UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

**ESTUDO EXPERIMENTAL DOS EFEITOS DO ULTRA-SOM
PULSADO DE BAIXA INTENSIDADE SOBRE A
REGENERAÇÃO DO NERVO CIÁTICO DE RATOS APÓS
NEUROTOMIA, MEDIANTE AVALIAÇÕES MORFOLÓGICAS
E MORFOMÉTRICAS**

Dissertação apresentada à Área
Interunidades – Escola de Engenharia
de São Carlos/ Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto,
Universidade de São Paulo, para
obtenção do grau de **Mestre em
Bioengenharia**

Orientador: Prof. Dr. Affonso Luiz Ferreira

Ana Rosa Crisci

SÃO CARLOS
2001

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Tratamento
da Informação do Serviço de Biblioteca – EESCUSP

C932e Crisci, Ana Rosa
Estudo experimental dos efeitos do ultra-som
pulsado de baixa intensidade sobre a regeneração do
nervo ciático de ratos após neurotomia, mediante
avaliações morfológicas e morfométricas / Ana Rosa
Crisci. -- São Carlos, 2001.

Dissertação (Mestrado) -- Escola de Engenharia de
São Carlos/Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-
Universidade de São Paulo, 2001.

Área interunidades: Bioengenharia.
Orientador: Prof. Dr. Afonso Luís Ferreira.

1. Ultra-som pulsado de baixa intensidade. 2. Nervo
periférico.
3. Regeneração. I. Título.

Há duas formas para viver sua vida.

Uma é acreditar que não existe milagre

A outra é acreditar que todas as coisas são um milagre.

Albert Eistein

Dedicatória

Aos meus pais, **Vera e Francisco Crisci**,
por toda uma vida de amor e dedicação.

Ao meu marido, **Omar Cozac**,
pelo amor e cumplicidade sempre.

Aos meus filhos, **Omar e Mariana**,
pela alegria e motivação constantes.

À minha irmã, **Vera Lúcia**,
pelo exemplo de perseverança.

À **Alexandra e Fábio** que, pelo convívio,
tomaram-se filhos também.

A todos os **meus alunos** que, pela
solicitação, incentivaram-me
a ser cada vez melhor.

Agradecimento Especial

Ao Prof. Dr. **Affonso Luiz Ferreira**,

pela orientação segura,
pela proposição do tema,
pela formação científica e ética,
pelo seu valor como professor,
pela sua simplicidade, caráter e humildade.

Agradeço por todas as oportunidades e por nossa verdadeira amizade.

O mestre que caminha à sombra do templo, rodeado de discípulos, não dá de sua
sabedoria, mas sim de sua fé e de sua ternura.

Se ele for verdadeiramente sábio, não vos convidará a entrar na mansão de seu
saber, mas vos conduzirá antes ao limiar de vossa própria mente...

Gibran Khalil Gibran

Agradecimentos

Ao Centro Universitário Barão de Mauá de Ribeirão Preto que proporcionou condições para a realização deste trabalho, especialmente pelo apoio e incentivo do Dr. **Valter de Paula**.

Aos amigos e coordenadores dos cursos do Centro Universitário Barão de Mauá de Ribeirão Preto, **Marcelo Zini, Sílvio Cecchi, Dácio Campos, Joyce Gabrielli, Adalberto Gonçalves, Paulo Fransechini e Mário Hathayde**; pela compreensão nos momentos de mudança no horário das aulas.

Ao amigo **Dyjalma Antônio Bassoli**, pelo exemplo de otimismo e perseverança sempre.

Ao grande amigo e mestre **Luiz Alberto Trindade**, pela orientação segura da indicação dos testes estatísticos aplicados no experimento.

À grande amiga, professora Dra. **Wendy Carswell**, pela revisão do abstract.

Ao grande amigo professor, Dr. **José Nicolau Gregorin Filho**, pelas correções ortográficas e leitura deste trabalho.

Aos professores Dr. **Nilton Mazzer** e Dr. **Orivaldo Lopes da Silva** pelas valiosas sugestões feitas no exame de qualificação.

Aos grandes mestres Dr. **José Marcos Alves**, Dr. **Orivaldo Lopes da Silva** e Dr. **Paulin**, pela maneira com que conduziram seus cursos de ciências exatas para biólogos.

Aos funcionários da Bioengenharia de São Carlos, **Marielza, Mário e Nelson** pela dedicação, em especial à **Janete** sempre muito prestativa e dedicada.

Aos funcionários da Bioengenharia de Ribeirão Preto, em especial à Terezinha pela atenção e dedicação.

Ao professor Dr. **José Antônio Thomazini** e ao Dr. **João Kajiwara**, do Departamento de Morfologia da FMRP, que criaram condições para a realização das fotomicrografias e sugestões dos programas de imagens.

Ao grande amigo professor Dr. **João Carlos Bizário**, pelo incentivo e orientações na montagem das pranchas.

Ao **Adriano**, da Bioengenharia, pelas orientações valiosas em relação ao programa de imagens.

Ao meu filho **Omar Crisci Cozac**, pela orientação em informática.

Ao **José Luiz de Souza**, histotécnico do Centro Universitário Barão de Mauá de Ribeirão Preto, pela realização de parte do material histológico.

Ao **Aristeu Gomes** e **Paulo Buccini**, técnicos do Centro Universitário Barão de Mauá de Ribeirão Preto, pelo auxílio com os animais no biotério e procedimentos cirúrgicos.

Aos técnicos do laboratório de microscopia eletrônica da FMRP, Departamento de Morfologia, **Maria Dolores Ferreira, Maria Tereza Maglia e José Antônio Maulin**, pelo prestimoso auxílio nas preparações histológicas e fotográficas utilizadas neste trabalho.

Ao colega professor **César Terçariol** pelo auxílio na elaboração dos gráficos.

Aos colegas da pós-graduação, **Victor, Graminha, Patrícia**, pelo companheirismo em todos os momentos, em especial ao **Shimano**, pela ajuda nos programas de estatística.

Ao **Júlio César de Matos** pela formatação, impressão e arte final deste trabalho.

À todos os amigos que me ajudaram a acreditar neste sonho.

OBRIGADA.

Quem construiu Tebas de Sete Portas? Constam nos livros os nomes dos Reis.

Terão os reis carregado blocos de pedras?

E Babilônia tantas vezes arrasada. Quem, tantas vezes a reconstruiu?

A grande Roma é cheia de Arcos do Triunfo. Quem os ergueu?

O jovem Alexandre conquistou a Índia, sozinho?

A cada página um grande feito.

E em cada feito, pessoas imprescindíveis.

Bertold Brecht

SUMÁRIO

Lista de figuras	i
Lista de tabelas	iii
Lista de abreviaturas e siglas	iv
Resumo	v
Abstract	vi
1. INTRODUÇÃO	1
2. PROPOSIÇÃO	7
3. REVISÃO DA LITERATURA	8
3.1. Estrutura de um nervo periférico	8
3.1.1. Conceituação básica da lesão nervosa periférica. Degeneração e regeneração, como resposta à lesão	11
3.1.2. Seqüência das alterações no coto proximal após a neurotomia	14
3.2. O ultra-som	19
3.2.1. Características das ondas ultra-sônicas	19
3.2.2. Parâmetros Físicos que caracterizam uma onda ultra- sônicas	22
3.2.3. Ação Biológica do ultra-som	24
4. MATERIAL E MÉTODOS	26
4.1. Animais de experimentação	26
4.1.1. Grupos experimentais	26
4.2. Procedimento cirúrgico	28

4.3. Coleta material	31
4.4. Procedimentos Histotécnicos	32
4.5. Equipamento gerador de ultra-som e parâmetros usados	33
4.5.1. A sonicação com o U.S.P.	34
4.6. Análise morfométrica e estatística	35
5. RESULTADOS	38
5.1. Avaliações quantitativas	48
6. DISCUSSÃO	55
7. CONCLUSÃO	64
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
9. APÊNDICE	

Lista de Figuras

Figuras	Pág.
1 Diagrama dos quatro componentes de um nervo espinal torácico	9
2 Degeneração Walleriana e regeneração da fibra nervosa	13
3 As principais reações do nervo periférico lesado	15
4 Modo de propagação das ondas ultra sônicas	20
5 Propagação de uma onda acústica longitudinal	21
6 Representação de uma onda em função da distância	22
7 Representação de uma onda em função do tempo	22
8 Fotografias ilustrativas das etapas do procedimento cirúrgico e sonicação	30
9 Fotomicrografia de corte semifino corados pelo azul de toluidina em secção transversal do nervo ciático	39
10 Fotomicrografia de corte semifino corados pelo azul de toluidina em secção transversal e longitudinal	41
11 Fotomicrografia de corte semifino corados pelo azul de toluidina em secção transversal para avaliação do perineuro	43
12 Eletromicrografia de nervo ciático de animais do grupo controle e estimulado para avaliação da bainha de mielina	44
13 Eletromicrografia de nervo ciático de animais do grupo controle e estimulado para avaliação do endoneuro e axoplasma	45
14 Eletromicrografia de nervo ciático de animais do grupo controle e estimulado para avaliação da célula de Schwann	47
15 Representação gráfica das contagens das fibras mielínicas tipo "A"	49

16	Representação gráfica das contagens das fibras mielínicas tipo “B”	50
17	Representação gráfica das contagens das fibras amielínicas	51
18	Representação gráfica das médias das fibras nervosas...	52
19	Representação gráfica da espessura da bainha de mielina das fibras do tipo “A”	53
20	Representação gráfica da área dos axônios das fibras tipo “A”	54
21	Modelos de axotomias crônicas em gatos, Dyck- 1996	60

Lista de Tabelas

Tabela		Pag.
1	Propriedades acústicas típicas de vários meios	23
2	Número de fibras mielínicas tipo “A”	48
3	Número de fibras mielínicas tipo “B”	49
4	Número de fibras amielínicas	51
5	Espessura da bainha de mielina	53
6	Área dos axônios	54

Lista de Abreviaturas e Siglas

BDNF – Fator neurotrófico derivado de cérebro

CW – Ondas contínuas

f – Frequência de onda

F.M.R.P. – Faculdade de medicina de Ribeirão Preto

Fr – Frequência de repetição de pulsos

mRNA – Ácido ribonucleico mensageiro

N-CAM – Molécula de adesão celular

NGF – Fator de crescimento do nervo

PGE₂ – Prostaglandina E₂

PW – Ondas pulsadas

PZT – Titanato zirconato de chumbo

S.N.C. – Sistema nervoso central

S.N.P. – Sistema nervoso periférico

U.S. – Ultra-som

U.S.P. – Ultra-som pulsado de baixa intensidade

U.S.T. – Ultra-som terapêutico

Resumo

As qualidades biofísicas do U.S.P. levaram-nos a estimar o efeito do mesmo sobre a regeneração de um nervo periférico. Este estudo foi levado a efeito sobre a axotomia experimental do nervo ciático de ratos. Para tal finalidade estimulamos por 12 dias consecutivos, durante 20 minutos o coto proximal dos nervos axotomizados. A morfologia foi avaliada comparativamente entre cortes semifinos corados pelo azul de toluidina e cortes ultra finos à microscopia eletrônica, dos cotos proximais de nervos estimulados e não estimulados. A avaliação morfométrica das estruturas, baseou-se na contagem diferencial das fibras; da espessura da bainha de mielina e da área dos axônios das fibras tipo A, mediante o emprego de um software especializado (Image Tool). Os achados morfológicos e a análise estatística dos dados morfométricos são altamente sugestivos de que o U.S.P. estimula a regeneração de nervos periféricos.

Palavra chave: ultra-som pulsado de baixa intensidade, nervo periférico, regeneração

Abstract

The biophysical qualities of pulsed ultrasound led us to appraise its effect on the regeneration of a peripheral nerve. In this study our intention was to evaluate the effects of pulsed ultrasound on the axotomy of the sciatic nerve in rats. The proximal stump of the nerve was stimulated on 12 consecutive days with pulsed ultrasound and the effects of the sonication were evaluated through morphologic and morphometric techniques. Our findings suggest that sonication leads to a rapid regeneration of the nerve after axotomization. These affirmations are based on the counting of different types of fibre components in mixed nerves and the morphologic recovery of the same in comparison with nerves of animals submitted to sham operation.

Keywords: Low intensity pulsed ultrasound, peripheral nerve, regeneration.

1- Introdução

A Bioengenharia, como ciência híbrida, será certamente de grande valia para a sobrevivência da espécie humana.

Em numerosas circunstâncias, temos encontrado exemplos das técnicas de engenharia utilizadas na medicina moderna como também na reparação e preservação do meio ambiente.

Enquanto a ciência procura conhecer a natureza através de pesquisas, a tecnologia e a engenharia visam ao desenvolvimento de processos e produtos que contribuam efetivamente no progresso de todos os ramos da ciência e indiretamente no bem estar e na saúde do homem.

Dentre os inúmeros benefícios das técnicas de engenharia aplicáveis à medicina, temos o ultra-som pulsado, o qual atua favoravelmente na indução da transformação de cartilagem em osso novo, demonstrando ser possível acelerar a consolidação de pseudoartroses (Xavier & Duarte, 1983).

No que diz respeito especialmente ao U.S.P., que é o principal elemento de nossa pesquisa, e para não elaborarmos uma seqüência de trabalhos que apenas confirmam os achados de Duarte e Xavier, vamos nos ater somente a alguns trabalhos mais recentes sobre o assunto.

As pesquisas relacionadas aos efeitos benéficos do U.S.P. no reparo de fraturas tiveram continuidade, e trabalhos recentes vieram apenas a confirmar, com os mais variados tipos de experimentos, aqueles efeitos já demonstrados inicialmente por Duarte (1983); Tanzer et al.(1996), demonstraram os efeitos do U.S.P. em implantes ósseos sob a forma de placas porosas; Kristiansen et al.(1997), demonstraram os efeitos do U.S.P. no reparo de fraturas no osso rádio humano mediante avaliações radiológicas; Carro (1998), investigou o efeito do U.S.P. na aceleração do princípio indutor de matriz óssea desmineralizada, utilizada no preenchimento de falhas ósseas; Zorlu et al. (1998), admitem que o U.S.P. acelera o reparo de fraturas e a eletroestimulação também o faz e não há diferenças estatísticas entre os dois métodos no reparo de fraturas; Brand et al. (1999), demonstraram o efeito benéfico do U.S.P. no reparo de fraturas por estresse; Kokubu et al. (1999), demonstraram que a prostaglandina E_2 (PGE_2) e a estimulação com o U.S.P. aceleram o reparo de fraturas; Guirro et al. (1999), procuraram investigar a ação do U.S.P. no reparo de falhas ósseas experimentais preenchidas previamente com hidroxiapatita.

Ito et al. (2000), partindo do princípio que o mecanismo mediante o qual o U.S.P. acelera o reparo de fraturas não está ainda perfeitamente esclarecido, admitem que fatores sistêmicos e fatores de crescimento estariam envolvidos no processo de reparação de fraturas. Mayr et al. (2000), consideram que o U.S.P. provê um método não invasivo e de grande valia nas alterações de reparo de fraturas; Naruse et al. (2000), consideram que o U.S.P. favorece o reparo de fraturas induzindo uma

reação anabólica direta de células osteogênicas, conduzindo à formação de matriz óssea.

Com relação à ação do U.S.P. sobre outros tecidos biológicos bem como sobre processos biológicos como a cicatrização, foi demonstrado que o U.S.P. atua no crescimento ósseo, Silva (1987); na regeneração da pele submetidas a queimaduras por calor, Alves (1988); na cicatrização da pele de ratos diabéticos aloxânicos, Nolasco(1993); no reparo de úlceras varicosas crônicas, Hilário(1993); e na resolução do processo inflamatório crônico, Pires (1994).

Bastaria simplesmente o fato de podermos abreviar uma pseudoartrose transformando-a em osso novo, para considerarmos o U.S.P. de grande utilidade na prática médica e social possibilitando o retorno em um prazo de tempo mais curto do indivíduo às suas atividades de trabalho.

Em todas essas circunstâncias patológicas ou em processos patológicos induzidos como queimaduras, o U.S.P. mostrou-se de grande utilidade na regeneração de diferentes tipos de tecido, embora alguns autores insistam, sem conhecimento de causa, em considerar tais resultados dúbios.

Baseados nessas premissas e nas qualidades biofísicas do U.S.P., propusemo-nos a estudar a regeneração de um nervo periférico sob os efeitos do U.S.P. considerando admitir-se que a reparação do nervo é um processo que se caracteriza inicialmente por uma reação inflamatória aguda.

Numerosos autores têm buscado estudar a regeneração de nervos periféricos utilizando-se de diferentes técnicas ou artifícios, visando sempre a abreviar a recuperação do nervo lesado.

Silva & Longone (1989), colocando os cotos proximal e distal de um nervo periférico, seccionado experimentalmente, no interior de um tubo de polietileno contendo colágeno e fator de crescimento do nervo (NGF) obtiveram resultados favoráveis à regeneração após 6 semanas.

Kakinoki et al.(1995), igualmente propuseram-se a estudar o efeito da vascularização na regeneração de nervos periféricos. Para tal finalidade, os cotos dos nervos foram colocados em tubos ora vazios, ora contendo vasos sangüíneos.

Outro tipo de investigação sobre regeneração de nervos deu-se utilizando enxertos autólogos de nervos, ora mantidos previamente em salina, ora em cultura de células de Schwann. Os resultados da regeneração foram melhores quando os enxertos utilizados eram aqueles mantidos previamente em cultura de células de Schwann (Foidart et al 1997).

Evans et al. (1999), fizeram estudos comparativos entre enxertos congelados-descongelados e após a refrigeração reaquecidos resultaram em melhor regeneração que enxertos frescos, mas com resultados inferiores ao enxerto autólogo. Com o uso de imunossuppressores ou imunoterapia no hospedeiro, essa técnica de conservação poderia prover meios de transportar enxertos entre centros médicos convertendo processos de urgência em seletivos.

A influência da laminina, glicoproteína encontrada na lâmina basal das células de Schwann e do colágeno contido no endoneuro, foi demonstrada por Labrador et al. (1997), como substâncias que ativam favoravelmente a regeneração do nervo periférico.

Chen et al. (2000), usando gel, contendo uma mistura de colágeno, laminina e fibronectina no interior de um tubo de silicone contendo os dois cotos de um nervo seccionado e obtiveram resultado favorável na regeneração.

Da mesma maneira, Jenq & Coggeshall em 1986, utilizaram tubo de silicone com fragmentos de nervos para avaliação da regeneração de nervos periféricos.

Porém, na literatura existem poucos trabalhos objetivando o emprego de estímulos físicos de quaisquer natureza sobre a regeneração de nervos periféricos.

Pollack (1995), utilizou-se de campos magnéticos associados a fatores neurotróficos no sentido de pesquisar o efeito dos mesmos na regeneração de nervo periférico.

Não encontramos na literatura outras referências a respeito do U.S.P. na regeneração do nervo periférico, embora tivéssemos procurado com os elementos disponíveis para tal finalidade.

Moore et al. (2000), estudaram o efeito biofísico do U.S. sobre a latência distal do nervo mediano humano, concluíram que as alterações de latência do nervo normal são conseqüentes aos efeitos térmicos do U.S. de ondas contínuas e não dos efeitos térmicos e mecânicos do U.S.P.

Entretanto, há autores que consideram a transecção axonal como um paradigma útil para o estudo da resposta celular à injúria. Além disso, a axotomia é um modelo adequado para testar o efeito de agentes terapêuticos experimentais. As lesões são produzidas com precisão e esse modelo experimental permite a oportunidade de examinar uma grande variabilidade de respostas (Koliatsos & Price - 1996).

Diante do exposto, propusemo-nos a estudar experimentalmente a regeneração do nervo ciático do rato, submetido a neurotomia experimental, sob a ação dos efeitos biofísicos gerados pelo U.S.P.

2- Proposição

A presente pesquisa tem como finalidade o estudo conduzido em ratos, sobre os efeitos do U.S.P. na regeneração do nervo ciático submetido previamente à neurotomia experimental.

O estudo terá como base a avaliação comparativa entre a regeneração dos cotos proximais dos nervos ciáticos axotomizados e estimulados ou não U.S.P.

Para tal finalidade os cotos proximais serão examinados morfolologicamente mediante a confecção de cortes semifinos e de cortes ultrafinos, quanto à integridade e quantidade de seus componentes.

Além da morfologia, a regeneração será também estimada mediante contagem dos diferentes tipos de fibras componentes dos cotos proximais dos nervos axotomizados, servindo como um elemento adicional indicativo da regeneração, com a mesma finalidade faremos a morfometria da espessura das bainhas de mielina das fibras grossas e as áreas dos seus axônios comparando-as mediante um software específico (UTHSCSA Image Tool), entre os nervos estimulados e não estimulados.

3- Revisão da Literatura

3.1.- Estrutura de um nervo periférico

Os nervos periféricos são constituídos de feixes de fibras ou axônios com suas bainhas de mielina as quais lhes conferem a cor esbranquiçada.

Os axônios que irão constituir os nervos periféricos originam-se de corpos celulares de neurônios localizados na substância cinzenta do tronco cerebral; no corno anterior da medula espinhal, ou daqueles neurônios situados periféricamente nos gânglios sensitivos, dos nervos espinais ou em gânglios do sistema nervoso autônomo (fig.1).

Nos vertebrados, os nervos periféricos são envolvidos por uma camada externa de tecido conjuntivo denso, o epineuro, que reveste o nervo e que envia prolongamentos de tecido fibroso moderadamente denso nos espaços entre feixes de fibras nervosas, o perineuro. Cada um destes feixes é revestido por uma bainha de células achatadas e justapostas (tight junctions), derivadas do epineuro, que atua como barreira a substâncias difusíveis (macromoléculas). Dentro da bainha perineural encontram-se os axônios, cada um envolvido por uma bainha de mielina, células de Schwann, mastócitos, fibroblastos, fibras colágenas, reticulares e células endoteliais da

FIX. 1995.

Figura 1 - Diagrama dos quatro componentes de um nervo espinal torácico.

1-fibras aferentes gerais(sensitivas),2-fibras somáticas gerais (motoras), 3-nervo espinal(misto), 4- placas motoras, 5- fusos musculares(propriocepção),6-terminações sensitivas livres (dor), 7-gânglio espinal(sensitivo),8-neurônios motores(corno anterior da medula), 9 interneurônios. a – corno lateral da medula espinal(neurônio simpático),b-fibra visceral geral aferente,c-gânglio espinal da raiz dorsal,d-ramo comunicante cinzento,e-ramo comunicante branco,f-neurônio pós ganglionar,g-gânglio pré-vertebral,h-vasos sanguíneos,i-m. eretor do pelo, j-glândula sudorípara.

rede capilar endoneural, que no conjunto, constituem o endoneuro. Estas estruturas são responsáveis pela continuidade e integridade das fibras nervosas e pela condução de capilares até a intimidade dos axônios para a nutrição dos mesmos.

As fibras nervosas podem ser mielínicas ou amielínicas, nas mielinizadas, a mielina consiste de uma série de segmentos cilíndricos dispostos em múltiplas camadas em espiral ao redor do axônio, derivadas das células de Schwann. Portanto, nos axônios mielínicos, encontra-se externamente a ele, em seqüência de dentro para fora: a bainha de mielina,

o citoplasma, o núcleo das células de Schwann e as fibras colágenas e reticulares de revestimento que no conjunto constituem o endoneuro.

Existem três categorias de fibras nervosas mielínicas, de acordo com sua capacidade de condução. As fibras do tipo “A” têm maior diâmetro, nódulos de Ranvier espaçados e são as mais rápidas (100 metros por segundo).

As fibras do tipo “B” são fibras mielínicas, porém mais finas com nódulos de Ranvier mais próximos uns dos outros, e nelas o impulso nervoso caminha com menor rapidez (3 a 14 metros por segundo).

As fibras do tipo “C” são amielínicas, mais delgadas, e conduzem o impulso a uma velocidade relativamente baixa (0,6 a 2 metros por segundo) (Junqueira & Carneiro – 1999).

As fibras amielínicas são envolvidas por uma única célula de Schwann em grupos de até 20 fibras, nestas não há espaço correspondente aos nós de Ranvier das mielínicas; onde uma célula de Schwann termina outra já se sobrepõe. As fibras amielínicas possuem menor diâmetro e geralmente apresentam-se em maior frequência no nervo, que as fibras mielínicas.

O axônio é envolto pelo axolema, uma continuação da membrana do corpo celular contendo o axoplasma, cujos componentes predominantes são: uma matriz amorfa, algumas organelas orientadas longitudinalmente através do citoesqueleto (neurotúbulos e neurofilamentos), mitocôndrias, retículo endoplasmático liso e corpos multivesiculares.

Componentes diretamente ligados ao fluxo axoplasmático, principalmente os neurotúbulos atuam no movimento centrífugo do axoplasma.

Embora a bainha de mielina seja segmentada, o axônio é contínuo e o segmento da fibra que não contém bainha de mielina recebe o nome de internódulo. A espessura da bainha é proporcional ao diâmetro do axônio correspondente.

Os nervos do S.N.P. estabelecem conexão entre o S.N.C. e receptores para diferentes tipos de sensibilidade; possuem fibras que levam para o S.N.C. as informações obtidas por receptores localizados no interior do corpo e ou receptores ambientais, mediante fibras chamadas aferentes. As fibras que levam impulsos do S.N.C. para os órgãos efetores (músculos e glândulas), são as chamadas fibras eferentes (fig.1).

Os nervos que possuem somente fibras aferentes(sensitivas) são chamados de nervos sensitivos, e os possuidores de fibras que levam os impulsos dos centros para os efetores são os nervos motores. Porém, a grande maioria dos nervos periféricos são dotados dos dois tipos de fibras, portanto, chamados de nervos mistos.

3.1.1. *Conceituação básica da lesão nervosa periférica: Degeneração e regeneração nervosas, como resposta à lesão.*

Devido à sua grande distribuição e situação, as lesões dos nervos periféricos são relativamente freqüentes.

O nervo transeccionado divide o axônio em dois segmentos: um segmento proximal, em continuidade com o pericário, e um segmento distal separado da célula nervosa (fig.2 A).

Com a lesão, forma-se um espaço intersegmentar(fig.2 B) de dimensões variáveis e inicia-se uma reação inflamatória local, reparadora, como a que ocorre nos demais tecidos lesados. Há um extravasamento de plasma sangüíneo, que leva à formação de uma “matriz” entre os dois segmentos do nervo lesado, composta por fibrina e fibronectina, que servirão como substrato para migração de células e de prolongamentos neuronais. Sobre a matriz de fibrina, migram também macrófagos vindos da corrente sanguínea, fibroblastos, células endoteliais e células de Schwann.

As células de Schwann tornam-se fusiformes (fig.2 E) com a união de suas extremidades formam cordões lineares denominados de “banda de Bungner”. Os fibroblastos iniciam a síntese de colágeno e juntamente com a rede formada pelas células de Schwann, constituem uma ponte intersegmentar contendo capilares, fibras colágenas e macrófagos (fig.2 F).

O segmento distal, perdendo a comunicação com o centro trófico (pericário), não mantém sua estrutura e sua integridade funcional , sofrendo uma degeneração axonal, denominada degeneração Walleriana, marcada pela ação de proteases sobre os microtúbulos e neurofilamentos. A bainha de mielina ao redor destes fragmentos é fagocitada por macrófagos e pelas células de Schwann (fig.2 D). São entretanto passíveis também de regeneração (Pereira,1993).

FIX.1995.

Figura 2- Degeneração Walleriana e regeneração da fibra nervosa

3.1.2. Sequência das alterações no coto proximal após a neurotomia

Às modificações morfológicas e funcionais que o pericário sofre após a lesão de uma fibra nervosa deu-se o nome de efeito retrógrado (Lieberman -1971; Watson - 1974).

Dentre essas modificações, a primeira é a cromatólise, alteração morfológica caracterizada pela dissociação da substância de Nissl, desintegração de grandes porções do r.e.g. (retículo endoplasmático granular) seguida da dispersão dos ribossomos no citoplasma do pericário, o que lhe confere uma basofilia característica (fig.3 b). Observa-se ainda um aumento de volume e deslocamento do núcleo para a periferia do pericário (fig.3 b).

As alterações metabólicas estão relacionadas com a diminuição de componentes do citoesqueleto transportados do pericário para o axônio.

O axônio retrai-se por uma pequena distância logo após a neurotomia, adquirindo uma configuração espiralada (fig.3c). Há uma fragmentação da bainha do internódulo próximo à lesão e uma diminuição do diâmetro do axônio; porém se a regeneração for satisfatória o diâmetro do axônio se recupera, caso contrário a atrofia axonal aumenta.

ROSS. 1993

Figura 3 - As principais reações do nervo periférico lesado. a – fibra nervosa normal, b- fibra nervosa lesada, o núcleo move-se para periferia da célula e o corpúsculo de Nissl se reduz, e proliferação das células de Schwann formando um cordão compacto, penetrado pelo axônio em crescimento, d- a regeneração da fibra nervosa teve êxito, observe que a fibra muscular também se regenerou após receber estímulos nervosos, e o axônio não penetra no cordão de células de Schwann, forma o neuroma de amputação.

Nas fibras mielínicas a degeneração provoca a proliferação e a hipertrofia das células de Schwann. Essa proliferação pode continuar durante até 3 semanas e o número de células de Schwann aumentar até cerca de dez vezes àquele da população original de células.

Evidentemente, grandes porções da membrana plasmática da célula de Schwann se alteram no curso da fragmentação da bainha de

mielina, porém poucas na realidade parecem morrer. As células de Schwann em proliferação parecem livrar-se de suas lâminas basais circundantes, que permanecem como uma série de tubos orientados longitudinalmente, as já referidas “Bandas de Bungner”.

Ao longo desses, as células de Schwann formam uma massa completamente interdigitada de processos citoplasmáticos, que, associada com tubos do material da lâmina basal, parece guiar os brotos axonais em proliferação regenerativa para dentro do segmento distal degenerado a partir do coto proximal em direção ao seu “alvo”. As fibras que crescem a esmo formam uma dilatação na extremidade do nervo chamada de “neuroma de amputação” (fig.3 e).

À medida que a regeneração dos axônios se processa, as células de Schwann tornam-se mais regulares na sua organização e gradativamente formam arranjos lineares com base nos tubos de lâmina basal persistentes. Dentro desses, os brotos axonais invaginam-se e, dessa maneira, são remielinizados.

O aspecto de uma fibra remielinizada é característico, os internódulos têm tamanhos variados e a bainha de mielina é inicialmente mais fina.

A bainha de mielina pode ser refeita pelas células de Schwann que não se alteraram, ou por células de Schwann neoformadas em casos de lesões mais extensas.

Nas fibras amielínicas, a degeneração ocorre rapidamente e em 24 horas há uma perda de microtúbulos, seguida de fragmentação do

retículo endoplasmático, edema de mitocôndria e uma desintegração de neurofilamentos. Esses axônios reagem, produzindo grandes vesículas contendo mitocôndrias e corpos lamelares densos, sendo que a maioria deles desaparecem em 2 a 3 dias. Os restos celulares são removidos por macrófagos e pelas próprias células de Schwann. Estas últimas proliferam-se e os seus prolongamentos envolvem os axônios degenerados, porém, com menor intensidade que a proliferação que ocorre em relação às fibras mielínicas.

Os neurônios que sobrevivem à lesão iniciam os processos de regeneração poucas horas após o trauma; a extremidade lesada do axônio dilata-se pelo acúmulo de estruturas como o R.E.Liso, mitocôndrias e microtúbulos – “cone de crescimento”, originando junto ao nó de Ranvier mais próximo do local da lesão, no espaço deixado pela retração parcial das células de Schwann (Mc Quarrie -1985; Meller -1987), um grande número de finos prolongamentos, chamados de brotamentos ou neuritos.

Há, no início do processo regenerativo, um aumento da síntese protéica relacionada à reconstrução do axônio.

Os axônios em regeneração tendem a desviar-se do seu trajeto, porém os que não desviam, alcançam o segmento distal e seguem pelo interior dos tubos endoneurais entre a lâmina basal e a membrana plasmática das células de Schwann refeitas ou neoformadas visando alcançar o órgão efector.

Para que uma regeneração nervosa se refaça vários fatores estão envolvidos, um deles é a interação do “cone de crescimento”, e dos

neuritos, com as substâncias do meio extracelular até atingir seu alvo. Quanto a este fato já existem vários trabalhos experimentais (Sanes, 1989; Fawcett & Keynes, 1990) demonstrando a ação estimulatória de moléculas localizadas na matriz extracelular as quais possuem forte influência sobre o crescimento e orientação dos axônios, tanto na sua fase de formação como na regenerativa.

Fawcett & Keynes, 1990, demonstraram também que de todas as estruturas que compõem o microambiente de regeneração, as células de Schwann, são as que desempenham papel relevante. Moléculas presentes na membrana basal dessas células atuam como fatores promotores de neuritos. Dentre essas moléculas, a laminina é a mais abundante.

Timpl et al. (1983), consideram também a membrana basal de outros tipos celulares como favorecedores da regeneração neuronal.

Existem outras moléculas que desempenham papel importante na regeneração nervosa periférica, como o fator de crescimento do nervo – NGF (Montalcini & Hamburger, 1951), porém trata-se de uma molécula que se encontra também no coto distal de nervos lesados (Hewmann et al. 1987).

A N-CAM (molécula de adesão celular), que também se encontra presente nos cones de crescimento dos axônios em regeneração e nas células de Schwann parece ter importante papel no crescimento e fasciculação dos axônios (Martini & Schachner, 1988).

Assim como a N-caderina também está envolvida na junção axônio-axônio e na junção axônio-célula de Schwann e as integrinas ($\alpha 1 \beta 1$ e $\alpha 6 \beta 1$) do mesmo modo. (Ide, 1996).

3.2- O Ultra-som

3.2.1 Características das ondas ultrasônicas

O ultra-som é uma forma de energia mecânica de alta frequência, acima de 20 kHz (Okuno et al 1986), que não pode ser percebida pelo ouvido humano e que se propaga como onda de pressão, provocando uma agitação de partículas ao seu redor, fazendo com que estas oscilem sem provocar deformação do meio.

Na onda mecânica, a energia é transmitida pela agitação das moléculas do meio no qual a onda está se propagando, assim as ondas podem ser classificadas em transversais, longitudinais e superficiais.

Nas ondas longitudinais as partículas oscilam na mesma direção de propagação da onda (fig.4). Nas ondas transversais as oscilações são perpendiculares à direção da propagação da onda (fig.4), e as ondas superficiais causam oscilações elipsóides nas partículas. Portanto em meios líquidos apenas se propagam ondas do tipo longitudinais (Wells 1977). Como os tecidos moles do corpo humano são considerados fluídos, serão consideradas aqui somente as ondas ultra-sônicas do tipo longitudinal.

As ondas ultra- sônicas são geradas por transdutores que consistem em um disco ou cilindro de quartzo, material natural; ou titanato zirconato de chumbo (PZT), material sintético, esses materiais convertem energia elétrica em energia mecânica. Para eliminar o ar da região entre o transdutor e o corpo (Willians 1987), usa-se gel acoplante ou água.

ONDA	CONFIGURAÇÃO
LONGITUDINAL
TRANSVERSAL

Figura 4 – Modo de propagação das ondas ultra-sônicas.

Legenda: C- compressão – Partícula em movimento
R- rarefação – Partícula estacionária

Figura 5 – Propagação de uma onda acústica longitudinal.

Em "A" observa-se o comportamento de um conjunto de partículas nos instantes iniciais de propagação. A cada intervalo de tempo a energia ultra-sônica atinge uma nova partícula, que descreve um movimento oscilatório.

Em "B" mostra-se as regiões de compressão e rarefação, à medida em que a onda se propaga. (Haar, 1978).

3.2.2. - Parâmetros Físicos que caracterizam uma onda ultra-sônica

1- **Comprimento de onda (λ)**: menor distância entre dois planos próximos do meio onde se encontram as partículas no mesmo estado de movimento, em determinado instante de tempo.

2- **Período (T)**: tempo para uma partícula realizar um ciclo completo de movimento.

3- **Amplitude (A)**: máximo de deslocamento que uma partícula experimenta a partir de sua posição de equilíbrio.

Figura 6 – Representação de uma onda em função da distância.

Figura 7 – Representação de uma onda em função do tempo.

- 4 – **Frequência (f)**: número de vezes que uma partícula realiza um ciclo completo de movimento.
- 5 - **Velocidade (c)**: velocidade com que a perturbação move-se ao longo do meio.
- 6 – **Potência (P)**: energia total no feixe por unidade de tempo (Watts)
- 7 – **Intensidade (I)**: energia que atravessa uma unidade de área numa unidade de tempo (W/cm^2), quando uma onda atravessa um meio as partículas vibram e adquirem energia cinética, essa energia associada com a onda ultra-sônica é chamada de intensidade acústica.
- 8 - **Atenuação**: redução da intensidade de uma onda ultra-sônica conforme ela se distancia de sua fonte, causado por espalhamento e absorção pelo meio.
- 9 - **Tempo de irradiação** : tempo total de exposição.
- 10 - **Impedância (Z)**: propriedade das ondas em se deslocarem mais facilmente em alguns meios que em outros. Descrita pela equação:

$$Z = \rho \cdot c.$$

ρ = densidade do meio c = velocidade da onda

Tabela 1: Propriedades acústicas típicas de vários meios. (Young, 1990).

Meio	Densidade (g/ml)	Velocidade do som (m/s)	Impedância Característica ($10^6 \text{kg}^{-2} \text{ms}^{-1}$)
Ar	1.293	331.5	429
Água (20° C)	1.0	1480	1.52
Plasma Sangüíneo	1.06	1570	1.62
Gordura	0.92	1460- 1470	1.35
Fígado	1.06	1540- 1585	1.63-1.68
Músculo	1.07	1545- 1630	1.65-1.74
Osso	1.38- 1.81	2710- 4080	3.75- 7.38

3.2.3. Ação Biológica do Ultra- Som

Tem sido demonstrado em experimentos já realizados com o U.S.T. que a interação deste com tecidos biológicos provoca alterações fisiológicas, que na maioria das vezes é benéfica, porém, passível de provocar danos devido aos efeitos térmicos produzidos pelo U.S.T. Esse efeito não é observado quando do uso padronizado do U.S.P., que não causa efeito térmico deletério. Há 2 tipos de frequência de onda (f) e a frequência de repetição de pulsos(Fr).

Dyson et al.(1.983), sugeriram estimular com o U.S.P. durante os 15 primeiros dias após o trauma, isto é, durante a fase inflamatória, razão pela qual utilizamos no nosso experimento um período semelhante pois após a secção de um nervo periférico, segue-se uma característica reação inflamatória.

A aplicação do U.S.P. na reparação de tecidos biológicos depende de seus efeitos biofísicos e não térmicos, como a cavitação, o micro fluxo acústico e a piezoeletricidade, envolvidos na interação do U.S.P. com os tecidos biológicos.

O U.S.P. pode alterar a estrutura e o funcionamento celular, mediante seu efeito de cavitação transiente, as bolhas que se formam no meio líquido, podem mudar o volume, a pressão e quando se chocam liberam energia capaz de romper ligações químicas, produzindo radicais livres reativos que provocam mudanças químicas nas células (Okuno et al 1.986) ou pelo seu efeito de cavitação estável, quando as bolhas podem

modificar a permeabilidade da membrana celular para íons cálcio e sódio aumentando a síntese proteica. As membranas celulares tornam-se mais permeáveis, devido aos movimentos unidirecionais do fluido em campo ultra-sônico, e as organelas podem se alterar devido às forças de radiação.

Além da piezoelectricidade, como uma propriedade natural de alguns cristais e substâncias cristalinas anisotrópicas, que ao se deformarem, desenvolvem cargas elétricas superficiais ou vice-versa (Mason, 1981), isto é ao se colocar um material piezoelétrico em campo elétrico, as cargas elétricas interagem com o mesmo e exibem deformações mecânicas. O elemento piezoelétrico usado no transdutor para produção de ondas ultra-sônicas foi o PZT(zirconato titanato de chumbo).

Os pioneiros na descrição da piezoelectricidade em tecido biológico (Fukada & Yasuda,1957), observaram que há um efeito direto e inverso no osso devido ao seu contingente em colágeno. (Silva,1987).

Considerando o colágeno como o elemento indispensável na geração de piezoelectricidade podemos supor que este efeito deva ocorrer em todos os tecidos ou estruturas que contém colágeno em sua composição ou à sua volta.

4- Material e Métodos

4.1. Animais de Experimentação

Para avaliar os efeitos do U.S.P. na regeneração de um nervo periférico realizamos a secção total do nervo ciático de ratos Wistar, de ambos os sexos e cujos pesos variaram de 120 a 150g.

Os animais, obtidos no biotério da F.M.R.P., eram separados em gaiolas apropriadas e mantidos pelo menos 48 horas no novo ambiente, para aclimação.

O tratamento padronizado antes, durante e após as cirurgias constou de água a vontade e ração balanceada (Purina). Antes das cirurgias as manipulações eram, à medida do possível, equivalentes para todos os animais.

4.1.1. Grupos Experimentais

Utilizamo-nos na presente pesquisa de 40 animais assim agrupados:

Grupo Experimental I:

Um grupo inicial de 5 animais, foi utilizado para padronização dos procedimentos cirúrgicos e da secção dos nervos. Os nervos obtidos destes animais foram destinados à inclusão em parafina e não foram utilizados para as avaliações morfológicas, morfométricas e/ ou estatísticas.

Grupo Experimental II:

Um 2º grupo experimental constou de 25 animais, operados apenas de um dos lados (sempre o E ou o D). Destes animais, 13 foram sonicados, durante 10 dias com intervalo de um dia e 12 foram durante períodos de tempo equivalentes, apenas submetidos a uma sonicação fictil.

Os cotos proximais dos nervos foram retirados com o animal ainda sob anestesia tomando-se os cuidados necessários para a fixação precoce do nervo mediante gotejamento de glutaraldeído, antes do sacrifício dos animais e da retirada do nervo seccionado.

O material destes animais, após tratamento adequado, serviu para as avaliações morfológicas.

Grupo Experimental III:

Este grupo constituiu-se de 10 animais operados e submetidos à secção dos nervos ciáticos de ambos os lados; o lado direito foi sonicado com U.S.P. durante 12 dias consecutivos e o lado esquerdo, que serviu como controle, foi submetido a uma sonicação fictil.

Este grupo forneceu o material para compor a avaliação morfométrica.

4.2. Procedimento Cirúrgico

Os animais eram anestesiados mediante injeções intraperitoniais de Rompum (cloridrato de 2(2,6 xilideno)- 5,6-dihidro-4N-1,3-tiazina) e Ketalar (cloridrato de cetamina) em proporções equivalentes na quantidade de 0,10ml da solução por 100g de peso, anestesia que se mostrou suficiente para o desenvolvimento de todo processo operatório.

Após a contensão dos animais em prancha operatória, fazia-se a tricotomia de ambos os lados, sobre a região do músculo grande glúteo (fig. 8 A).

A seguir, à assepsia da região com álcool iodado 70⁰ (2%), fazia-se uma secção do tegumento que recobria o músculo glúteo maior. As fibras musculares eram então divulsionadas, com a introdução de uma pinça mosquito, mais ou menos na região mediana do músculo (fig. 8 B).

A abertura dos ramos da pinça separava as fibras musculares que se dispunham longitudinalmente pois a forma normal do músculo é quadrangular, expondo assim a porção proximal do nervo ciático, logo abaixo (fig. 8 B). Em todos os animais o nervo era seccionado com tesoura oftálmica. Fazia-se, a seguir, a recomposição do tegumento com fios de sutura(mononylon 6-0) mediante pontos separados (fig. 8 E).

Em alguns animais o coto proximal do nervo era introduzido, após secção, em um segmento de tubo de polietileno, com a finalidade do coto do nervo não tomar contato com tecidos adjacentes especialmente colágeno, durante todo o experimento.

Figura 8 - As fotografias que compõem esta figura identificadas de A a F, são representativas dos passos cirúrgicos executados para produzir as neurotomias.

A) contenção do rato na prancha cirúrgica e assepsia. B) divulsão das fibras do músculo glúteo maior, com exposição do nervo ciático. C) nervo ciático após axotomia. D e E) são indicativas da síntese do músculo dos planos superficiais em pontos separados. F) sonicação.

4.3. Coleta do Material

Decorrido o tempo convencionado para os estímulos com o U.S.P., fazia-se a retirada dos nervos, para posterior processamento.

Os animais eram anestesiados e após contenção em prancha cirúrgica, fazia-se uma ampla secção do tegumento, o qual era rebatido e a seguir era seccionado o músculo glúteo maior expondo-se desta maneira os cotos do nervo seccionado. Processava-se dissecação cuidadosa para retirada de tecidos que às vezes envolviam o segmento proximal do nervo ciático, preparando-o para ser coletado.

Exposto o coto proximal dos nervos procedia-se de imediato o gotejamento de glutaraldeído, iniciando-se uma fixação precoce com a finalidade de preservar ao máximo a integridade do material a ser fixado.

Cada coto de nervo retirado era dissecado sob lupa com aumento final de 16X, para retirar-se excesso de tecidos conjuntivo e/ou gorduroso, bem como a extremidade distal do segmento, que se apresentava dilatada exibindo um neuroma de amputação.

A seguir, o coto proximal de cada nervo foi seccionado em vários fragmentos, os quais após identificação eram colocados em frascos separados contendo fixador. Estes procedimentos feitos em placa de parafina, mantinha sempre o tecido nervoso mergulhado no fixador. De cada fragmento procurou-se fazer análise morfológica a partir do nível de secção no sentido pericário, cujos resultados morfológicos foram exibidos na seqüência da figura 9.

4.4. Procedimentos Histotécnicos

Após essas medidas, permaneciam em glutaraldeído por cerca de 12 a 24 horas a 4°C. A seguir, os fragmentos eram armazenados em tampão fosfato 0,1M pH 7,2-7,4 por um período de 72 horas.

Fragmentos de 1mm foram pós-fixados por um período de 2 horas em solução de tetróxido de ósmio a 1% em tampão fosfato 0,2M pH 7,2-7,4 a 4°C. Após lavagem do material, efetuava-se a desidratação dos espécimes, com passagem em série crescente de concentrações de acetona; permanecendo as amostras 10 minutos em cada concentração. A acetona a 95% foi substituída por acetona absoluta, onde as amostras permaneceram por 60 minutos, em três banhos de 20 minutos cada.

Com o objetivo de possibilitar a infiltração de resina, os espécimes foram colocados nas seguintes soluções: Araldite 502 + acetona na proporção de 1:3, 1:1, 3:1. Em cada proporção os espécimes permaneceram por uma hora à temperatura ambiente. A seguir, as amostras eram colocadas em araldite 502 pura, onde as amostras permaneciam por 3 horas, em três banhos de 1 hora cada, à temperatura ambiente. Na etapa seguinte, foi realizada a inclusão do material em moldes de silicone, de modo a se obter cortes transversais das fibras de 1mm de espessura.

De cada segmento procurou-se obter cortes semifinos que foram corados com Azul de Toluidina e examinados em microscópio de luz comum Zeiss. A partir destes cortes foram selecionados áreas de interesse a serem observadas no microscópio eletrônico de transmissão.

As amostras selecionadas para cortes ultrafinos, tiveram seus blocos reparados e cortados em ultramicrotomo Reichert, com navalha de diamante, obtendo-se cortes de aproximadamente 60nm de espessura. Os cortes foram colocados diretamente em telas de cobre de 200 “mesh” e contrastadas com solução de acetato de uranila e citrato de chumbo.

As observações dos cortes ultrafinos foram realizadas em microscópio de transmissão, Philips E.M.208, operado a 80 KV, e as eletromicrografias obtidas com filme Kodalith.

Este material destinou-se especificamente para as avaliações morfológicas e para a morfometria.

4.5. Equipamento Gerador de Ultra-som e Parâmetros Usados

O equipamento utilizado em nosso experimento, foi um estimulador ultra-sônico, cujo circuito eletrônico e o transdutor ultra-sônico foram projetados e montados no laboratório de Bioengenharia da Escola de Engenharia de São Carlos U.S.P. Durante todo o processo de sonicação, o U.S.P. operou com parâmetros físicos relacionados abaixo:

Parâmetros do U.S.P. utilizados em nosso experimento.

Forma de onda:	pulsada
Largura do pulso:	200 us
Amplitude:	25V (pico a pico)
Intensidade Acústica(SATA):	16mw/cm ²
Frequência de repetição:	1kHz
Frequência do PZT-4:	1,5MHz
Area do transdutor:	3,8cm ²

Dosimetrias avaliadas mediante dosímetro de Ultra-Som de precisão(modelo UPM-DT10 - OHNIC) foram executadas com a finalidade de estimar a constância dos parâmetros citados durante o período de sonicação.

4.5.1.) A sonicação com U.S.P.

A sonicação iniciava-se sempre, 24 horas após a cirurgia, com aplicações diárias, por via transcutânea e estacionária; por 20 minutos diários, com um intervalo de 24 horas entre as sonicações. Cuidou-se sempre de se fazer as sonicações no mesmo período do dia.

O transdutor era posicionado e acoplado sobre a pele com auxílio de um gel hidrossolúvel (GEL CONTACT).

Nos grupos experimentais I e II somente o lado direito foi sonicado já que o nervo esquerdo não fora axotomizado. Alguns animais submetidos à cirurgia do lado esquerdo serviram-nos como controle da axotomia e portanto eram submetidos desse lado, a uma sonicação fictil. Esta constava de uma simulação de estimulação ultrasônica, sem emissão do ultra som, garantindo assim que os animais considerados como controles fossem submetidos às mesmas condições experimentais de manipulação, exceto o estímulo ultra-sônico.

Já no grupo experimental III, no qual os animais foram submetidos à axotomia em ambos os lados isso não foi necessário, pois o

lado D foi sonicado com U.S.P. e o lado E serviu-nos como controle, isto é, passou pelos mesmos procedimentos cirúrgicos e a uma sonicação fíctil.

4.6. Análise Morfométrica e Estatística:

Para a análise estatística, utilizamo-nos dos nervos obtidos dos animais do grupo experimental III. Esta análise foi conduzida mediante teste “t” de student pareado, pois os nervos analisados provinham do mesmo animal quer estimulados quer controles.

Desta maneira, obtivemos 10 amostras de nervos submetidos a sonicação e 10 que nos serviram como controle e não foram estimulados.

De cada corte semifino, fotografamos cinco campos aleatórios sempre cuidando para não haver repetição de imagens de um mesmo campo. Estas fotomicrografias, obtidas com auxílio do fotomicroscópio Axiophot Carl Zeiss, com objetiva de imersão (100X), foram armazenadas em disk drives for zip, totalizando 100 campos fotográficos.

Desta forma, quase todo o corte transversal de cada nervo foi rastreado e fotografado para o estudo morfométrico de suas fibras.

Estas fotomicrografias foram utilizadas também para análise morfológica pois nelas já se podia observar diferenças estruturais e morfológicas, principalmente no que se referia ao número de fibras mielínicas.

As fotomicrografias dos cortes semifinos foram analisadas com auxílio de um programa de computador específico para análise de imagens chamado Image Tool.

O primeiro parâmetro analisado foi a avaliação quantitativa de fibras com bainha de mielina grossa, fibras com bainha de mielina fina e fibras amielínicas. Foram feitas as contagens desses três tipos de fibras, em cada um dos 5 campos fotográficos obtidos de cada nervo dos animais deste grupo.

Para analisarmos a área dos axônios e a espessura da bainha de mielina, escolhemos oito dos 10 animais do grupo III, por considerarmos um número suficiente, e também para podermos contar com campos que apresentaram melhor reprodução microfotográfica, portanto, a exclusão de dois animais foi igualmente casualizada.

Para este último parâmetro, selecionou-se ao acaso dez fibras de cada animal, depois de terem sido capturadas em branco e preto, as imagens eram a seguir contrastadas determinando-se o gradiente da cor, oferecido pelo software que marcava os cortes transversais das bainhas de mielina. Porém, além dos anéis de mielina, eram simultaneamente coradas estruturas extras como vasos sangüíneos, fragmentos de núcleos de célula de Schwann e muitas vezes, bainhas que apresentavam falhas, embora tivéssemos escolhidos os melhores campos. Esses artefatos eram eliminados manualmente ou simplesmente eliminados os dados referentes a essas estruturas, algo perfeitamente possível com os inúmeros recursos oferecidos pelo programa de imagens.

Após a eliminação desses artefatos, realizávamos as medidas desejadas, cuidando sempre para que os dados fossem armazenados em outro programa apropriado, Excel para posterior uso nos cálculos estatísticos.

Para a avaliação estatística dos dados utilizamo-nos do programa Sigma Stat 2.03, em nível de significância de 5%.

5- Resultados

Nossos resultados serão apresentados tendo como base o estudo da morfologia e da morfometria do coto proximal de nervos ciáticos seccionados experimentalmente e submetidos ou não à estimulação pelo U.S.P.

A porção extrema do coto proximal dos nervos (o que será objeto de investigação futura), se apresenta constituindo o chamado “neuroma de amputação” representado por uma grande proliferação inicial de células conjuntivas e células de Schwann.

Assim, não pudemos fazer avaliações morfométricas do coto de amputação, mas apenas avaliações morfológicas.

As figuras 9 A e 9B, correspondem a cortes semifinos do extremo dos cotos proximais de nervos axotomizados. São demonstrativas da proliferação celular que constitui o “neuroma”, exibindo grande quantidade de células e uma variabilidade, embora no coto do animal estimulado as células estejam entremeadas de vasos neo-formados decorrentes do estímulo do U.S.P. e não estão como na figura 9 A , rodeadas de tecido conjuntivo que caracteriza o aspecto morfológico do neuroma de amputação.

As figuras 9C e 9D são de cortes semifinos da região do coto proximal, que se segue ao neuroma de amputação, nesta região já se

Figura 9 - Fotomicrografia de cortes semifinos, corados pelo Azul de Toluidina em secção transversal do nervo ciático. A) Células constituintes do extremo distal do coto proximal do nervo de um animal controle; observar organização semelhante a um neuroma de amputação. B) Células do extremo distal do coto proximal do nervo de um animal estimulado, observar um maior número de vasos neoformados (seta) e células precursoras de células de Schwann. (seta) C) Fibras do coto proximal do nervo de um animal controle, observar a quantidade e características das mesmas, bainha de mielina desenrolada. (Seta). D) Fibras do coto proximal do nervo de um animal estimulado, observar a presença de um maior número de fibras mielinizadas. E) Fibras do coto proximal do nervo de um animal controle, notar que as bainhas de mielina apresentam irregularidades, em muitas delas exibem crenação (seta). F) Fibras do coto proximal do nervo de um animal estimulado, observar a regularidade das bainhas de mielina.

Os brotos atraídos por substâncias químicas fazem contato com o cordão de neurilema.

A figura 9D apresenta fibras mielinizadas em maior número que as encontradas no coto do animal não estimulado (fig.9C).

Esses achados são de nervos seccionados e estimulado por 10 dias consecutivos.

Na seqüência de segmentos mais proximais do coto as fibras com bainha de mielina do animal estimulado (fig.9F) são mais regulares e mais espessas que a dos animais controles, não estimulados (fig.9E), as quais apresentam-se com diferentes desarranjos da mielina.

O encontro de numerosas fibras exibindo bainha de mielina fina significa que estas fibras fazem parte do contingente de fibras de bainha fina do próprio nervo misto.

Mediante cortes semifinos dispostos no sentido longitudinal constata-se na bainha de mielina do coto proximal de animais não estimulados inúmeras figuras degenerativas caracterizáveis como pregueamentos e desenrolamentos da bainha de mielina (fig.10C). No coto do nervo estimulado pelo U.S.P. as bainhas vistas no mesmo sentido de corte apresentam uma regularidade de espessura e disposição das fibras (fig. 10D), não exibindo deformidades de suas bainhas.

Os efeitos biofísicos do U.S.P. atuaram também sobre o perineuro traduzindo-se por um nítido espessamento do seu componente conjuntivo e

20 μ m

Figura 10-Fotomicrografia de cortes semifinos de nervo ciático, corados pelo Azul de Toluidina .A) - Fibras do coto proximal do nervo de um animal controle, em secção transversal, notar os aspectos bizarros da disposição das bainhas de mielina e da composição alterada das fibras constituintes do nervo ciático, atrofia axonal (seta) e bainha de mielina desenrolada (seta). B) - Fibras do coto proximal do nervo de um animal estimulado. Notar a regularidade das bainhas e do número de fibras componentes do coto, em secção transversal. C)-Fibras do coto proximal do nervo de um animal controle, em secção longitudinal, bainha desenrolada (seta). D)-Fibras do coto proximal do nervo seccionado de um animal estimulado em secção longitudinal.

Outros aspectos da morfologia comparativa entre os dois grupos experimentais foram também investigados mediante eletromicrografias.

Alguns achados morfológicos obtidos mediante o emprego da microscopia eletrônica são também altamente sugestivos de diferenças entre nervos estimulados e não estimulados.

Nestas a bainha de mielina dos neurônios axotomizados e sem estímulo exibem alterações da sua conformação, como crenação da bainha, presença de fendas e as vezes, pela mielina desenrolada. Essas alterações estão indicadas na fig 12 A e 12 C.

No axoplasma dos neurônios axotomizados e sem estímulo, as mitocôndrias apresentam-se edemaciadas, há um menor número de microtúbulos e neurofilamentos e um grande número de vesículas axoplasmáticas (fig.12E e 13C). Esses mesmos aspectos podem ser encontrados nas figuras de menor aumento.

Essas diferenças são facilmente observáveis quando comparamos o axoplasma do neurônio não estimulado com o do grupo estimulado pelo U.S.P., pois nestes, as mitocôndrias apresentam aspecto normal e os microtúbulos e neurofilamentos são mais numerosos (fig.12F e 13D) e dispostos com regularidade.

A quantidade de fibrilas colágenas nas eletromicrografias sugerem o aumento de colágeno no endoneuro dos animais tratados, fato já demonstrado em perineuros em cortes semifinos (fig. 13 A e 13B).

Figura 11 - Fotomicrografia de corte semifino de nervo ciático, corado pelo Azul de Toluidina em secção transversal, para avaliação do perineuro. A) Perineuro de nervo ciático axotomizado e não estimulado, nota também que as bainhas de mielina dos axônios na mesma fotomicrografia apresentam-se mal constituídas, crenadas. (Seta) e bainha desenrolada (seta). B) - Perineuro de nervo ciático axotomizado e estimulado com o U.S.P., observar que as bainhas de mielina incluídas na fotomicrografia apresentam-se regulares. Nota o grande espessamento do perineuro decorrente do estímulo. C) Perineuro de nervo ciático axotomizado e estimulado como U.S.P., notar a presença de vasos sanguíneos neoformados e células de Schwann (seta).

Figura 12 - Eletromicrografia de nervo ciático de animais do grupo controle e estimulado, para avaliação da bainha de mielina. A) Bainha de mielina com características anormais observadas após a axotomia em animais que não receberam a sonicação como U.S.P., nota a crenação da bainha de mielina (seta). B) Bainha de mielina com características normais observadas após a axotomia em animais que receberam a sonicação com o U.S.P. C) Bainha de mielina com características anormais observadas após a axotomia em animais que não receberam a sonicação como U.S.P., nota a presença de fendas parciais (seta). D) Bainha de mielina em célula de Schwann com aspectos normais após a axotomia e sonicação com o U.S.P. E) Bainha de mielina com características anormais observadas após a axotomia em animais que não receberam a sonicação como U.S.P., detalhe de uma fenda parcial (seta). F) Detalhe de bainha de mielina e axoplasma com aspectos normais após axotomia e sonicação como U.S.P.

Figura 13 - Eletromicrografia de nervo ciático de animais do grupo controle e estimulado, para avaliação do perineuro e axoplasma. A) Endoneuro, mostrando uma redução das fibrilas de colágeno, em animais do grupo controle. B) Endoneuro, mostrando uma aumento das fibrilas de colágeno, em animais do grupo estimulado. C) Axoplasma, evidenciando umamitocôndriaedemaciada (seta), vesículasagranulares (seta) e microfilamentosdispersos (seta), animaisdogrupocontrole. D) Axoplasma em detalhe, de animais dogrupoestimulado, onde se observam maior quantidade de neurotúbulos (seta) e pequenas vesículasagranulares (seta).

À síntese de fibrilas colágenas juntam-se a fibronectina e laminina formando a matriz extracelular, de importância vital para o sucesso da regeneração.

Outro aspecto altamente sugestivo e indicativo de atividade regenerativa diz respeito às células de Schwann. Enquanto as células dos animais estimulados apresentam características de células em atividade, aquelas dos animais não estimulados apresentam características de células quiescentes. Nestas a cromatina apresenta-se regularmente distribuída e uniformemente densa, a membrana nuclear não apresenta poros bem como não se vê no citoplasma das mesmas, organelas cuja morfologia se coadune com atividade celular intensa ou aumentada (fig. 14 A e 14B).

Enquanto os núcleos das células estimuladas exibem numerosos poros na membrana, a cromatina se dispõe em grumos junto à membrana e, de maneira descondensada no restante da área do núcleo. As mitocôndrias e vesículas apresentam-se com características normais enquanto o retículo endoplasmático mostra-se com características morfológicas de atividade (figs. 14C, 14D, 14E e 14F).

Figura 14 - Eletromicrografia de nervo ciático de animais do grupo controle e estimulado, para avaliação da célula de Schwann. A) Célula de Schwann envolvendo fibra mielinizada, em animais do grupo controle. B) Núcleo da célula de Schwann, de animal do grupo controle. C) Célula de Schwann, do grupo estimulado, exibindo citoplasma ativo, notar o grande número de mitocôndrias (seta) e retículo endoplasmático (asterisco). D) Célula de Schwann, em animais do grupo estimulado. E) O núcleo da célula de Schwann exibindo áreas de cromatina mais condensada (c.c.) próximo à membrana nuclear e grandes áreas de cromatina descondensada (c.d.). Os poros da membrana nuclear (setas) apresentam-se em grande quantidade, em animais do grupo estimulado. F) Núcleo da célula de Schwann em detalhe, os poros da membrana nuclear (setas) apresentam-se em grande quantidade, em células de animais do grupo estimulado.

Os efeitos do U.S.P. sobre a regeneração do nervo foram observados ainda mediante avaliação quantitativa do número de fibras componentes do coto proximal dos nervos seccionados, comparando-se o número de fibras do coto proximal dos animais estimulados com o de animais controles.

As fibras grossas (tipo A, de condução rápida) são aquelas que apresentam bainha de mielina mais espessa. A análise numérica desse tipo de fibra mediante a metodologia por nós utilizada mostrou uma diferença estatisticamente significativa ($P \leq 0,001$) entre os nervos dos animais estimulados e controle.

Na tabela 2, constam os valores quantitativos das fibras tipo A expressos pelas médias das contagens; desvios padrões e erros padrões das médias.

Tabela 2

Número de fibras mielínicas – tipo A

Tratamento	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão da Média
Controle	18,160	3,487	1,103
Tratado	46,190	2,245	3,872

A figura 15, traz a representação gráfica dos valores das contagens de cada animal.

Figura 15- Representação Gráfica das contagens das fibras mielínicas tipo “A”.

No que concerne às fibras de mielina fina (tipo B de condução lenta), a análise estatística mostrou uma diferença significativa entre o número das fibras deste tipo dos animais estimulados e dos animais controles ($P= 0,004$).

Os valores obtidos estão expressos na tabela 3 por suas médias, desvio padrão e erro padrão da média.

Tabela 3

Número de fibras mielínicas – tipo B

Tratamento	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão da Média
Controle	39,080	3,506	1,109
Tratado	61,980	21,921	6,93

A figura 16 traz a representação gráfica dos valores das médias das contagens de cada animal.

Figura 16- Representação Gráfica das contagens das fibras mielínicas tipo“B”.

Da análise quantitativa dos diferentes tipos de fibras que compõem o nervo misto apenas as fibras amielínicas (ligadas ao componente autônomo do nervo misto), não exibiram estatisticamente valores que expressassem diferença significativa, ao nível de 5%, entre o número das contadas nos animais estimulados e aquele dos animais controle.

A tabela 4 expressa os valores das médias e respectivos desvios em relação à contagem das fibras amielínicas nos dois grupos experimentais.

Tabela 4

Número de fibras amielínicas

Tratamento	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão da Média
Controle	1,840	0,556	0,176
Tratado	1,710	0,706	0,223

A representação gráfica na figura 17 mostra uma grande variabilidade da quantidade de fibras amielínicas levando a diferentes valores das médias tanto para os animais estimulados quanto para os controles.

Figura 17- Representação Gráfica das contagens das fibras amielínicas.

Para uma visão conjunta dos números de fibras contadas no nervo em regeneração, foi elaborado o histograma da figura 18 representa a soma das médias das contagens de fibras.

Figura 18- Representação Gráfica das médias das fibras nervosas.

A análise estatística dos valores da espessura da bainha de mielina das fibras tipo A utilizando a mesma metodologia mostrou uma diferença estatisticamente significativa ($P=0,023$).

Na tabela 5 estão os valores referentes à média das espessuras das bainhas de mielina dos animais componentes dos dois grupos experimentais.

Tabela 5

Espessura da Bainha de Mielina

Tratamento	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão da Média
Controle	0,108	0,0526	0,0186
Tratado	0,173	0,0462	0,0163

A figura 19 traz a representação gráfica dos valores das médias a partir das medidas de espessura da bainha de mielina das fibras tipo “A” nos dois grupos experimentais.

Figura 19- Representação Gráfica da espessura da bainha de mielina das fibras do tipo “A”.

Da mesma maneira estimamos as áreas dos axônios das fibras do tipo A de animais estimulados e controles, concluindo que os valores obtidos mostram diferenças estatisticamente significativas ($p=0,049$).

Na tabela 6 estão expressos os valores das médias e respectivos desvios nos dois grupos experimentais.

Tabela 6

Área dos axônios

Tratamento	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão da Média
Controle	0,136	0,0477	0,0169
Tratado	0,212	0,0676	0,0239

A figura 20 traz a representação gráfica dos valores encontrados para as áreas dos axônios e as médias dos valores para os animais dos dois grupos experimentais.

Figura 20- Representação Gráfica da área dos axônios das fibras do tipo "A".

6- Discussão

Embora tivéssemos procurado exaustivamente referências sobre o emprego do U.S.P. na regeneração de nervos periféricos, não encontramos trabalhos com os quais pudéssemos eventualmente estabelecer quaisquer comparações.

Não obstante, é fato já estabelecido e aceito que as propriedades biofísicas do U.S.P. podem atuar provocando a regeneração de diferentes tecidos biológicos, especialmente acelerando os processos regenerativos dos tecidos.

Alguns trabalhos têm usado ora o U.S.P. ora o U.S.T. e procurado determinar os efeitos dos mesmos sobre nervos periféricos, porém sem a finalidade de avaliar quaisquer benefícios sobre a regeneração dos mesmos, mas avaliando o emprego dos mesmos mediante eventuais melhoras clínicas.

Assim, Moore et al. (2000) utilizaram os efeitos do U.S.P. na avaliação da latência do nervo ulnar humano, visto que em estudos anteriores, haviam demonstrado a ausência de efeitos do ultra som não térmico sobre a condução do nervo usando frequências de 1MHz e 870kHz. Além de terem estudado os efeitos de ondas contínuas (CW) e pulsados (PW) sobre a latência sensorial do nervo mediano usando frequências de 1 e 3MHz; concluíram que a alteração nas latências com o uso do ultra som em nervos íntegros parece relacionar-se às alterações de temperatura induzidos

pelos efeitos térmicos e não aos efeitos não térmicos ou mecânicos do ultra som pulsado.

Ramos et al.(1985) trataram a neuropatia diabética com estimulação elétrica transcutânea e concluíram que seria um recurso útil para o tratamento sintomático da neuropatia diabética sensorial.

Mattar Jr. et al. (1990) demonstraram o efeito do enxerto de membrana basal de fibra muscular estriada no reparo de lesões de nervos periféricos. Demonstraram que o enxerto de membranas atua no sentido de viabilizar a reconstituição de nervos periféricos.

Rodríguez et al. (1996) utilizaram comparativamente em nervos periféricos seccionados e suturados os efeitos do Laser Helio-Neon (He-Ne), luz de xenônio e luz solar.

Mediante a avaliação de conseqüências clínicas das lesões (transtornos motores e lesões tróficas) admitiram pela influência benéfica do laser He-Ne sobre a restauração do nervo suturado.

Mantovani et al. (1995) estudaram o efeito da injeção intraperitoneal ou intramuscular de gangliosídeos exógenos na regeneração nervosa após esmagamento e neurorrafia do nervo ciático de ratos concluindo que o fator determinante da regeneração foi a presença da reação inflamatória associada à formação de tecido de reparação e neuroma no local da lesão nervosa.

Rath et al.(1995), em seus experimentos com animais descritos como submetidos a uma mutação insercional transgênica-induzida, referida como Enervado (Enr), resultou numa alteração da relação células de

Schwann e axônio. Após esmagamento ou secção de nervos periféricos de animais Enr, demonstrou uma incapacidade de regeneração. Demonstrou-se poucas fibras mielinizadas por μm^2 e bainhas de mielina finas revestindo axônios em regeneração nos camundongos homozigotos mutantes, comparados com camundongos selvagens, 28 dias após esmagamento do nervo ciático. Relações anormais entre células de Schwann e axônios nos animais Enr como foi evidenciado pelos axônios de grande diâmetro não mielinizados nos nervos em regeneração à microscopia eletrônica. A deficiência da regeneração está ligada à regeneração defeituosas das células de Schwann.

Terenghi (1995) admite que apenas recentemente foi possível identificar com precisão a contribuição de diferentes sub populações de nervos na regeneração. Outros componentes teciduais contribuem no processo. A presença de células de Schwann é essencial para o sucesso da regeneração nervosa, mais pela sua capacidade na produção de diferentes fatores neuronais tróficos. O processo de regeneração ocorre em tempos diferentes e a regeneração da inervação autonômica parece precedida pela dos nervos sensitivos.

Madison et al.(1999) demonstraram que as células de Schwann representam a maior fonte de proteína Netrin-1 no nervo periférico, esta proteína desempenha seu papel influenciando na regeneração de nervo periférico adulto.

Frostick et al.(1998) utilizaram-se de células de Schwann associada a diferentes fatores neurotróficos (NGF) e outros identificados

recentemente como o BDNF (fator neurotrófico derivado do cérebro) e neurotrofinas na regeneração do nervo periférico. Discutem o que necessita ser esclarecido a respeito do uso desses fatores neurotróficos em clínica.

Araújo (1996) admite que a degeneração das fibras não mielinizadas é mais precoce e que a proliferação de células de Schwann relacionadas a estas se faz em menor quantidade, quando comparadas às fibras mielinizadas.

Para Pollock (1995), o coto axonal forma-se dentro de poucas horas da lesão nervosa e cresce vigorosamente por longas distâncias.

Uma variedade de enfoques ou caminhos têm sido correntemente utilizados visando a propiciar o aumento da regeneração de nervos periféricos.

Incluem-se entre esses caminhos o uso de campos elétricos, fatores neurotróficos e manipulação de células de Schwann.

Pelos trabalhos até aqui relacionados, fica evidente o interesse em se encontrar quaisquer elementos coadjuvantes na regeneração do nervo periférico. Inúmeras tentativas têm sido realizadas com a mesma finalidade e intensidade, no que concerne à regeneração do SNC.

De qualquer forma, consideramos que o uso do U.S.P., poderia ser também utilizado na tentativa de buscarem-se eventuais benefícios, na regeneração do nervo periférico, o que foi o propósito principal de nossa investigação.

Como a axotomia é um modelo altamente reprodutível e representa um processo de cicatrização sob muitos aspectos semelhante a

outros tipos de cicatrização, consideramos válida a tentativa que ora apresentamos.

Em primeiro lugar, quaisquer tentativas que objetivassem abreviar o reparo de um nervo periférico, com eventual retorno as atividades motoras ou recuperação da sensibilidade, seria de grande importância na prática médica.

Por outro lado, como o U.S.P. mostrou-se altamente eficaz em reparos cicatriciais, mesmo em condições desfavoráveis, como em animais diabéticos, consideramos nossa tentativa amplamente justificada.

Nossos resultados são altamente sugestivos de que o uso do U.S.P. induz à recuperação mais rápida do nervo ciático do rato após sua axotomia.

Considerando os resultados obtidos mediante a observação morfológica dos cotos proximais de nervos, estimulados ou não, achamos válido compara-los àqueles resultados obtidos por Dyck (1996), em gatos.

Embora as espécies sejam de comportamento instintivo antagônico, com relação à estrutura e morfologia dos nervos não exibem diferenças consideráveis.

Por tal razão e para valorizar nossos resultados, vamos incluir aqui resultados obtidos por Dyck no estudo da degeneração do nervo ciático de gatos mediante axotomias permanentes.

As figuras aqui reproduzidas mediante xerocópias são demonstrativas da degeneração do nervo ciático do gato em secções

longitudinais e transversais comparadas às secções de nervos de animais normais (fig.21).

Solicitamos ao leitor que, observando as xerocópias dos nervos normais e degenerados de gatos após três semanas da axotomia, compare-as às imagens da figura 10 de nossos resultados.

Figura 21- Modelos de axotomias crônicas em gatos, Dyck-1996.

Em A: Nervo controle, em secção transversal.

Em B: Nervo após 3 semanas de amputação, em secção transversal.

Em C: Nervo controle, em secção longitudinal.

Em D: Nervo após 3 semanas de amputação, em secção longitudinal.

A conclusão única e possível desta observação seria a de que os cotos proximais de nervos axotomizados dos ratos e estimulados pelo U.S.P. são muito semelhantes aos aspectos do nervo controle do gato. Enquanto os aspectos morfológicos da regeneração dos cotos não estimulados do ciático de ratos são semelhantes àqueles do gato, observados após três semanas da axotomia permanente.

Assim, nos animais estimulados pelo U.S.P. o maior número de fibras grossas (de alta velocidade de condução) têm sua bainha de mielina refeita precocemente o que, certamente decorre de uma maior atividade das células de Schwann. Estas, como foi demonstrado nas eletromicrografias, exibem aspectos morfológicos de atividade mais acentuada, quando comparadas às dos animais não estimulados.

No que diz respeito ao número de fibras de mielina fina, sugere que o número das mesmas esteja ligado ao fato de que a bainha de mielina que se forma em torno do axolema faz-se por um mecanismo gradativo de secreção das células de Schwann, ou o número de fibras realmente é grande(fibras de condução mais lenta) ou grande parte destas ainda estariam por ter completada a formação de suas bainhas e tornar-se-iam fibras de bainha grossa. Supomos que este fato conduziria à recomposição do número total e qualidade de fibras que normalmente comporiam o nervo misto.

No que concerne às fibras amielínicas, acreditamos que o número das mesmas estaria ligado a uma velocidade variável de regeneração deste tipo de fibra, o que traduziria em cada animal, um número de fibras, no tempo, dificilmente comparáveis pelas suas médias. Segundo Araújo(1996), estas degeneram mais precocemente, como se refazem também mais tardiamente. Este fato está explicado nos resultados estatísticos e nos desvios padrões mostrados no gráfico da figura 17.

Outro aspecto que poderíamos inferir de nossos resultados é que as alterações morfológicas encontradas nos animais não estimulados assemelham-se àquelas figuras degenerativas encontradas em nervos cuja secção foi executada há mais tempo, no gato. Isto poderia significar que as degenerações do nervo não estimulado tenderiam a não se restabelecerem no tempo enquanto que, sob o estímulo do U.S.P., as fibras regeneraram em maior número e ao tempo em que as do coto não estimulado tenderam à degeneração.

A regeneração do nervo axotomizado pode apresentar, mesmo em animais estimulados ou normais, alguns aspectos da mielina comparáveis às degenerações encontradas no nervo dos animais não estimulados, porém em quantidades ínfimas.

Outro aspecto favorável aos benefícios decorrentes dos efeitos biofísicos do U.S.P. é que a regeneração nervosa corre paralelamente à presença das células de Schwann, as quais são também estimuladas pela sonicação.

Embora não tivéssemos feito contagens destas células, o que seria de difícil execução, é possível garantir que a morfologia das células de Schwann dos animais estimulados é compatível com a de células exibindo grande atividade metabólica.

Acreditamos que se nos trabalhos nos quais os diferentes pesquisadores utilizaram-se de fatores de crescimento de variadas naturezas para favorecer a regeneração de nervos fosse acrescentado o estímulo do U.S.P. os resultados certamente seriam ainda melhores.

7- Conclusão

Nossos achados se coadunam com a hipótese de que as qualidades biofísicas do U.S.P., nos parâmetros por nós utilizados, mostraram-se eficazes na regeneração do nervo periférico misto (nervo ciático axotomizado, do rato), avaliada nos aspectos morfológicos e morfométricos dos componentes do coto proximal do nervo seccionado.

8- Referências Bibliográficas

ALVES, J.M. (1988). *Efeitos da energia ultra-sônica na regeneração de pele animal com queimaduras com calor*. São Carlos. 70p. Dissertação (Mestrado)- Escola de Engenharia de São Carlos/ Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo.

ARAÚJO, M.B.M. (1996). *Disautonomia na Doença de Chagas. Existe participação do nervo vago?* Ribeirão Preto, 110p. Dissertação de (Mestrado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo.

BRAND JR, J.C. et al. (1999). Does pulsed low intensity ultrasound allow early return to normal activities when treating stress fractures? A review of one tarsal navicular and eight tibial stress fractures. *Iowa Orthop J.* v.19, p.26-30.

CARRO, A.P.M.C. (1998). *Uso da matriz óssea desmineralizada associada a estimulação ultra-sônica pulsada de baixa intensidade na correção óssea. Estudo experimental em coelhos*. 50p. Dissertação (Mestrado)- Escola de Engenharia de São Carlos/ Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo.

CHEN,Y.S.;HSIEH,C.L.; TSAI,C.C.;CHEN,T.H.;CHEN,W.C.;HU,C.L.;YAO,C.H. (2000). Peripheral nerve regeneration using silicone rubber chambers filled

with collagen, laminin and fibronectin. *Biomaterials*, v.21, n.15, p.1541-7, Aug.

DUARTE, L.R. (1983). The stimulation of bone growth by ultrasound. *Archives of Orthopaedic and Traumatic Surgery*, v. 101, p. 153-9.

DYCK,P.J.; NUKUDA,H.; LAIS,A.C.; KARNES,J.L. Permanent Axotomy: A model of chronic neuronal degeneration preceded by axonal atrophy, myelin remodeling, and degeneration. In: Dyck, P.J.; Thomas, P.K.; Lambert, E.H.; Bunge, R. *Peripheral Neuropathy*. 2. ed. Philadelphia: WB Saunders, 1996. v. 1, cap. 32, p. 666-690.

DYSON,M.; PAOOKES,M. (1983). Stimulation of bone repair by ultrasound. *Ultrasound in Med. And Biol.* Sup. 2, p.61-66.

EVANS, P.J.; MACKINNON, S.E.; MIDHA, R; WADE, J.A.; HUNTER, D.A.; NAKAO,Y.; HARE, G.M.T. (1999). Regeneration across cold preserved peripheral nerve allografts. *Microsurgery*, 19: 115-127.

FAWCETT, J. W.; KEYNES, R.J. (1990). Peripheral nerve regeneration. *Ann. Rev. Neuroscience*. V.13, p. 43-60.

FIX, J.D.(1995). *Neuroanatomy*. 2. ed. p. 86-87.

FOIDART, M. D.;DUBUISSON, A.;LEJEUNE,A.; SEVERYNS,A.; MANASSIS, Y.; DELREE,P.; CRIELAARD,J.M.;BASSLEER,R.; LEJEUNE,G. (1997). Sciatic nerve regeneration through venous grafts in the rat. *Experimental Neurology*, v.148, p. 236-246.

FROSTICK, S.P.; YIN, F.Q.; KEMP, G.J. (1998). Schwann cells, Neurotrophic factors, and peripheral nerve regeneration. *Microsurgery*, 18: 397-405.

- FUKADA, E.; YASUDA, I. (1957). On piezoelectric effect of bone. *Journal of Physical Society of Japan*, v.12, n.10, p. 1152- 1162, Oct.
- GUIRRO, R.; FERREIRA, A. L.; GUIRRO, E. (1999). The use of hydroxyapatite associated with low intensity pulsed ultrasonic stimulation study with rabbits. *J. Morph. Sci.* v.16, n.1, p.45-53.
- HAAR, G.T. (1978). Basic physics of therapeutic ultrasound. *Physiotherapy*, v. 73, n.3, p.110-3.
- HEWMANN, R.; LINDHOLM, D.; BANDTLOW, C.; MEYER, M.; RADEKE, M. J.; MISKO, T. P.; SHOOTER, E.; THOENEN, H.; (1987). Differential regulation of mRNA encoding nerve growth factor and its receptor in rat sciatic nerve during development, degeneration and regeneration: Role of macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*. V. 84; p. 8735-9.
- HILÁRIO, M. (1993). *Radiação ultra-sônica de baixa intensidade na reparação tecidual de úlceras tróficas de perna*. 154p. Dissertação (Mestrado)- Escola de Engenharia de São Carlos/ Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo.
- IDE, C. (1996). Peripheral nerve regeneration. *Neuroscience Research*, v.25, p.101-121.
- ITO, M.; AZUMA, Y.; OHTA, T.; KOMORIYA, K. (2000). Effects of ultrasound and 1,25 dihydroxyvitamin D₃ on growth factor secretion in co- cultures of osteoblasts and endothelial cells. *Ultrasound Med. Biol.*, v. 26, n.1, p.161-6, Jan.
- JENQ, C. B.; COGGESHALL, R. E. (1986). Regeneration of transected rat sciatic nerves after using isolated nerve fragments as distal inserts in silicone tubes. *Exp. Neurol.*, v. 91, n.1, p.154-62, Jan.

- JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. (1999). *Histologia Básica*. Rio de Janeiro : G. Koogan. . Cap.9, p. 129-158.
- KAKINOKI, R. et al. (1995). Relationship between axonal regeneration and vascularity in tubulation : an experimental study in rats. *Neurosci Res.*, v.2, n.1, p.35-45, Aug.
- KOKUBU,T.; MATSUI,N.; FUJIOKA,H.; TSUNODA,M.; MIZUNO,K. (1999). Low intensity pulsed ultrasound exposure increases prostaglandin E₂ production via the induction of cyclooxygenase 2 mRNA in mouse osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun*, v.256, n.2, p.284-7,Mar.
- KOLIATSOS, V.E.; PRICE, D.L. (1996). Axotomy as an experimental model of neuronal injury and cell death. *Brain Pathol*, v. 6, n. 4, p. 447-65, Oct.
- KRISTIANSEN, T. K.; RYABY,J.P.; MCCABE,J.; FREY, J.J.; ROE,L.R. (1997). Accelerated healing of distal radial fractures with the use specific, low intensity ultrasound: a multicenter, prospective, randomized, double-blind, placebo- controlled study. *J. Bone Joint Surg. Am.*, v. 79, n.7, p.961-73, Jul.
- LABRADOR, R. O.; BUTÍ, M.; NAVARRO,X. (1998). Influence of collagen and laminin gels concentration on nerve regeneration after resection and tube repair. *Experimental Neurology*. V. 149, p. 243-252.
- LIEBERMAN, A . R. (1971). The axon reaction: a review of the principal features of perikaryal responses to axon injury. *Int. Rev. Neurobiol.*, v.14, p. 49-124.
- MADISON, R.D.; ZORMORODI, A.; ROBINSON,G.A. (2000). Netrin-1 and peripheral nerve regeneration in the adult rat. *Experimental Neurology*, 161, 563-570.

- MANTOVANI, J.C.; PRADO, R.; BACCHI,C.E. (1995). Estudo do efeito de gangliosídeos exógenos na regeneração nervosa após compressão e neurorrafia do nervo ciático do rato. *Folha Méd.*, v.111, supl.2, p.105-10, Set- Out.
- MARTINI,R.; SCHACHNER,M. (1988). Immuno- electronmicroscopic localization of neural cell adhesion molecules (L1, N- CAM, and myelin-associated glycoprotein) in regenerating adult mouse sciatic nerve. *J. Cell. Biol.*, v.106, p.1735-46.
- MASON, W.P. (1981). Piezoelectricity, its history and applications. *Journal Acoust.Soc. Am.* , v.70, p. 1561- 1566.
- MATTAR JUNIOR, R.;STARCK,R.; GUARNIERI,M.V.; AZZE,R.J.; MITTELDORF,C.S.; FERREIRA,M.C. (1990). Utilização de enxerto de membrana basal de fibra muscular estriada para reparação de lesões de nervos periféricos: estudo experimental. *Revista Brasileira de Ortopedia*; v. 25, n.8, p. 287-92, Ago.
- MAYR,E.; RUDZKI,M.M; RUDZKI,M.; BORCHARDT,B.; HAUSSER, H.;RUTER,A. (2000). Does low intensity, pulsed ultrasound speed healing of scaphoid fractures. *Handchir Mikrochir Plast Chir*, v. 32, n.2, p.115-22, Mar.
- MC QUARRIE, I. G. (1985). Effect of a conditioning lesion on axonal sprout formation at nodes of Ranvier. *J. Comp. Neurol.*, v. 231, p.239- 49.
- MELLER, K. (1987). Early structural changes in the axoplasmic cytoskeleton after axotomy studied by cryofixation. *Cell Tissue Res*, v. 250, p. 663-72.

MONTALCINI, R.L.; HAMBURGER, V. (1951). Selective growth stimulating effects of mouse sarcoma on the sensory and sympathetic nervous system of the chick embryo. *J.Exp. Zool.*, v. 116, p. 321-62.

MOORE, J.H.; GIECK, J.H.; SALIBA, E.N.; PERRIN, D.H.; BALL, D.W.; McCUE, F.C. (2000). The biophysical effects of ultrasound on median nerve distal latencies. *Electromyogr Clin Neurophysiol.* v. 40, n. 3, p.169-80, Apr-May.

NARUSE, K.; MIKUNI-TAKAGAKI, Y.; AZUMA, Y.; ITO, M.; OOTA, T.; KAMEYAMA, K.; ITOMAN, M. (2000). Anabolic response of mouse bone-marrow- derived stromal cell clone ST2 cells to low- intensity pulsed ultrasound. *Biochem. Biophys. Res Commun.*, v.268, n.1, p. 216-20, Feb.5.

NOLASCO, M.A. (1993). *Efeitos da estimulação ultra-sônica sobre a cicatrização da pele de ratos diabéticos*. 62p. Dissertação (Mestrado)- Escola de Engenharia de São Carlos/ Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo.

OKUNO, E.; CALDAS, I.L.; CHOW, C. (1986). *Física para ciências biológicas e biomédicas*. São Paulo : Harbra, 490p.

PEREIRA, F.C. (1993). *Estudo experimental e quantitativo da reinervação muscular após regeneração de nervos no interior de próteses tubulares*. 136p Dissertação (Mestrado)- Instituto de Ciências Biomédicas. Universidade de São Paulo.

PIRES, M.A. (1994). *Efeitos do ultra- som de baixa intensidade sobre o processo inflamatório crônico induzido experimentalmente em ratos*. 68p. Dissertação (Mestrado)- Escola de Engenharia de São Carlos/ Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo.

- POLLOCK, M.(1995). Nerve regeneration. *Curr Opin. Neurol*, v.8, n.5, p.354-8, Oct.
- RAMOS,M.C.V.; HERNANDEZ,G.H.; AYALA,L.R. (1985). Neuropatia diabética sensorial: tratamento com neuroestimulação elétrica transcutânea. *Rev. Méd. IMSS*, v. 23, n.3, p.201-5, Mayo- Jun.
- RATH, E.M.; KELLY,D.; BOULDIN,T.W.; POPKO,B. (1995). Impaired peripheral nerve regeneraton in a mutant strain of mice (Enr) with a schwann cell defect. *J. Neuroscience*, v. 15, n.11, p. 7226-37, Nov.
- RODRÍGUEZ SOTELO, P.; RODRIGUEZ SOSA,V.M.; TOIRAC MARTINEZ,R.;GOMEZ BARRY,H. (1996). El laser de Helio- Néon en la regeneracion del nervio ciático seccionado y saturado. *Rev. Cuba Cir.*, v.35, n.2, p.84-9, Jul.
- ROSS, M.H.; REITH, E. J.; ROMRELL, L. J. (1993) *Histologia*. São Paulo : Panamericana, cap. 11, p.265.
- SANES, J.R. (1989). Extracellular matriz molecules that influence neural development. *Ann. Rev. Neuroscience*, v.12, p.491- 516.
- SANES, J.R.(1983). Roles of extracelular matriz in neural development. *Annu. Rev. Physiol.*, v. 45, p.581-600.
- SILVA, C.F.; LANGONE, F.(1989). Additin of nerve growth factor to the interior of a tubular prosthesis increases sensory neuron regeneration in vivo. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v.22, p.691-4.

- SILVA, O. L. (1987). *Estudo do mecanismo de ação do ultra-som na estimulação do crescimento ósseo*. 215p. Dissertação (Mestrado)- Escola de Engenharia de São Carlos/ Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo.
- TANZER, M.; HARVEY, E.; KAY, A.; MORTON, P.; BOBYN, J.D. (1996). Effect of noninvasive low intensity ultrasound on bone growth into porous- coated implants. *J. Orthop. Res. Nov.*, v. 1, n. 6, p. 901-6, Nov;
- TERENGHI, G. (1995). Peripheral nerve injury and regeneration. *Histology Histopathology*, v.10, n. 3, p.709-18, Jul.
- TIMPL, R.; ENGEL, J.; MARTIN, G.R. (1983). Laminin – a multifunctional protein of basement membranes. *Trends Biochem. Science*, v. 8, p. 207-9.
- WATSON, W. E. (1974). Cellular responses to axotomy and to related procedures. *Br. Med. Bull.*, v. 30, p. 112- 5.
- WELLS, P.N.T. (1977). *Biomedical ultrasonics*. London : Academic Press. 635p.
- WILLIAMS, R. (1987). Production and transmission of ultrasound. *Physiotherap.*, v. 73, n.3, p. 113-116.
- XAVIER, C.; DUARTE, L.R. (1983). Estimulação ultra-sônica do calo ósseo. *R. Bras. Ortop.*, v.18, p. 73-80.
- YOUNG, S.R.(1990). *The effect of therapeutic ultrasound on the biological mechanisms involved in dermal repair*. London: University of London.

ZORLU, U.; TERCAN,M; OZYAZGAN,I.; TASKAN,I.; KARDAS,Y.; BALKAR,F.; OZTURK,F. (1998). Comparative study of the effect of ultrasound and electrostimulation on bone healing in rats. *Am. J. phys. Med. Rehabil.*, v. 77(, n.5, p. 427-32, Sep-Oct.

9- Apêndice

Contagens individuais do número de fibras de animais controle

1	Campos	Com Mielina	Mielina Fina	Amielinica
	1	25	18	3
	2	4	34	2
	3	9	42	2
	4	8	28	4
	5	25	62	2
Média		14,2	36,8	2,6

2	Campos	Com Mielina	Mielina Fina	Amielinica
	1	11	53	0
	2	12	38	3
	3	14	38	0
	4	6	46	4
	5	11	27	0
Média		10,8	40,4	1,4

3	Campos	Com Mielina	Mielina Fina	Amielinica
	1	28	35	2
	2	30	60	5
	3	20	26	0
	4	16	19	3
	5	18	42	2
Média		22,4	36,4	2,4

4	Campos	Com Mielina	Mielina Fina	Amielinica
	1	2	30	3
	2	5	40	3
	3	41	57	1
	4	33	36	2
	5	26	26	1
Média		21,4	37,8	2

5	Campos	Com Mielina	Mielina Fina	Amielinica
	1	20	46	2
	2	19	48	0
	3	21	44	1
	4	22	42	1
	5	19	43	2
Média		20,2	44,6	1,2

6	Campos	Com Mielina	Mielina Fina	Amielinica
	1	17	40	1
	2	22	42	0
	3	18	44	2
	4	18	39	2
	5	32	42	1
Média		21,4	41,4	1,2

7	Campos	Com Mielina	Mielina Fina	Amielinica
	1	18	36	3
	2	19	38	2
	3	29	19	2
	4	10	46	2
	5	8	52	3
Média		16,8	38,2	2,4

8	Campos	Com Mielina	Mielina Fina	Amielinica
	1	21	25	3
	2	18	20	3
	3	16	37	2
	4	26	43	2
	5	8	37	1
Média		17,8	32,4	2,2

9	Campos	Com Mielina	Mielina Fina	Amielinica
	1	16	54	1
	2	8	33	3
	3	17	57	3
	4	25	29	1
	5	18	40	1
Média		16,8	42,6	1,8

10	Campos	Com Mielina	Mielina Fina	Amielinica
	1	22	39	1
	2	18	41	2
	3	34	41	1
	4	13	42	1
	5	9	38	1
Média		19,2	40,2	1,2

Contagens individuais do número de fibras de animais *estimulado*

1	Campos	Com Mielina	Mielina Fina	Amielinica
	1	3	37	3
	2	56	68	2
	3	31	62	2
	4	45	58	4
	5	33	58	2
Média		33,6	56,6	2,6

2	Campos	Com Mielina	Mielina Fina	Amielinica
	1	60	77	0
	2	53	41	0
	3	45	60	0
	4	53	47	0
	5	53	49	1
Média		52,8	54,8	0,2

3	Campos	Com Mielina	Mielina Fina	Amielinica
	1	31	79	2
	2	49	88	1
	3	47	33	1
	4			
	5			
Média		42,33333333	66,66666667	1,33333333

4	Campos	Com Mielina	Mielina Fina	Amielinica
	1	71	69	1
	2	88	71	1
	3	34	51	4
	4	65	43	1
	5	77	54	1
Média		67	57,6	1,6

5	Campos	Com Mielina	Mielina Fina	Amielinica
	1	59	67	1
	2	52	50	2
	3	61	73	1
	4	56	83	1
	5	42	90	1
Média		54	72,6	1,2

6	Campos	Com Mielina	Mielina Fina	Amielinica
	1	64	64	3
	2	66	71	3
	3	61	66	2
	4	52	86	1
	5	51	124	3
Média		58,8	82,2	2,4

7	Campos	Com Mielina	Mielina Fina	Amielinica
	1	37	94	2
	2	49	55	2
	3	58	32	2
	4	45	47	2
	5	49	75	1
Média		47,6	60,6	1,8

8	Campos	Com Mielina	Mielina Fina	Amielinica
	1	50	57	4
	2	36	57	2
	3	53	59	2
	4	51	57	3
	5	26	56	1
Média		43,2	57,2	2,4

9	Campos	Com Mielina	Mielina Fina	Amielinica
	1	33	100	2
	2	43	74	1
	3	30	77	3
	4	31	93	2
	5	28	61	1
Média		33	81	1,8

10	Campos	Com Mielina	Mielina Fina	Amielinica
	1	33	54	2
	2	22	99	1
	3	31	101	2
	4	36	102	2
	5	24	46	2
Média		29,2	80,4	1,8

Médias das contagens do número de fibras dos animais controle

Animais	Com Mielina	Mielina Fina	Amielinica
R1	14,20	36,80	2,60
R2	10,80	40,40	1,40
R3	22,40	36,40	2,40
R4	21,40	37,80	2,00
R5	20,20	44,60	1,20
R6	21,40	41,40	1,20
R7	16,80	38,20	2,40
R8	17,80	32,40	2,20
R9	16,80	42,60	1,80
R10	19,20	40,20	1,20

Médias das contagens do número de fibras dos animais estimulados

Animais	Com Mielina	Mielina Fina	Amielinica
R1	33,60	56,60	2,60
R2	52,80	54,80	0,20
R3	42,30	66,60	1,30
R4	67,00	57,60	1,60
R5	54,00	72,60	1,20
R6	58,80	82,20	2,40
R7	47,60	60,60	1,80
R8	43,20	57,20	2,40
R9	33,00	81,00	1,80
R10	29,20	80,40	1,80

Erros padrões de animais controles

Com Mielina	Mielina Fina	Amielinica
4,488	7,419	0,400
1,319	4,366	0,872
2,786	7,075	0,812
7,698	5,370	0,447
0,583	1,077	0,374
2,786	0,872	0,374
3,734	5,589	0,245
2,973	4,261	0,374
2,709	5,573	0,490
4,306	0,735	0,200

Erros padrões de animais estimulados

Com Mielina	Mielina Fina	Amielinica
8,875	5,231	0,400
2,375	6,344	0,200
5,696	17,033	0,333
9,083	5,381	0,600
3,362	6,904	0,200
3,089	11,137	0,400
3,400	10,856	0,200
5,248	0,490	0,510
2,627	6,964	0,374
2,672	12,484	0,200

Erros das médias - controle		
Com Mielina	Mielina Fina	Amielinica
1,144	1,109	0,176

Erros das médias - estimulado		
Com Mielina	Mielina Fina	Amielinica
3,864	3,528	0,223

Espessura da Bainha de Mielina das fibras com mielina (tipo A) de animais controle e estimulado

1	Controle	Estimulado
	0,26	0,27
	0,13	0,34
	0,08	0,12
	0,09	0,23
	0,1	0,2
	0,09	0,3
	0,21	0,15
	0,19	0,46
	0,16	0,21
	0,15	0,19

Média 0,146 0,247

3	Controle	Estimulado
	0,09	0,11
	0,14	0,18
	0,29	0,11
	0,16	0,34
	0,14	0,33
	0,25	0,13
	0,1	0,1
	0,19	0,15

	0,11	0,28
	0,18	0,11

Média 0,165 0,184

5	Controle	Estimulado
	0,14	0,27
	0,56	0,15
	0,18	0,08
	0,11	0,15
	0,22	0,13
	0,15	0,13
	0,09	0,11
	0,21	0,09
	0,09	0,12
	0,17	0,14

Média 0,192 0,137

6	Controle	Estimulado
	0,05	0,12
	0,13	0,16
	0,07	0,11
	0,08	0,16
	0,08	0,06
	0,11	0,22
	0,08	0,31
	0,1	0,07
	0,08	0,11
	0,08	0,03

Média 0,086 0,135

7	Controle	Estimulado
	0,08	0,2
	0,07	0,3
	0,11	0,15
	0,05	0,45
	0,05	0,19
	0,06	0,09
	0,01	0,22
	0,03	0,2
	0,08	0,19
	0,09	0,18

Média 0,063 0,217

8	Controle	Estimulado
	0,05	0,24
	0,13	0,18
	0,07	0,34
	0,08	0,12
	0,08	0,15
	0,11	0,07
	0,08	0,11
	0,1	0,1
	0,08	0,19
	0,08	0,46

Média	0,086	0,196
9	Controle	Estimulado
	0,14	0,18
	0,04	0,1
	0,06	0,3
	0,15	0,16
	0,02	0,01
	0,1	0,19
	0,18	0,01
	0,02	0,29
	0,06	0,08
	0,05	0,24

Média	0,082	0,156
10	Controle	Estimulado
	0,06	0,14
	0,05	0,2
	0,01	0,11
	0,07	0,06
	0,03	0,06
	0,03	0,09
	0,01	0,08
	0,14	0,12
	0,02	0,08
	0,03	0,17

Média 0,045 0,111

Área do Axônio de fibras com mielina (tipo A) de animais controle e estimulado

1	Controle	Estimulado
	0,13	0,24
	0,11	0,17
	0,01	0,11
	0,13	0,31
	0,23	0,26
	0,16	0,32
	0,3	0,34
	0,4	0,06
	0,27	0,24
	0,3	0,01

Média 0,204 0,206

3	Controle	Estimulado
	0,15	0,2
	0,15	0,24
	0,32	0,22
	0,13	0,3
	0,12	0,3
	0,1	0,13
	0,16	0,04
	0,15	0,13

	0,13	0,15
	0,18	0,15
Média	0,159	0,186

5	Controle	Estimulado
	0,12	0,26
	0,09	0,23
	0,48	0,15
	0,14	0,17
	0,25	0,15
	0,03	0,19
	0,04	0,11
	0,21	0,12
	0,22	0,17
	0,13	0,19
Média	0,171	0,174

6	Controle	Estimulado
	0,21	0,35
	0,19	0,44
	0,23	0,37
	0,14	0,44
	0,11	0,25
	0,2	0,36
	0,1	0,44
	0,04	0,22
	0,09	0,32
	0,04	0,22
Média	0,135	0,341

7	Controle	Estimulado
	0,04	0,26
	0,11	0,32
	0,2	0,34
	0,23	0,07
	0,13	0,02
	0,02	0,27
	0,02	0,16
	0,07	0,31
	0,09	0,3
	0,11	0,29
Média	0,102	0,234

8	Controle	Estimulado
	0,17	0,28
	0,13	0,26
	0,08	0,08
	0,66	0,03
	0,01	0,04
	0,01	0,04
	0,01	0,17
	0,24	0,38
	0,05	0,02
	0,25	0,07

Média	0,161	0,137
9	Controle	Estimulado
	0,06	0,1
	0,03	0,29
	0,01	0,27
	0,03	1,16
	0,03	0,07
	0,19	0,14
	0,23	0,08
	0,01	0,13
	0,09	0,07
	0,03	0,33
Média	0,071	0,264
10	Controle	Estimulado
	0,17	0,18
	0,01	0,14
	0,02	0,2
	0,11	0,07
	0,05	0,18
	0,02	0,25
	0,23	0,1
	0,21	0,12
	0,02	0,1
	0,12	0,18
Média	0,096	0,152

Médias das Contagens da Espessura da Bainha de Mielina

Animais	Controle	Estimulado
R1	0,146	0,247
R3	0,165	0,184
R5	0,192	0,137
R6	0,086	0,135
R7	0,063	0,217
R8	0,086	0,196
R9	0,082	0,156
R10	0,045	0,111

Erros Padrões das Médias da Espessura da Bainha de Mielina

Animais	Controle	Estimulado
R1	0,0189	0,0316
R3	0,0205	0,0303
R5	0,0434	0,0165

R6	0,00702	0,0261
R7	0,00932	0,0308
R8	0,00702	0,0384
R9	0,0181	0,0332
R10	0,0123	0,0149

Médias das Contagens da *Área do Axônio*

Animais	Controle	Estimulado
R1	0,204	0,206
R3	0,159	0,186
R5	0,171	0,174
R6	0,135	0,341
R7	0,102	0,234
R8	0,161	0,137
R9	0,071	0,264
R10	0,096	0,152

Erros Padrões das Médias da *Área do Axônio*

Animais	Controle	Estimulado
R1	0,0367	0,0361
R3	0,0192	0,0259
R5	0,0414	0,0146
R6	0,0221	0,0276
R7	0,0224	0,0353
R8	0,0625	0,0405
R9	0,0245	0,104
R10	0,0267	0,0175