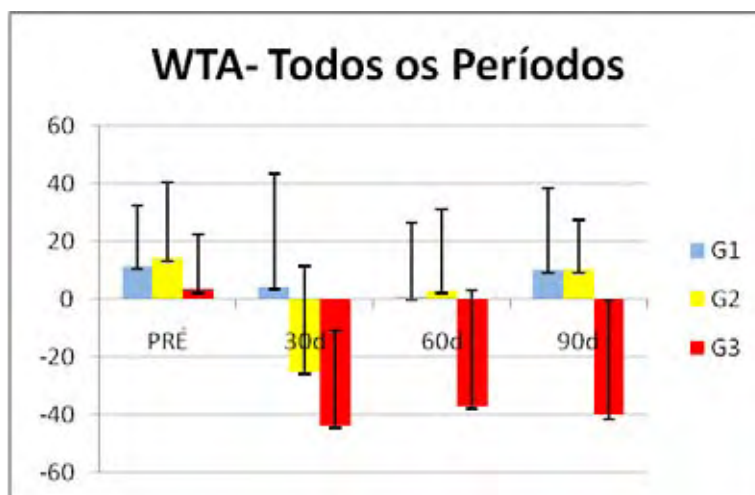


Figura 35: Valores médios do WTA- todos os períodos.

Tabela 26: Grupos e valores médios referentes ao Walking Track Analysis- todos os períodos em estudo

	Pré	30 Dias	60 Dias	90 Dias
Grupo 1	11,51 x	4,25 y	0,77 x	10,04 x
Grupo 2	14,24 x	-24,98 x	3,04 x	10,22 x
Grupo 3	3,29 y	-43,60 x	-37,07 y	-40,30 y

Para cada variável, médias seguidas da mesma letra não indicam diferenças estatisticamente significativas.

4.10. Análise Neurofisiológica - condução nervosa motora

4.10.1. Momento 1 (Logo após o procedimento cirúrgico)

Latência

A média e o desvio padrão da latência, em ms, no grupo 1 foi de 1,61 (+/- 0,11), no grupo 2 foi 3,18 (+/- 1,81), no grupo 3 foi 2,45 (+/- 1,93).

A análise de variância para latência foi significativa ao nível de 5% de significância ($p < 0,05$). Os testes de Tukey e Dunnett foram aplicados e mostraram diferenças significantes nas comparações entre os grupos. O grupo 1 foi menor que os demais grupos. Entre os grupos 2 e 3 não houve diferença (Fig.36 e Tab.27).

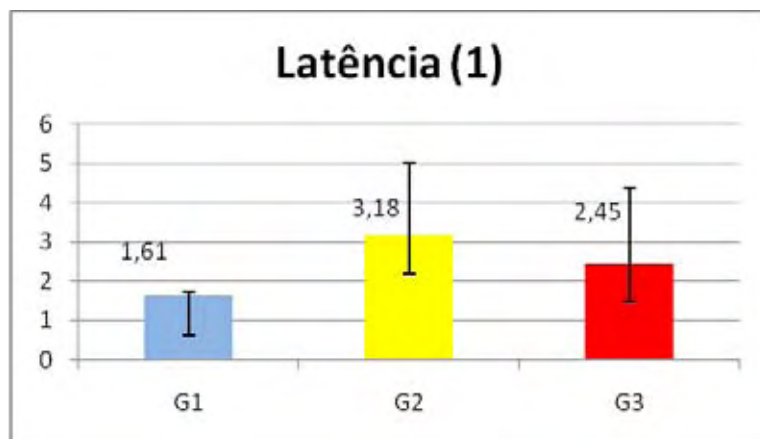


Figura 36: Valores médios da Latência.

Tabela 27: Grupos, valores médios e desvios padrões referentes à latência dos três grupos.

Grupos	Valores médios	Desvios padrões
1	1,61 x	0,11
2	3,18 y	1,81
3	2,45 y	1,93

Para cada variável, médias seguidas da mesma letra não indicam diferenças estatisticamente significativas.

Duração

A média e o desvio padrão da duração, em ms, no grupo 1 foi 2,11 (+/- 0,51), no grupo 2 foi 5,06 (+/- 4,49), no grupo 3 foi 3,69 (+/- 3,13).

A análise de variância para duração foi significativa ao nível de 5% de significância ($p < 0,05$). Os testes de Tukey e Dunnett foram aplicados e mostraram diferenças significantes nas comparações entre os grupos. O grupo 1 foi menor que os demais grupos. Entre os grupos 2 e 3 não houve diferença (Fig.37 e Tab.28).

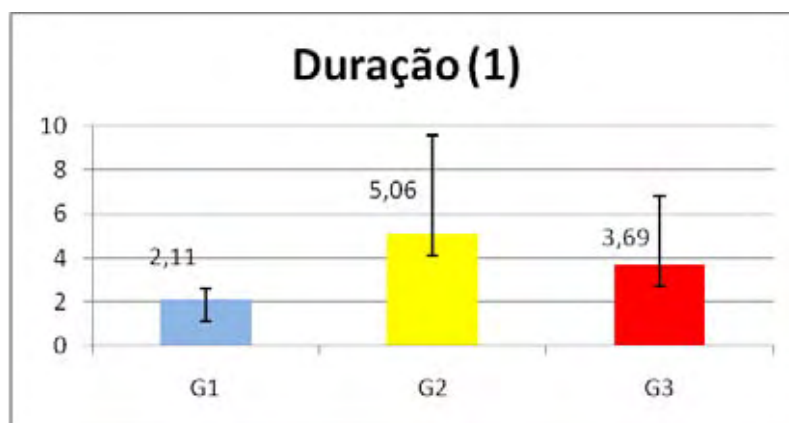


Figura 37: Valores médios referentes à duração.

Tabela 28: Grupos, valores médios e desvios padrões referentes à duração dos três grupos.

Grupos	Valores médios	Desvios padrões
1	2,11 x	0,51
2	5,06 y	4,49
3	3,69 y	3,13

Para cada variável, médias seguidas da mesma letra não indicam diferenças estatisticamente significativas.

Amplitude

A média e o desvio padrão da amplitude, em milivolts, no grupo 1 foi 24,58 (+/- 7,64), no grupo 2 foi 4,83 (+/- 9,13), no grupo 3 foi 3,36 (+/- 3,06).

O teste ANOVA para a amplitude do potencial de ação muscular dos ratos dos grupos em estudo apresentou diferenças significativas ($p < 0,05$). A diferença ocorreu entre o grupos 1 para os demais. Entre os grupos 2 e 3 não houve diferença (Fig.38 e Tab.29).

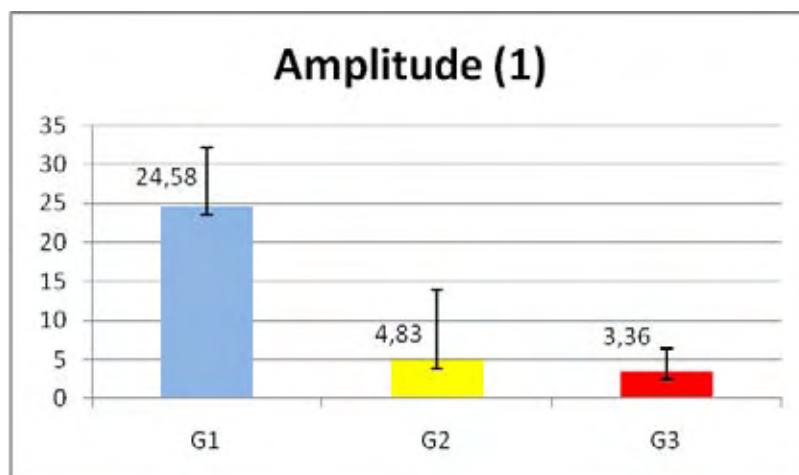


Figura 38: Valores médios referentes à amplitude.

Tabela 29: Grupos, valores médios e desvios padrões referentes à amplitude dos três grupos.

Grupos	Valores médios	Desvios padrões
1	24,58 x	7,64
2	4,83 y	9,13
3	3,36 y	3,06

Para cada variável, médias seguidas da mesma letra não indicam diferenças estatisticamente significativas.

4.10.2 Momento 2 (Antes do Sacrifício)

Latência

A média e o desvio padrão da latência, em ms, no grupo 1 foi de 1,94 (+/- 0,58), no grupo 2 foi 2,69 (+/- 2,52), no grupo 3 foi 3,24 (+/- 2,59), não apresentando diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$) (Fig.39 e Tab.30).

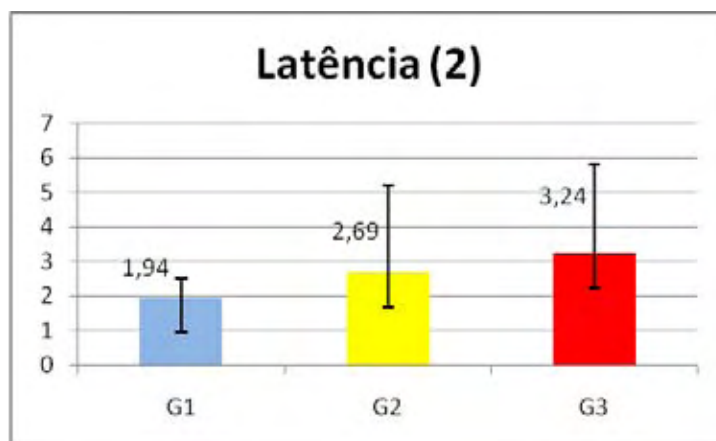


Figura 39: Valores médios da Latência.

Tabela 30: Grupos, valores médios e desvios padrões referentes à latência dos três grupos.

Grupos	Valores médios	Desvios padrões
1	1,94 x	0,58
2	2,69 x	2,52
3	3,24 x	2,59

Para cada variável, médias seguidas da mesma letra não indicam diferenças estatisticamente significativas.

Duração

A média e o desvio padrão da duração, em ms, no grupo 1 foi 2,89 (+/- 1,20), no grupo 2 foi 3,30 (+/- 1,30), no grupo 3 foi 5,40 (+/- 3,04).

A análise de variância para duração foi significativa ao nível de 5% de significância ($p < 0,05$). Os testes de Tukey e Dunnett foram aplicados e mostraram diferenças significantes nas comparações entre os grupos. O grupo 3 foi maior que os demais grupos. Entre os grupos 1 e 2 não houve diferença (Fig.40 e Tab.31).

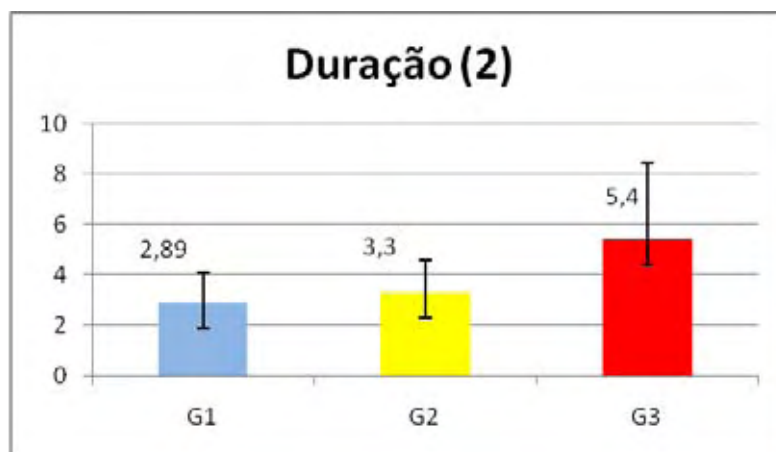


Figura 40: Valores médios referentes à duração.

Tabela 31: Grupos, valores médios e desvios padrões referentes à duração dos três grupos.

Grupos	Valores médios	Desvios padrões
1	2,89 x	1,20
2	3,30 x	1,30
3	5,40 y	3,04

Para cada variável, médias seguidas da mesma letra não indicam diferenças estatisticamente significativas.

Amplitude

A média e o desvio padrão da amplitude, em milivolts, no grupo 1 foi 25,71 (+/- 12,39), no grupo 2 foi 16,77 (+/- 10,61), no grupo 3 foi 3,94 (+/- 5,24).

O teste ANOVA para a amplitude do potencial de ação muscular dos ratos dos grupos em estudo apresentou diferenças significativas ($p < 0,05$) (Fig.41 e Tab.32).

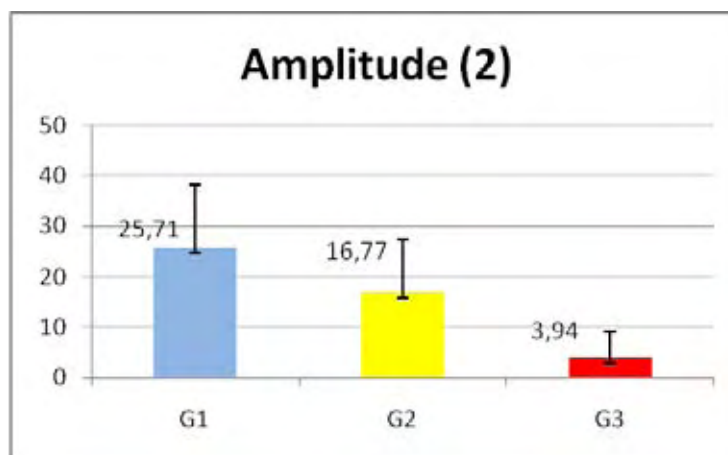


Figura 41: Valores médios referentes à amplitude.

Tabela 32: Grupos, valores médios e desvios padrões referentes à amplitude dos três grupos.

Grupos	Valores médios	Desvios padrões
1	25,71 x	12,39
2	16,77 y	10,61
3	3,94 z	5,24

Para cada variável, médias seguidas da mesma letra não indicam diferenças estatisticamente significativas.

4.11. Exame Neurofisiológico/ambos os momentos

O resultado da análise de variância (ANOVA), para a latência, duração e amplitude do potencial de ação muscular comparado-se os dois momentos, 1 e 2, foi significativo em nível de 5% de probabilidade ($p < 0,05$) (Tab.33).

Tabela 33: Grupos, valores médios referentes à latência, duração e amplitude do momento 1 versus momento 2 dos três grupos.

	Latência (1)	Latência (2)	Duração (1)	Duração (2)	Amplitude (1)	Amplitude (2)
G1	1,61 x	1,94 y	2,11 x	2,89 y	24,58 x	25,71 x
G2	3,18 x	2,69 x	5,06 x	3,30 y	4,83 x	16,77 y
G3	2,45 x	3,24 x	3,69 x	5,40 x	3,36 x	3,94 x

Para cada variável, médias seguidas da mesma letra não indicam diferenças estatisticamente significativas.

4.12. Temperatura

Momento 1 – Início do Experimento

A média e o desvio padrão para temperatura, em graus Celsius, no grupo 1 foi 34,58 (+/- 1,56), no grupo 2 foi 34,38 (+/- 1,52), no grupo 3 foi 34,45 (+/- 1,11), não apresentando diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$) (Fig.42 e Tab.34).

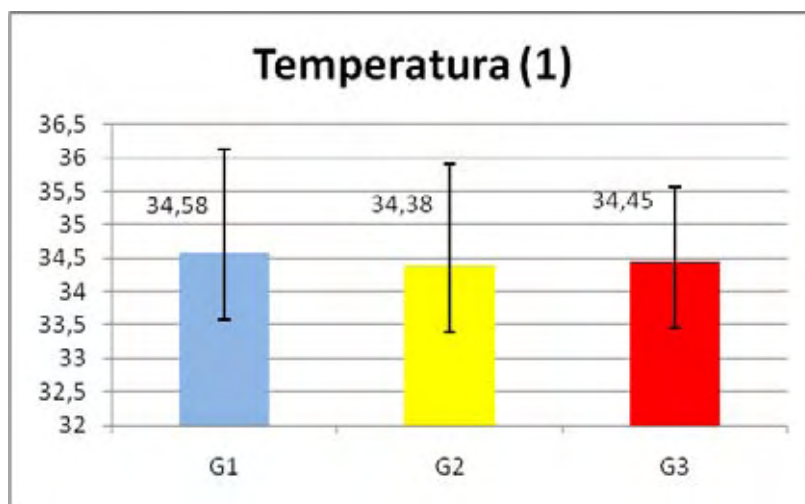


Figura 42: Valores médios referentes à temperatura.

Tabela 34: Grupos, valores médios e desvios padrões referentes à temperatura dos três grupos.

Grupos	Valores médios	Desvios padrões
1	34,58 x	1,56
2	34,38 x	1,52
3	34,45 x	1,11

Para cada variável, médias seguidas da mesma letra não indicam diferenças estatisticamente significativas.

Momento 2 – Antes do Sacrifício

A média e o desvio padrão para temperatura, em graus Celsius, no grupo 1 foi 33,81 (+/- 1,58), no grupo 2 foi 33,48 (+/- 1,47), no grupo 3 foi 32,67 (+/- 1,33), não apresentando diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$) (Fig.43 e Tab.35).

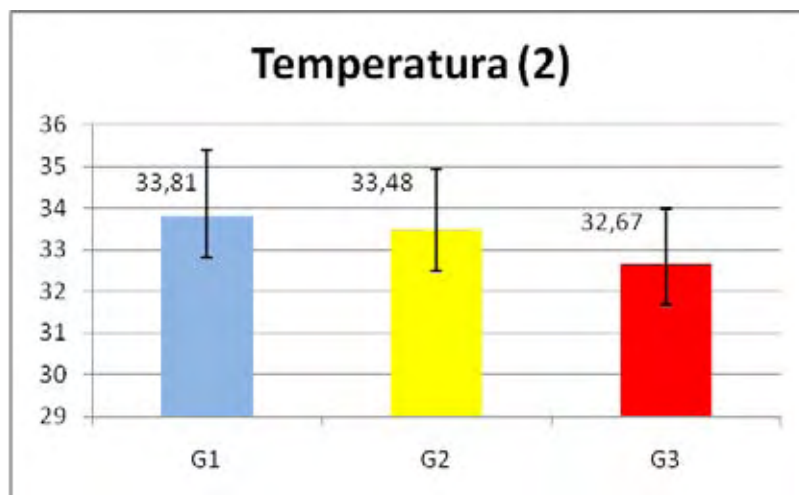
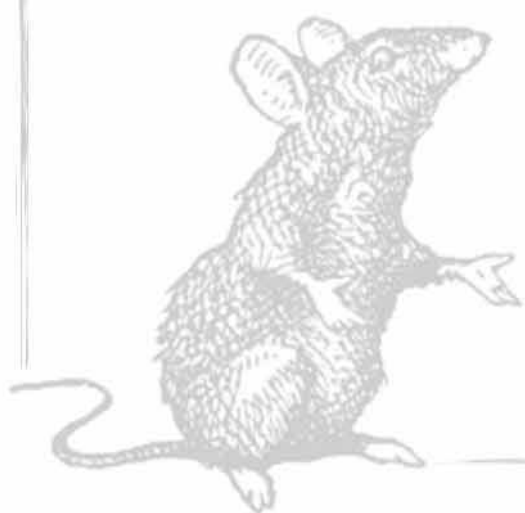


Figura 43: Valores médios referentes à temperatura.

Tabela 35: Grupos, valores médios e desvios padrões referentes à temperatura dos três grupos.

Grupos	Valores médios	Desvios padrões
1	33,81 x	1,58
2	33,48 x	1,47
3	32,67 x	1,33

Para cada variável, médias seguidas da mesma letra não indicam diferenças estatisticamente significativas.



5. Discussão

5.1. Discussão do Método

O rato foi escolhido para este estudo por ser animal resistente, que ocupa pouco espaço, vantagem que se acentua em amostras de número elevado e estudos de longa duração, o que está em concordância com Ellis & MaCaffrey⁷⁴. Além disso, as estruturas morfológicas dos nervos periféricos dos ratos se assemelham muito às dos nervos dos seres humanos, no qual a regeneração nervosa natural desses animais é muito rápida e pode atingir o normal⁷⁵.

Os animais eram todos do sexo masculino, para que não houvesse interferência das variações hormonais presentes no sexo feminino. Este cuidado tem sido tomado por diversos outros autores^{29,76}.

Optou-se pelo nervo fibular por ser de fácil acesso e único a inervar o músculo tibial cranial. Assim, alterações determinadas neste nervo repercutem-se neste músculo^{29,77}.

A morfometria, mais especificamente a aferição da área, diâmetros máximo e mínimo das fibras musculares, foi utilizada por exprimir o trofismo destas fibras. A contagem das fibras musculares por campo microscópico foi empregada por ser método rápido, fácil na sua execução e também expressar o trofismo destas fibras⁷⁸.

A principal meta do estudo da regeneração nervosa é descobrir uma técnica adequada de reparo em lesões de nervos periféricos que traga como resultado a recuperação funcional das estruturas por ele inervadas. Com isso, o Walking Track Analysis foi escolhido por representar o aspecto funcional do músculo¹⁰.

Foi mensurada a temperatura, pois existem estudos que relatam a interferência da temperatura corporal e podem provocar reações diversas nos animais podendo assim mascarar resultados cruciais para o estudo⁸⁰.

O estudo neurofisiológico foi utilizado por representar o estado trófico e funcional do músculo, tendo sido empregado por inúmeros autores^{52,53,79}. Quando ocorrem desnervações, há decréscimo dos potenciais de unidades motoras e na reinervação estes potenciais aumentam de amplitude⁵².

A escolha pelo eletrodo de agulha deu-se pela necessidade de detecção dos potenciais eletromiográficos individuais. Quando se utilizam eletrodos de superfície, o exame determina apenas atividade motora, ao contrário dos eletrodos de agulha,

que além de averiguar a atividade motora, registram se a inervação está normal ou não⁵³. Além disso, o eletrodo de agulha extrai os dados específicos do músculo em estudo sem interferências de outras estruturas, ao contrário da utilização de eletrodos de superfície que podem não atingir única e exclusivamente o músculo e/ou nervo requerido⁸⁰.

5.2. Discussão dos resultados

5.2.1. Massa inicial e final dos ratos

A massa inicial e final dos ratos dos três grupos estudados não mostrou diferenças estatísticas, comprovando-se, assim, a homogeneidade da amostra. Este detalhe é muito importante em estudos onde a massa de algum músculo é avaliada, pois a mesma, habitualmente, corresponde à massa do animal²⁹.

A homogeneidade da massa final mostra também que os procedimentos cirúrgicos não prejudicaram o estado geral nutricional dos animais.

5.2.2. Massa do músculo tibial cranial

Direito

A massa do músculo tibial cranial direito mostrou diferenças entre os grupos. Este resultado era esperado. O grupo 1, controle de normalidade foi o maior e o grupo 3, controle de desnervação, o menor, ambos corresponderam às expectativas. No grupo 2, no qual houve a lesão nervosa foi inferior ao grupo 1 (normalidade) e superior ao grupo 3 (desnervado), ou seja, intermediário.

A massa do músculo tibial cranial do grupo 2, após 90 dias de lesão, foi inferior ao grupo 1 e superior ao grupo 3 (normal e desnervado, respectivamente), mostrando que o método de lesão nervosa foi eficiente para obter-se lesão parcial no músculo tibial cranial.

Este achado é de extrema importância, pois pela primeira vez obteve-se lesão muscular parcial após 90 dias, o que sugere que foi permanente em lesões nervosas parciais. Estes resultados abrem caminhos e/ou possibilidades para trabalho e

pesquisas em lesões musculares parciais que ocorrem em paralisias faciais, em lesões de plexo braquial, enfim, diversas outras patologias musculares.

Estudos com eletroestimulação em lesões parciais e também cirurgias determinando neurotização muscular direta nestes músculos poderão agora ser realizadas, pois agora existe modelo experimental adequado.

Esquerdo

A massa do músculo tibial cranial esquerdo não mostrou diferenças entre os grupos. Este resultado também era esperado, pois nos serviu de controle muscular contra lateral. Os músculos tibiais craniais esquerdos não sofreram nenhuma intervenção cirúrgica.

O fato do músculo tibial cranial esquerdo não ter mostrado diferença revela que os procedimentos realizados do lado direito não trouxeram prejuízos a este músculo.

Direito X Esquerdo

Quando comparamos o músculo tibial direito com o esquerdo observamos diferenças estatisticamente significativas entre as massas em ambos os grupos de estudo.

O único grupo do lado direito que não foi diferente do lado esquerdo foi o grupo 1, controle de normalidade, demonstrando equivalência no trofismo muscular, o que já era esperado pois este animal não sofreu nenhum procedimento cirúrgico.

Os músculos dos grupos 2 e 3 do lado direito foram diferentes dos respectivos músculos contralaterais. Como era esperado o grupo 3 mostrou diferença maior do que o grupo 2, já que o trofismo muscular neste último foi maior do que aquele.

5.2.3. Temperatura

Os resultados da temperatura nos dois momentos estudados não apresentaram diferenças estatisticamente significativas. Dados estes que revelam que os animais se mantiveram numa temperatura padrão durante os procedimentos e que, quando encontradas diferenças morfológicas e /ou funcionais estas não são decorrentes de uma possível alteração térmica. Fator de suma importância em se tratando de avaliação eletrofisiológica, pois isso já está demonstrado que a temperatura altera os resultados nestes estudos.

5.2.4. Morfometria do músculo tibial cranial direito

Em relação à área das fibras musculares, o grupo 1 foi superior ao grupo 3 e semelhante ao grupo 2. Este achado reflete que o número de axônios diminuiu pela lesão provocada no nervo dos ratos do grupo 2 e, esse número de axônios menor determinou atrofia de um significativo número de fibras musculares, mas as fibras remanescentes mantiveram a sua morfometria. Podemos atribuir estes resultados por dois fatores. O primeiro deles é que não foram analisadas todas as fibras de cada músculo, sendo analisadas amostras de fibras e certamente seriam obtidos números diferentes. A segunda hipótese é que o desvio padrão para este atributo foi elevado e alguns destes valores interferiram na análise estatística.

Vale ressaltar aqui que não foram aferidas todas as fibras musculares de cada músculo pelo número elevado de lâminas. A opção por amostragem foi adotada tentando suprir esta dificuldade.

O maior e menor diâmetro estão diretamente relacionados à área das fibras musculares, portanto os resultados foram semelhantes aos achados descritos anteriormente para a área.

De acordo com Junqueira & Carneiro⁸¹, o aumento da área e do diâmetro indica o trofismo muscular. Assim os baixos valores encontrados no grupo 3 indicam atrofia muscular.

5.2.5. Contagem do número de fibras musculares

Com relação à contagem do número de fibras musculares, observou-se o mesmo comportamento encontrado na morfometria do músculo tibial cranial direito. Os grupos 1 e 2, controle de normalidade e grupo operado respectivamente, não apresentaram diferenças estatisticamente significativas, enquanto o grupo 3 foi superior aos demais. Embora pouco utilizado, este atributo, introduzido em 1989 por Viterbo e cols., ou seja, a contagem das fibras que aparecem por inteiro num determinado campo microscópio ou na tela de um monitor, é método sensível e rápido na sua execução.

5.2.6. Morfometria do nervo fibular comum direito

Em relação à área das fibras nervosas, houve diferenças estatisticamente significativas. O grupo 1 foi superior aos grupos 2 e 3. Não houve diferença quando comparamos o grupo 2 ao grupo 3.

Os resultados do maior e menor diâmetro das fibras nervosas acompanharam a área. Isto indica que o corte foi feito com pouca inclinação, o que demonstra a alta qualidade da técnica histológica empregada.

Uma hipótese para estes achados é que a amostragem foi insuficiente para detectar as possíveis alterações.

5.2.7. Estudo neurofisiológico

No resultado referente à latência, no momento 1, o grupo 1 teve resultado menor que os demais grupos. Este fato, aliado a não termos encontrado diferenças entre os grupos 2 e 3 reflete que este atributo é sensível a qualquer lesão nervosa, esmagamento ou secção. Entretanto, não foi sensível suficiente para detectar alterações entre os diferentes momentos 1 e 2, no qual no momento 2 esta diferença não foi estatisticamente significativa.

Os resultados, do primeiro momento, estão de acordo com Stashuk⁸³, segundo o qual o aumento da latência reflete retardo de condução elétrica.

Quanto à duração do potencial de ação motor composto, as diferenças foram estatisticamente significativas. Qualquer processo patológico que diminua a velocidade de condução de uma porção dos axônios pode causar aumento na

duração do PAMC⁵³. As diferenças encontradas nos dois momentos demonstram evidências que este atributo não tem especificidade adequada para detectar as alterações estudadas.

Estudos eletrofisiológicos concluíram que ratos mais jovens possuem uma melhor regeneração funcional quando comparados com os ratos idosos. Presumivelmente pela maior capacidade de seu sistema nervoso central em se adaptar as novas situações⁸⁴.

Em relação à amplitude do potencial de ação muscular, os resultados apresentaram diferenças significativas entre os grupos 1, 2 e 3. De acordo com a literatura, a patologia nervosa que reduz o número de axônios ativos resultaria em uma atenuação da amplitude.

Fica claro neste atributo a sensibilidade em detectar uma recuperação parcial no trofismo muscular do grupo 2, o qual sofreu lesão. Após 90 dias sua amplitude demonstrou melhora suficientemente superior ao grupo desnervado, mas aquém do grupo normal, evidenciando-se assim a lesão parcial.

5.2.8. Análise Funcional da Marcha/ Walking Track Analysis

Na maioria dos estudos que envolvem regeneração de nervos periféricos são utilizados métodos histológicos e morfométricos. Métodos estes de grande importância estrutural, mas aquém com relação às informações sobre a recuperação funcional do órgão alvo.

O método de avaliação funcional tem se mostrado um instrumento confiável para avaliar o processo de regeneração nervosa periférica, pois tem baixo custo e é de fácil aplicabilidade⁷¹. Existem ainda métodos mais confiáveis e precisos com análises computadorizadas, mas são de alto custo e de difícil aquisição e requerem tempo para manuseio do equipamento e treinamento prolongado para operacionalização dos sistemas⁸⁵⁻⁸⁷.

Para a avaliação da recuperação funcional, utilizamos neste estudo o Índice Funcional do Ciático (IFC), desenvolvido por De Medinaceli et al.⁴⁰ e modificado posteriormente por outros autores^{39,66}, permitindo assim avaliar de forma satisfatória a recuperação do nervo ciático, tibial e fibular em função do tempo. Foram empregados neste estudo dois métodos de avaliação; o método De Medinaceli et al.⁴⁰ associado ao método de Bain et al.³⁹.

As imagens coletadas foram pré selecionadas e analisadas por um mesmo avaliador através da análise cega, no qual o avaliador não tinha conhecimento de qual grupo pertencia a imagem avaliada.

Na avaliação funcional da marcha no período pré operatório, em ambas as fórmulas (De Medinaceli et al.⁴⁰ e Bain et al.³⁹) não atingiu o valor zero. Nos casos em que não há lesão este valor não é atingido. Quando isso ocorre, atribui-se à falhas na utilização das fórmulas⁷¹.

A avaliação funcional da marcha no período de 30 dias após cirurgia, em ambas as fórmulas, ocorrem perdas funcionais, onde os valores distanciam-se do zero, nos grupo 2 e 3. Ao contrário do grupo 1, controle de normalidade, que se aproxima do valor zero.

Quando analisamos os períodos seguintes, 60 e 90 dias, as fórmulas se contradizem. Conforme De Medinaceli et al.⁴⁰, nos grupos 2 e 3 os valores continuam se distanciando do marco zero, enquanto que na fórmula de Bain et al.³⁹ nestes respectivos grupos, 2 e 3, começam a ocorrer melhora funcional no período de 60 dias e é reproduzida com 90 dias. Isto indica que a fórmula de Bain et al.³⁹ foi mais sensível ao detectar esta melhora funcional.

Analisando conjuntamente os resultados, podemos destacar a sensibilidade dos atributos como a massa do músculo tibial cranial, a amplitude do potencial de ação muscular e o walking track analysis segundo a fórmula de Bain et al.³⁹ para detectar a recuperação funcional e delimitar a lesão parcial.

A importância dos resultados deste trabalho, nas diversas aplicações clínicas, nas desnervações parciais como nos casos de paralisias faciais, lesões de plexos braquiais dentre outros, merece destaque, pois com este modelo podemos introduzir inúmeras intervenções, clínicas ou cirúrgicas com finalidades regenerativas, pensando não somente nos aspectos estruturais do órgão lesado, mas sim em sua funcionalidade.



6. Conclusão

Com o modelo experimental utilizado, conclui-se que:

- A lesão parcial realizada no nervo fibular comum determinou lesão parcial no músculo tibial cranial.
 - O teste de Bain et al.³⁹ foi mais sensível que o teste de De Medinaceli et al.⁴⁰.
 - A amplitude do potencial de ação muscular, a massa do músculo tibial cranial e a análise de marcha (teste de Bain et al.³⁹) foram mais sensíveis do que os outros atributos.
-



7. Referências Bibliográficas

-
1. Machado A. Neuroanatomia Funcional. 2ªEd: Atheneu, São Paulo, 2004.
 2. Sunderland S. Nervios perifericos y sus lesions. 2ª ed: Salvat, Barcelona, 1985.
 3. <http://www.euniverso.com.br/Psyche/Psicologia/neuropsi/neuronios.htm>
 4. Girolami U, Anthony DC, Frosch MP. Nervo periférico e músculo esquelético. In: Cotran RS; Kuman V, Collins T. Robbins, Patologia Estrutural e Funcional. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro 2000; 1135-1154.
 5. Lundborg G, Dhalin LB, Danielsen N, Nachemson AK. Tissue specificity in nerve regeneration. Scandinavian journal of Plastic and Reconstructive Surgery 1986; 20:279-283.
 6. Ramón Y Cajal S. Degeneration and regeneration of the nervous system. London: Oxford University Press, 1928.
 7. Viterbo F, Faleiros HRP. Técnicas de neurorrafia. In: Mélega JM. Cirurgia Plástica: Fundamentos e Arte. Medsi: Rio de Janeiro 2002; 477-483.
 8. Eberstein A, Eberstein S. Electrical stimulation of denervated muscle: is it worthwhile? Med Sci Sports Exerc 1996;28(12):1463-9.
 9. Novak CB, Mackinnon SE, Baratz ME. Peripheral nerve injuries. eMedicine World Medical Library 2002; 18: 1-10.
 10. Seddon H J. Three types of nerve injury. Brain, Oxford, 1943(66): 37-288.
 11. Siqueira R. Lesões nervosas periféricas: uma revisão. Rev Neurocienc 2007;15/3:226–233
 12. Lee SK, Wolfe SW. Peripheral nerve injury and repair. Am Acad Ortho Surg 2000;8(4):243-52.
-

-
13. Terenghi G. Peripheral nerve regeneration and neurotrophic factors. *J Anat Neurosci* 1999;194:1-14.
 14. Müller HW, Stoll G. Nerve injury, axonal degeneration and neural regeneration: basic insights. *Brain Pathol* 1999;9:313-25.
 15. Fawcett JW, Keynes RJ. Peripheral Nerve Regeneration. *Ann Rev Neurosci* 1990;13:43-60.
 16. Al-Majed AA, Tam SL, Gordon T. Electrical stimulation accelerates and enhances expression of regeneration-associated genes in regenerating rat femoral motoneurons. *Cell Mol Neurobiol* 2004;24:379-402.
 17. Krueger-Beck E, Scheeren EM, Nogueira Neto GN, Nohama P. Electric and magnetic fields applied to peripheral nerve regeneration. *Rev Neurocienc* 2010.
 18. Cartarozzi, L. P.; Zanon, R. G.; Oliveira, A. L. R. Regeneração nervosa periférica após esmagamento do nervo ciático e tratamento com interferon beta. Departamento de Anatomia, Instituto de Biologia - UNICAMP; CNPq.
 19. Phelps, C.H. (1990). Neural plasticity in aging and Alzheimer's disease: Some selected comments. *Progress In Brain Research*, 86, 3-10.
 20. <http://www.drauziovarella.com.br/ExibirConteudo/1033/plasticidade-neuronal>
 21. Frostick SP, Yin Q, Kemp GJ. Schwann cells, neurotrophic factors and peripheral nerve regeneration. *Microsurgery*. 1998 (18): 397-405.
 22. Santos NB. Estudo da regeneração axonal em enxerto sensitivo (n. sural) autólogo a partir de nervo craniano intacto (n. vago). [dissertação]. Bauru: Universidade de São Paulo: 2007.
 23. Bishop DL, Milton RL. The effects of denervation location on fiber type mix in self-reinnervated mouse soleus muscles. *Exp Neurol* 1997; 147: 151-8.
-

-
24. Welch JA. Pheripheral nerve injury. *Seminars in veterinary medicine and surgery (small animal)* 1996; 11(4): 273-84.
 25. Robinson LR. Traumatic injury to peripheral nerves. *Muscle Nerve* 2000; 23: 863-73.
 26. Smith JW. Microsurgery of nerves peripheral. *Plast Reconstr Surg* 1964; 33:317-329.
 27. Ballance CA. Some results of nerve anastomosis. *Br. J. Surg. London* 1923; 11: 327-346.
 28. Waller AV. Nouvelle méthod pour l'etude de système nerveus applicable à l'investigation de la distribution anatomique des cordons nerveus. *C. R. Acad. Sci. Paris* 1851; 33: 606-611.
 29. Viterbo F. Neurorrafia látero-terminal, estudo experimental no rato. [Tese de Doutorado]. Botucatu: Faculdade de Medicina-Universidade Estadual Paulista; 1992a.
 30. Bersaneti JA. Análise da reinervação muscular mediante enxerto de nervo em um e dois tempos operatórios: estudo experimental em ratos, utilizando a neurorrafia término-lateral. [dissertação]. Botucatu: Faculdade de Medicina-Universidade Estadual Paulista; 2001.
 31. Sherren J. Some points in the surgery of the peripheral nerves. *Edinb. Med. J. Edinburgh* 1906; 20: 297-332.
 32. Viterbo F. Cross-face termino-lateral: a new method for treatment of facial palsy. In: *Annual scientific meeting plastic surgical forum, Washington* 1992b; 61: 356-8.
 33. Viterbo F. End-to-side nerve anastomosis with and without epineurum. Experimental and clinical experience. In: *Grand round the plastic surgery, Birmingham. Birmingham: University of Alabama* 1992c.
-

-
34. Viterbo F. Cross-face termino-lateral neurorraphy: a new method for treatment of facial palsy. In: Annual meeting America society of reconstructive microsurgery 1993a; 9: 64.
 35. Viterbo F. Novo método para o tratamento da paralisia facial: o “cross-face nerve” com neurorrafia término-lateral. Revista da Sociedade Brasileira de Cirurgia Plástica e Estética Reconstructora 1993b; 8: 36-8.
 36. Viterbo F, Sálvio AG, Viterbo BG. The embrancing end-to-side neurorraphy: an experimental study in rats. In: Annual scientific meeting plastic surgical forum, San Francisco 1997a; 66: 356-8.
 37. Viterbo F, Hammond R, Johnson PC, Hong C, Cooper T, Futrel W. Morphometric evaluation of neuroma size: end-to-side loop neurorraphy versus simple transaction. In: Annual scientific meeting plastic surgical forum, San Francisco 1997b; 66: 359-61.
 38. Viterbo F, Texeira E, Hoshino K, Padovani CR. End-to-side neurorraphy with and without perineurin. Revista Paulista de Medicina 1998; 116: 1808-1814.
 39. Bain JR, Mackinnon SE, Hunter RT. Funcional evaluation of complete sciatic, peroneal e posterior tibial nerve lesions in the rat. Plastic and Reconst. Surgery 1989; 83: 129-138.
 40. De Medinacelli L, Freed WJ, Wyatt RJ. An index of the functional condiction of rat sciatic nerve based on measurements made from walking tracks. Exp. Neuro 1982; 77: 6634-643.
 41. Bridge PM, Ball DJ, Mackinnon SE, Nakao Y, Brandt K, Hunter DA, Hertl C. Nerve crush injuries: a model for axonotmesis. Exp Neurol 1994; 127: 284-90.
 42. Ciges M, Flores LD, Aguado DL. Degeneration and regeneration in experimental facial nerve paralysis. Acta Otolaryngol 1981; 91: 487-496.
-

-
43. Romão A M, Viterbo F, Stipp E, Garbino J A, Rodrigues J A. Eletroestimulação do músculo tibial cranial após esmagamento do nervo fibular comum: estudo neurofisiológico e morfométrico no rato. *Revista Brasileira de Ortopedia*. 2007; 3:41-46.
 44. Garbino JA; Virmond M; Almeida JA. Nerve conduction study technique in the armadillo. *Hansen Int*. 21: 10-13, 1996.
 45. Spector JG; Lee P; Derby, A. Rabbit facial nerve regeneration in autologous nerve grafts after antecedent injury. *Laryngoscope* 110:660-667, 2000.
 46. Askar I; Sabuncuoglu BT; Yormuk E; Saray A. The fate of neurotization techniques on reinnervation after denervation of the gastrocnemius muscle: an experimental study. *Journal of Reconstructive Microsurgery* 17(5):347-355, 2001.
 47. Yan YH; Yan JG; Sanger JR; Zhang LL; Riley DA; Matloub HS. Nerve repair at different angles of attachment: experiment in rats. *Journal of Reconstructive Microsurgery* 18(8):703-708, 2002.
 48. Papakonstantinou KC; Shiamishis G; Bates M; Terzis JK. Distraction osteogenesis using IGF-I after nerve microreconstruction. *Journal of Reconstructive Microsurgery* 18(5):401-410, 2002.
 49. Hayashi A; Yanai A; Komuro Y; Nishida; Inoue M; Seki T. Collateral sprouting occurs following end-to-side neurorrhaphy. *Plastic and Reconstructive Surgery* 114(1):129-137, 2004.
 50. Robinson AJ; Kellog, R. Estudo clínico eletrofisiológico. In: Robinson AJ; Snyder-Mackler L. *Eletrofisiologia clínica. Eletroterapia e teste eletrofisiológico*. 2ª ed., p. 319, 2002.
 51. Bacheschi LA; Nitrini R. Exames complementares em neurologia. In: Nitrini R; Bacheschi L. *A neurologia que todo o médico deve saber*, SP- Maltese, cap. 4, p.77, 1991.
-

-
52. Finsterer J. EMG-interference pattern analysis. *Journal of Electromyography and Kinesiology* 2001; 11: 231-246.
 53. Robinson JA, Snyder-Mackler L. *Eletrofisiologia Clínica: Eletroterapia e teste eletrofisiológico*. 2^aed. Artmed: Porto Alegre, 2001.
 54. Silverstein H, McDaniel AB, Hyman SM. Evoked serial electromyography in the evaluation of the paralysed face. *Am J Otol* 1985; 11: 80-7.
 55. Brodal A. *Anatomia neurológica com correlações clínicas*. 3^a. ed. Maris MS. São Paulo: Roca, 1984, 902p.
 56. Johnson EO, Zoubos AB, Soucacos PN. Regeneration and repair of peripheral nerves. *Int J Care Injured* 2005;36(4S):24-9.
 57. Fu SY, Gordon T. The celular and molecular basis of peripheral nerve regeneration. *Mol. Neurobiol.* 1997(14): 67-116.
 58. Lundborg G. Nerve regeneration and repair. *Acta Orthop. Scan.* 1987 (58): 145-69.
 59. Frisén J. Determinants of axonal regeneration. *Histology Histopathology.* 1997(12): 857-68.
 60. Schmalbruch H, Lewis DM. Dinamics of nuclei of muscle fibers and connective tissue cells in normal and denervated rat muscles. *Muscle Nerve* 2000; 23: 617-26.
 61. Carter A-J, Kristmundsdottir F, Gilmour J, Glasby MA. Changes in muscle cytoarchitecture after peripheral nerve injury and repair. *J Hand Surg* 1998; 23B(3): 265-69.
 62. Viterbo F, Trindade JCS, Dal Pai V, Cury PR. Contagem do número de fibras musculares por campo microscópico: um método simples e eficiente no estudo da desnervação. *Revista da Sociedade Brasileira de Cirurgia Plástica* 1989; 4: 4-14.
-

-
63. Gersh MR. *Electrotherapy in Rehabilitation*. F. A. Davis Company, Philadelphia, 1992.
 64. Monte-Raso VV, Barbieri CH, Mazzer N, Fazan VPS. Os efeitos do ultra-som terapêutico nas lesões por esmagamento do nervo ciático de ratos: análise funcional da marcha. *Rev. bras. fisioter.* vol.10 no.1 São Carlos 2006.
 65. Campbell WW. Evaluation and management of peripheral nerve injury. *Clin Neurophysiol* 2008;119:1951-65.
 66. Carlton JM, Goldberg NH. Quantitating integrated muscle function following reinnervation. *Surg Forum* 1986; 37: 611-12.
 67. Oliveira EF, Mazzer N, Barbieri CH, Selli M. Correlation between functional index and morphometry to evaluate recovery of the rat sciatic nerve following crush injury: experimental study. *J Reconstr Microsurg* 2001; 17(1): 69-75.
 68. Gutmann E, Gutmann L. Factors affecting recovery of sensory function after nerve lesion. *Journal of Neurology and Psychiatry*. London: 1942(5):117-129.
 69. Hruska R, Kennedy S, Silbergeld E.K. Quantitative aspects of normal locomotion in rats. *Life Sci* 1979; 25: 171–179.
 70. Newby-Schmidt MB, Norton S. Detection of subtle effects on the locomotor ability of the chicken. *Neurotoxicol Teratol* 1981;3:45–48.
 71. Costa J, André E. S, Camargo V. M. Desenvolvimento de um método de baixo custo para avaliação da marcha em ratos. [dissertação]. Ribeirão Preto: Faculdade de Medicina-Universidade de São Paulo; 2009.
 72. Sarikcioglu L, Demirel B.M, Utuk A. Walking track analysis: an assessment method for functional recovery after sciatic nerve injury in the rat. *Folia Morphol* 2008; 68(1):1–7.
 73. Vieira S. *Estatística Experimental*. 2ª ed: Atlas, São Paulo, 1999.
-

-
74. Ellis JC, McCaffrey TV. Animal model for peripheral nerve grafting. *Otolaryngol. Head Neck Surg.* 1984(92): 546-550.
 75. Mazzer PYCN, Barbieri CH, Mazzer N, Fazan VS. Avaliação qualitativa e quantitativa das lesões agudas por esmagamento do nervo isquiático do rato. *Acta Ortop Bras.* 2006(14): 220-5.
 76. Sullivan JC, Davison CA. Gender differences in the effect of age on electrical field stimulation (EFS)-induced adrenergic vasoconstriction in rat mesenteric resistance arteries. *J Pharmacol Exp Ther.* 2001; 296(3):782-8.
 77. Greene EC. *Anatomy of the rat.* New York: Hafner 1963: 53-170.
 78. Viterbo F, Trindade JCS, Dal Pai V, Cury PR. Contagem do número de fibras musculares por campo microscópico: um método simples e eficiente no estudo da desnervação. *Revista da Sociedade Brasileira de Cirurgia Plástica* 1989; 4: 4-14.
 79. Godoy BO. Estudo eletromiográfico funcional da neurocondução motora em nervo ciático e músculo gastrocnêmio de ratos, antes e após neurotomia. [dissertação]. São José dos Campos: Universidade do Vale do Paraíba; 2003.
 80. Smorto MP, Basmajian, JV. *Clinical Electroneurography: an introduction to nerve conduction tests.* The Williams & Wilkins Company: Baltimore, 1972.
 81. Junqueira LC, Carneiro J. *Histologia Básica.* 9ªed. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 1999.
 82. McAllister RM, Calder JS. Paradoxical clinical consequences of peripheral nerve injury: a review of anatomical, neurophysiological and psychological mechanisms. *British J. Plast. Surgery.* 1995(48): 384-95.
 83. Stashuk D. EMG signal decomposition: how can it be accomplished and used? *Journal of Electromyography and Kinesiology* 2001(11): 151-173.
-

-
84. Bharalli LA, Lisney SJW. Success of regeneration of peripheral nerve axons in the rats after injury at different postnatal ages. *J Neurol*. 1990 (100): 203-10.
 85. Lin FM, Pan YC, Hom C, Sabbahi M, Shenaq S. Ankle stance angle: a functional index for the evaluation of sciatic nerve recovery after complete transaction. *Journal of Reconstructive Microsurgery*. 1996 (12): 173-177.
 86. Bervar M. Video analysis of standing- an alternative footprint analysis to assess functional loss following injury to the rat sciatic nerve. *Journal of Neuroscience Methods*. 2000 (102): 109-116.
 87. Varejão ASP, Cabrita AM, Geuna S, Pinto PM, Filipi VM, Gramsbergen A, Meek MF. Toe out angle: a functional index for the evaluation of sciatic nerve recovery in the rat model. *Experimental Neurology*. 2003 (183): 695-699.
-