

UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO

**AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA E MORFOMÉTRICA
DO NERVO SURAL DE RATAS WISTAR EM
DIFERENTES FASES DO ENVELHECIMENTO:
ESTUDO EM NÍVEL DE MICROSCOPIA DE LUZ**

ANDRÉ JERONIMO

UBERABA – MG

JULHO/2007

ANDRÉ JERONIMO

**AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA E MORFOMÉTRICA
DO NERVO SURAL DE RATAS WISTAR EM
DIFERENTES FASES DO ENVELHECIMENTO:
ESTUDO EM NÍVEL DE MICROSCOPIA DE LUZ**

TESE APRESENTADA AO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA, ÁREA DE CONCENTRAÇÃO “PATOLOGIA GERAL” DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO COMO REQUISITO PARCIAL PARA A OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTOR.

ORIENTADORA: Prof.^a Dr.^a VALÉRIA PAULA SASSOLI FAZAN

UBERABA – MG

JULHO/2007

Catálogo-na-fonte: Biblioteca da UFTM

J54a Jeronimo, André.

Avaliação Morfológica e Morfométrica do Nervo Sural de Ratas Wistar em Diferentes Fases do Envelhecimento: Estudo em Nível de Microscopia de Luz / André Jeronimo. - - 2007.

174 f. : tab.; fig.

Tese de Doutorado em Patologia Geral – Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2007.

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Valéria Paula Sassoli Fazan.

1. Nervo Sural. 2. Envelhecimento. 3. Microscopia de Luz.
4. Nervos periféricos. 5. Ratos. I. Título. II. Fazan, Valéria Paula Sassoli.

CDU – 611.83

TRABALHO REALIZADO NOS:

- Laboratório experimental da Disciplina de Anatomia Humana da Universidade Federal do Triângulo Mineiro
- Laboratório experimental da Disciplina de Fisiologia da Universidade Federal do Triângulo Mineiro
- Laboratório de Neurologia Aplicada e Experimental do Departamento de Neurologia, Psiquiatria e Psicologia Médica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP
- Laboratório de Microscopia e Morfometria do Setor de Cirurgia Experimental de Departamento de Cirurgia e Anatomia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP

APOIO FINANCEIRO:

- UFTM
- FUNEPU
- CAPES
- CNPq
- FAPESP
- FAEPA

“... E você aprende que realmente pode suportar, que é forte, e que pode ir muito mais longe, depois de pensar que não pode mais. E que realmente a vida tem valor e que você tem valor diante da vida, porque nossas dádivas são traidoras, e nos fazem perder o bem que poderíamos conquistar se não fosse o medo de tentar.”

William Shakespeare.

A Minha mãe, Célia

Por ter dedicado sua vida inteira, aos seus filhos. Obrigado pelo apoio e seu amor infinito.

Em memória ao meu pai, Adelino

Somos todos eternos, por nossos atos e ensinamentos, que perduram durante gerações.

À minha esposa, Cláudia

Divido com você esta vitória. Que durante a metade de sua vida, sempre com incentivo, credibilidade e amor, esteve presente nas minhas conquistas.

Te amo.

Aos meus filhos, Giovana e Breno

Vocês são o grande incentivo pelas minhas conquistas, obrigado por cada dia de aprendizado, convivência e amor.

Aos Meus Irmãos, Erminio, Ernani, Edna, Adelina e Francisco

Obrigado pela confiança depositada em mim.

Aos meus sogros, Carlos e Ângela

Pela credibilidade e incentivo constante.

À Professora Doutora Valéria Paula Sassoli Fazan gostaria não só de dedicar esta página, mas todo meu percurso na pós-graduação. Sua sabedoria cultural e humana é algo que servirá de aprendizado pelo resto da minha vida.

Sem estes preceitos, não chegaria até aqui.

Meus sinceros agradecimentos.

AGRADECIMENTOS

- Luciana Sayuri Sanada pela sua grande ajuda no laboratório para a realização deste trabalho.
- Universidade de Uberaba pela oportunidade e reconhecimento do meu trabalho.
- Aos professores da clínica e ao diretor do curso de fisioterapia da Universidade de Uberaba, Prof. Jorge Alfredo Léo, pela compreensão e incentivo.
- Ao Prof. Dr. Vicente de Paula Antunes Teixeira pelo grande apoio e incentivo.
- As secretárias da Pós-Graduação, Denise e Nelma pela paciência e disponibilidade de atendimento.
- A Carla Alem Domingues e Antônio Pedro Alem Sobrinho pelo constante apoio e presença.
- A Maria Cristina, Aracy e Antônio Renato funcionários do laboratório de Neurologia Aplicada e Experimental da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, pelo excelente trabalho técnico.
- A Maria Tereza Maglia pelo trabalho primoroso realizado nos cortes histológicos.
- Aos colegas da Pós-Graduação, que sempre disponíveis me ajudaram.
- Aos funcionários da disciplina de Anatomia da UFTM.
- Aos funcionários da Patologia Geral.
- Aos Professores da Banca de Qualificação.
- Aos funcionários da disciplina de Fisiologia e, em especial, aos do biotério.
- Ao Funcionário João Carlos Ribas Neto, pelo serviços prestado com cuidado dos animais, no biotério do laboratório de Neurologia aplicada experimental.

- Aos Professores que me acolheram em suas disciplinas para que pudesse obter os créditos necessários para defesa do Doutorado.
- A todos aqueles que não foram citados nominalmente, mas que contribuíram nesta minha trajetória.

RESUMO

A função dos nervos periférica é afetada pelo desenvolvimento e pelo envelhecimento. Entretanto, o conhecimento a respeito das diferenças entre os nervos de animais adultos e velhos tem sido embasado em comparações de apenas dois grupos experimentais e tem sido apontada a necessidade de múltiplos grupos experimentais nos estudos de desenvolvimento e envelhecimento. Apesar de algumas descrições de alterações morfológicas nos nervos periféricos de ratos velhos, a maioria dos estudos investigou nervos motores ou mistos, enquanto informações em nervos sensitivos são escassas. O nervo sural é amplamente utilizado em estudos experimentais que investigam lesão e regeneração do sistema nervoso periférico. Apesar dessa ampla utilização, informação a respeito dos aspectos morfológicos e morfométricos do nervo sural de animais velhos não é comum na literatura. Os objetivos do presente estudo foram investigar os aspectos morfológicos e morfométricos do nervo sural em ratos velhos. Para tanto, ratas da linhagem Wistar com 360 (N = 5), 640 (N = 5) e 720 (N = 4) dias de idade foram anestesiadas e perfundidas com solução fixadora (glutaraldeído a 2,5%, em tampão cacodilato de sódio 0,1M) e tiveram os segmentos proximais e distais dos nervos surais direito e esquerdo preparados para inclusão em resina epóxi. A morfometria em nível de microscopia de luz foi realizada com o auxílio de um programa de análise de imagens computacional. Nossos resultados não mostraram diferenças morfométricas significativas entre os segmentos proximais e distal, ou entre os lados direito e esquerdo dos mesmos níveis, em todos os grupos experimentais. Não foi observado aumento no tamanho das fibras mielínicas entre as idades de 360 a 720 dias. Também não foram observadas diferenças no número total de fibras mielínicas entre os grupos. A distribuição das fibras mielínicas se mostrou bimodal, sendo aquela dos animais com 720 dias de vidas desviada para a esquerda, indicando uma redução do diâmetro das fibras nesse grupo experimental.

A distribuição da razão G dos animais com 720 dias de vida também se mostrou desviada para a esquerda, o que sugere a presença de atrofia axonal. Alterações morfológicas decorrentes do envelhecimento foram observadas, principalmente relacionadas à bainha de mielina e aos vasos endoneurais. As principais alterações observadas foram: quebras e dobras (para dentro e para fora) da bainha de mielina, edema da bainha de mielina, alargamento das incisuras de Schmidt-Lantermann, presença de macrófagos adjacentes ou no interior da bainha de mielina, vasos colabados e com paredes espessas. Anormalidades axonais não foram tão comuns ou tão óbvias quanto as da bainha de mielina mas a presença de algumas figuras de degeneração Walleriana também foram encontradas. As fibras de maior calibre foram mais afetadas que as de menor calibre. Essas alterações foram observadas em todos os grupos experimentais mas foram menos pronunciadas nos ratos com 360 dias de vida e a severidade das lesões aumentou com o aumento da idade dos animais. Não foram observadas diferenças na severidade das lesões entre os segmentos proximais e distais dos nervos. Em conclusão, a morfologia do nervo sural dos ratos é afetada pelo envelhecimento, principalmente a bainha de mielina das fibras de grande calibre, o que pode se refletir morfometricamente nas diferenças observadas nos histogramas de distribuição das fibras e da razão G.

ABSTRACT

Peripheral nerve function is significantly affected by maturation and ageing. However, knowledge regarding differences between the nerves of adult and aged animals has been based on comparisons of only two experimental groups, and it has been pointed out the need for multiple time points in maturation and ageing studies. Despite some descriptions of peripheral nerve morphologic alterations in aged rats, most of the studies used motor or sensory-motor nerves, while information on sensory nerves is scanty. The sural nerve in rats is widely used in experimental studies investigating injury and regeneration of the peripheral nervous system. Despite this wide utilization, information on morphological and morphometric aspects of aged rats sural nerve is not common in the literature. The aims of the present study were to investigate morphological and morphometric aspects of the sural nerve in aged rats. Female Wistar rats aged 360 (N = 5), 640 (N = 5) and 720 (N = 4) days were killed, and proximal and distal segments of the right and left sural nerves were prepared for epoxy resin embedding. Light microscopy morphometry was carried out with the aid of a computer software. Our results showed no morphometric differences between proximal and distal segments or between right and left sides at the same levels of the sural nerves in all experimental groups. No increase in fiber and axon sizes was observed from 360 to 720 days. Also, no difference in total myelinated fiber number was observed between groups. Myelinated fiber population distribution was bimodal, being the 720-days old animals' distribution shifted to the left, indicating a reduction of the fiber diameters. The G ratio distribution of the 720-days old animals' myelinated fiber was also shifted to the left, which suggests axonal atrophy. Morphological alterations due to ageing were observed, mainly related to the myelin sheath and endoneurial vessels. The main alterations observed were: myelin splitting, enfolding and out folding, myelin sheath swelling, Schmidt-Lantermann incisures enlargement, presence

of macrophages adjacent or within the dilated sheaths, collapsed vessels with apparently thickened walls. Axon abnormalities were not as common or as obvious as the myelin changes but Wallerian degeneration was also found. Large fibers were more affected than the smaller ones. These alterations were observed in all experimental groups but were much less pronounced in rats aged 360 days and their severity increased with ageing. No differences in severity between the lesions in the proximal and distal segments could be detected. In conclusion, rat the sural nerve morphology is affected by ageing, mainly the myelin sheaths of the larger fibers, which might be morphometrically reflected on the differences observed on the myelinated fiber and G ratio distributions.

SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO.....	14
1.1 – Fundamentação	15
1.2 – Nervo Sural em Humanos	16
1.3 – Nervo Sural em Ratos	18
1.4 – Morfometria de Nervos Periféricos.....	20
1.5 – Desenvolvimento e Maturação dos Nervos Periféricos	22
2 – OBJETIVOS	25
2.1 – Objetivos Gerais	26
2.2 – Objetivos Específicos.....	26
3 – MÉTODOS	27
3.1 – Animais	28
3.2 – Grupos Experimentais	28
3.3 – Procedimentos Histológicos	29
3.4 – Análise Morfológica e Morfométrica	32
3.5 – Análise Estatística	36
3.5.1 – <i>Comparação Morfométricas Intra-grupos</i>	37
3.5.2 – <i>Comparação Morfométrica Entre os Grupos</i>	37
4 – RESULTADOS	39
4.1 – Dados Ponderais	40
4.2 – Análise Morfológica	41
4.3 – Morfometria dos Fascículos	50
4.3.1 – <i>Ratos do Grupo I – 360 dias</i>	50
4.3.2 – <i>Ratos do Grupo II – 640 dias</i>	53
4.3.3 – <i>Ratos do Grupo III – 720 dias</i>	56
4.3.4 – <i>Comparação Entre os Diferentes Grupos</i>	59
4.4 – Morfometria das Fibras Mielínicas	67
4.4.1 – <i>Ratos do Grupo I – 360 dias</i>	67
4.4.2 – <i>Ratos do Grupo II – 640 dias</i>	69
4.4.3 – <i>Ratos do Grupo III – 720 dias</i>	72

4.4.4 – <i>Comparação entre os Diferentes Grupos</i>	74
4.5 – Histogramas de distribuição de diâmetro mínimo das fibras mielínicas e seus respectivos axônios e da distribuição de frequência da razão G.....	81
4.5.1 – <i>Ratos do Grupo I – 360 dias</i>	81
4.5.2 – <i>Ratos do grupo II – 640 dias</i>	86
4.5.3 – <i>Razão do grupo III – 720 dias</i>	91
4.5.4 – <i>Comparação entre os Diferentes Grupos</i>	96
5 – DISCUSSÃO	99
5.1 – Dados Ponderais e Modelo Animal.....	100
5.2 – Dados Morfológicos	102
5.3 – Dados Fasciculares	107
5.4 – Fibras Mielínicas e seus Respectivos Axônios	112
CONCLUSÕES	116
RESUMO	118
ABSTRACT	121
REFERÊNCIAS	124
ANEXOS	133

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Anatomia do nervo sural em humano	17
Figura 2: Anatomia do nervo sural em ratos	19
Figura 3: Bomba perfusão e posicionamento do animal para fixação	30
Figura 4: Dissecção dos nervos surais	31
Figura 5: Montagem seqüencial desses campos microscópico.....	34
Figura 6: Binarização dos Campos Microscópicos	35
Figura 7: Peso corporal dos ratos dos diversos grupos experimentais.....	41
Figura 8: Secções transversais semifinas dos nervos surais – Grupo I	42
Figura 9: Secções transversais semifinas dos nervos surais – Grupo II	43
Figura 10: Secções transversais semifinas dos nervos surais – Grupo III	44
Figura 11: Espaço endoneural dos fascículos dos nervos surais	46
Figura 12: Lesão das Fibras dos nervos surais.....	47
Figura 13: Lesão dos vasos dos nervos surais	49
Figura 14: Área fascicular total dos nervos surais	60
Figura 15: Diâmetro mínimo fascicular dos nervos surais	61
Figura 16: Número total de fibras mielínicas dos nervos surais	62
Figura 17: Densidade das fibras mielínicas dos nervos surais	63
Figura 18: Número de núcleos de células de Schwann dos nervos surais	64
Figura 19: Densidade dos núcleos de células de Schwann dos nervos surais	65
Figura 20: Porcentagem da área fascicular total ocupada pelas fibras mielínicas dos nervos surais.....	66
Figura 21: Área média das fibras mielínicas dos nervos surais	75
Figura 22: Diâmetro mínimo médio das fibras mielínicas dos nervos surais	76
Figura 23: Área média da bainha de mielina das fibras mielínicas dos nervos surais	77

Figura 24: Área média dos axônios mielinizados dos nervos surais	78
Figura 25: Diâmetro mínimo médio dos axônios das fibras mielínicas dos nervos surais	79
Figura 26: Razão G média das fibras mielínicas dos nervos surais	80
Figura 27: Histogramas de distribuição de diâmetro mínimo das fibras mielínicas dos nervos surais de ratos do grupo I, animais com 360 dias de vida.....	82
Figura 28: Histogramas de distribuição de diâmetro mínimo dos axônios mielinizados dos nervos surais de ratos do grupo I, animais com 360 dias de vida.....	84
Figura 29: Histogramas de distribuição de frequência da razão G das fibras mielínicas dos nervos surais de ratos do grupo I, animais com 360 dias de vida	85
Figura 30: Histogramas de distribuição de diâmetro mínimo das fibras mielínicas dos nervos surais de ratos do grupo II, animais com 640 dias de vida.....	87
Figura 31: Histogramas de distribuição de diâmetro mínimo dos axônios mielinizados dos nervos surais de ratos do grupo II, animais com 640 dias de vida.....	89
Figura 32: Histogramas de distribuição de frequência da razão G das fibras mielínicas dos nervos surais de ratos do grupo II, animais com 640 dias de vida.....	90
Figura 33: Histogramas de distribuição de diâmetro mínimo das fibras mielínicas dos nervos surais de ratos do grupo III, animais com 720 dias de vida.....	92
Figura 34: Histogramas de distribuição de diâmetro mínimo dos axônios mielinizados dos nervos surais de ratos do grupo III, animais com 720 dias de vida.....	94
Figura 35: Histogramas de distribuição de frequência da razão G das fibras mielínicas dos nervos surais de ratos do grupo III, animais com 720 dias de vida.....	95
Figura 36: Histogramas de distribuição de frequência do diâmetro mínimo das fibras mielínicas dos nervos surais.....	96
Figura 37: Histogramas de distribuição de frequência do diâmetro mínimo dos axônios mielinizados dos nervos surais.....	97
Figura 38: Histogramas de distribuição de frequência da razão G das fibras mielínicas dos nervos surais.....	98

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Parâmetros morfométricos fasciculares dos nervos surais dos ratos do grupo I	52
Tabela 2: Parâmetros morfométricos fasciculares dos nervos surais dos ratos do grupo II	55
Tabela 3: Parâmetros morfométricos fasciculares dos nervos surais dos ratos do grupo III	58
Tabela 4: Parâmetros morfométricos das fibras mielínicas e dos axônios mielinizados dos nervos surais dos ratos do grupo I.....	69
Tabela 5: Parâmetros morfométricos das fibras mielínicas e dos axônios mielinizados dos nervos surais dos ratos do grupo II.....	71
Tabela 6: Parâmetros morfométricos das fibras mielínicas e dos axônios mielinizados dos nervos surais dos ratos do grupo III.....	74
Tabela 7: Resumo dos principais achados no sistema nervoso periférico, decorrentes do envelhecimento	106

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	Celcius
DPM	Desvio padrão da média
EPM	Erro padrão da média
et al.....	e colaboradores
Fibras/mm ²	Fibras por milímetro quadrado
g	grama/gramas
M	Molar
mm ²	Milímetro quadrado
mg/Kg	Micro grama por quilo
N.....	Número de animais analisados
n.....	nervo
Núcleos/mm ²	Núcleos por milímetro quadrado
NVC	Velocidade de condução nervosa
O _s O ₄	Tetróxido de Ósmio
p	probabilidade
PBS.....	solução salina tamponada
pH	Potencial hidrogeniônico
Razão G.....	razão obtida entre o diâmetro do axônio e o diâmetro da fibra
µm.....	micrômetro
µm ²	micrômetro quadrado
%.....	Porcentagem

1 INTRODUÇÃO

1.1 Fundamentação

O conhecimento do normal ou do comum em um sistema experimental é básico para a pesquisa biológica. Na ausência dessa informação, alterações induzidas experimentalmente não podem ser determinadas ou avaliadas apropriadamente. Um dos fatores que freqüentemente complica a interpretação dos dados é a falta de informações a respeito do que seria o esperado para um animal controle, intacto e “normal”, de uma determinada idade não comumente utilizada em investigações de laboratório (GILMORE, 1972).

Nos últimos anos, observa-se um aumento da utilização de animais de experimentação para estudos crônicos (de sobrevivência) aos efeitos da exposição a baixos níveis de substâncias tóxicas, na tentativa de se reproduzir doenças metabólicas humanas de desenvolvimento lento, ou para se estudar os efeitos do envelhecimento sobre o sistema nervoso central e periférico (VAN STEENIS, KROES, 1971). Esses últimos requerem um entendimento detalhado dos nervos de animais controles de mesma idade, sexo e peso corporal, para que se possam separar as alterações adquiridas com o avançar da idade daquelas induzidas pelas lesões neuropatológicas.

Ratos são freqüentemente escolhidos para estudos experimentais de neuropatias tóxicas e metabólicas, envolvendo estudos combinados de eletrofisiologia, morfologia e bioquímica. No entanto, como enfatizado por Jefferys et al., (1978), a interpretação de pequenas mudanças na velocidade de condução está cercada de uma grande dificuldade, pois além da ampla variabilidade interanimais, os nervos de ratos não oferecem uma situação experimental estacionária devido às mudanças decorrentes do crescimento, que continuam durante uma parte substancial da vida pós-natal e que afeta tanto o diâmetro da

fibra quanto a velocidade de condução.

Investigações prévias neste laboratório (JERONIMO et al., 2005), comparando o nervo sural de ratos Wistar fêmeas em grupos de 30, 90 e 180 dias de idade, mostraram que este apresenta um crescimento simétrico e contínuo do fascículo e das fibras mielínicas, mais acentuado no período entre 30 e 90 dias, o que pode afetar diretamente a velocidade de condução das fibras mielínicas. Além disso, o mesmo estudo mostrou que a distribuição dos diâmetros das fibras mielínicas se altera com a idade, passando de unimodal para bimodal. Esse dado, se não conhecido adequadamente, poderá trazer erros importantes de interpretação em estudos experimentais.

1.2 Nervo Sural em Humanos

Dos nervos periféricos em humanos que são acessíveis para biópsia, o nervo sural é o mais comumente utilizado. Localizado entre o maléolo lateral e o tendão do calcâneo, o nervo tem trajeto superficial, é constante na sua localização e relativamente protegido dos traumas (JACOBS; LOVE, 1985).

O nervo sural em humanos é formado na perna, entre as duas cabeças do músculo gastrocnêmio, pela união do nervo cutâneo medial da sura (ramo do nervo tibial) e o ramo comunicante fibular (ramo do nervo fibular na fossa poplíteia). Situa-se próximo à veia safena parva, na margem lateral do tendão do calcâneo, e continua distalmente para o intervalo entre o maléolo lateral e o osso calcâneo. Ao longo do seu trajeto, emite ramos para a pele do dorso da perna e comunica-se com o nervo cutâneo posterior da coxa. O nervo passa posteriormente, abaixo do maléolo lateral e continua-se como nervo cutâneo

dorsal lateral ao longo da borda lateral do pé e do quinto dedo. No dorso do pé, comunica-se com o nervo cutâneo dorsal intermédio, ramo do fibular superficial (Figura 1) (GARDNER et al., 1978).



Figura 1: Nervos sural em humanos é formado na perna, entre as duas cabeças do músculo gastrocnêmio, pela união do nervo cutâneo medial da sura (ramo do nervo tibial) e o ramo comunicante fibular (ramo do nervo fibular na fossa poplíteia).

Contém fibras autonômicas e sensoriais porém não apresenta fibras somato-motoras. A avaliação das biópsias do nervo sural pode auxiliar, de forma importante, o diagnóstico das desordens neurológicas periféricas. Entretanto, existe uma escassez de informações sobre dados morfológicos e morfométricos normais, sendo que muito da informação disponível está dispersa na literatura, na forma de dados de sujeitos controles, ou com suspeita de neuropatia e diagnóstico de biópsia normal, em publicações sobre condições

patológicas de nervos periféricos. Entretanto, dados disponíveis sobre o nervo sural em humanos, de indivíduos mais velhos, poderão ser úteis na comparação com os dados obtidos no presente estudo.

1.3 Nervo Sural de Ratos

Em 1963, Greene realizou uma descrição detalhada da origem e trajeto do nervo sural de ratos (GREENE, 1963). Esse autor descreve que, em ratos, o nervo sural é um ramo direto do nervo fibular comum, na região da coxa, e que continua em uma bainha comum deste nervo, juntamente com o nervo tibial, por uma extensão variável, ainda na coxa. O nervo sural pode emitir um ramo chamado “sural lateral” para a pele da superfície lateral da sura, durante seu trajeto através da fossa poplítea. Na sua continuação entre o músculo bíceps femoral e a cabeça lateral do músculo gastrocnêmio, ele está acompanhado pelos vasos surais superficiais. Abaixo da borda posterior dos músculos do jarrete, ele se torna superficial em seu trajeto e envia um ramo para a pele da face lateral e do terço distal da perna, o ramo anastomótico fibular. Esse ramo anastomótico, localizado abaixo do tendão calcâneo, se comunica com o nervo plantar lateral e, através dessa anastomose, o nervo sural inerva o lado lateral do quinto dedo. Ao terminar, o nervo sural passa atrás do maléolo lateral e desaparece na pele e fáscia da região do tornozelo e do calcanhar (GREENE, 1963). Essa descrição da origem do nervo sural, que parece ser bem definida como uma regra nos ratos, não é a que ocorre usualmente nos humanos (Figura 2).

Enquanto, em humanos, o nervo sural não apresenta um componente somatomotor, em ratos, pela presença do ramo anastomótico para o nervo plantar lateral, o nervo sural contém um pequeno número de fibras motoras destinadas à inervação dos músculos

abductor do quinto dedo, flexor curto do quinto dedo e lumbricais. Essas fibras motoras representam 3% de todos os motoneurônios do nervo isquiático (VEJSADA et al., 1999). A grande maioria dos componentes somáticos do nervo sural de ratos, cerca de 96%, é composta de axônios dos neurônios do gânglio da raiz dorsal, que inerva a pele lateral e distal da perna e do pé do animal (SWETT; WOOLF, 1985).

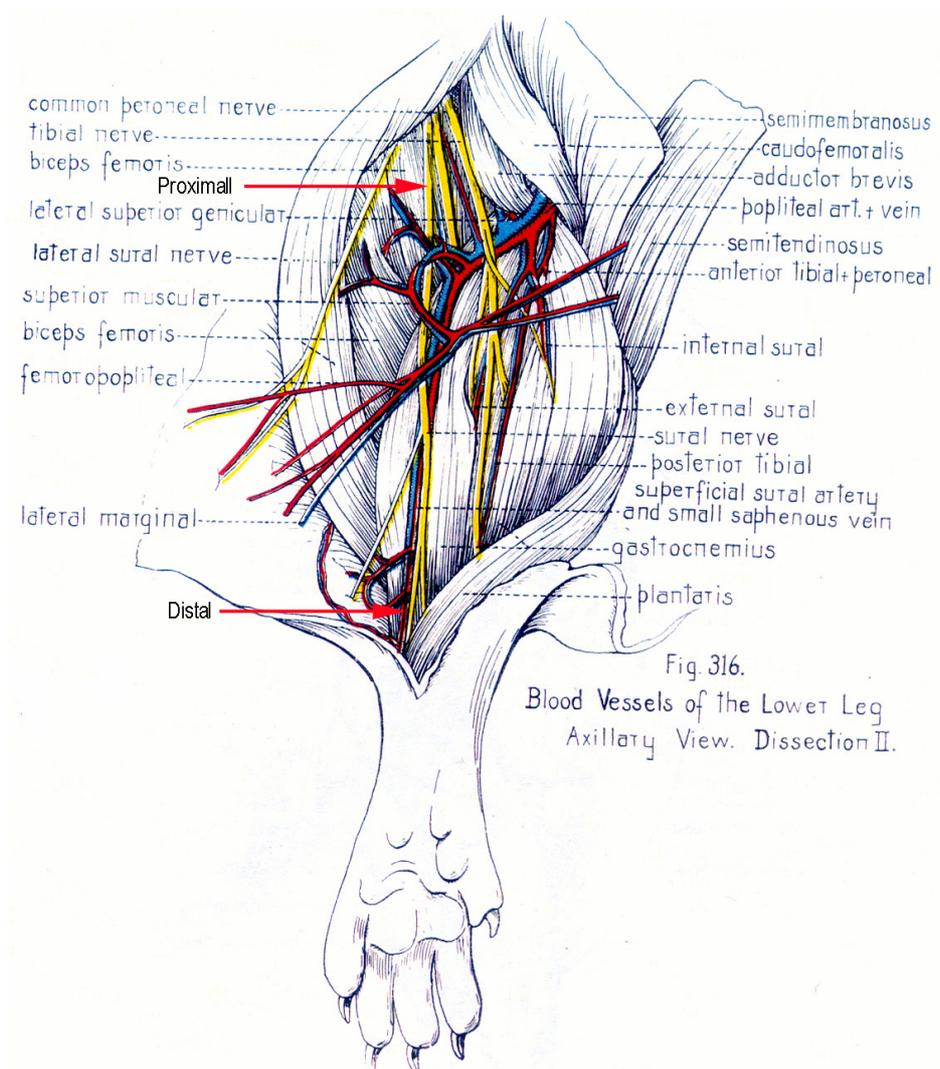


Figura 2: Nervos sural do rato desde sua origem até o seu desaparecimento no nível do calcâneo. Setas vermelhas indicando os segmentos proximal e distal do nervo sural. Observar que no segmento proximal não há presença de vasos acompanhando o nervo. No segmento distal o nervo sural está acompanhado da artéria sural superficial e da veia safena parva.

1.4 Morfometria de Nervos Periféricos

No final do século XIX iniciaram-se as primeiras investigações morfométricas das fibras mielínicas de nervos periféricos (BEHSE, 1990). Ranvier, em 1875, (apud BEHSE, 1990) descreveu o fato de que, quanto maior o calibre da fibra, mais longo são os internodos. Em 1904, determinou-se a relação entre o comprimento internodal e o diâmetro de fibras isoladas (BOYCOTT, 1904). Donaldson; Hoke (1905) durante suas investigações sobre a área do axônio e da bainha de mielina em secções transversais de nervos espinhais de vertebrados, encontraram uma relação do tipo 1:1 entre bainha e axônio.

Ficou estabelecido que, em estudos morfométricos de fibras mielínicas, os parâmetros anatômicos mais relevantes são o comprimento e o diâmetro do segmento internodal, o diâmetro axonal e a espessura da bainha de mielina (BEHSE, 1990).

Rexed (1944) estudou o desenvolvimento pós-natal e o tamanho das fibras em nervos periféricos humanos. Sunderland et al. (1949) investigaram o número e o calibre das fibras em nervos cutâneos humanos e Sunderland e Bradley (1949) determinaram o número de fascículos e a porcentagem da sua área de secção transversal em um tronco nervoso em alguns nervos humanos. Jeronimo et al. (2005), ao analisar parâmetros normais da morfologia e da morfometria do nervo sural de ratas Wistar de 30, 90 e 180 dias de vida, descreveram a área fascicular, o número de fibras mielínicas e de núcleos de células de Schwann presentes no fascículo, a densidade das fibras mielínicas e dos núcleos das células de Schwann, a porcentagem da área ocupada pelas fibras mielínicas, área da fibra mielínica, do axônio e da bainha de mielina e a distribuição do diâmetro das fibras, axônios e da razão G nos nervos surais, nos segmentos proximais e distais, dos lados

direito e esquerdo.

Grande motivação para estudos morfométricos em nervos periféricos se instalou quando os neurofisiologistas tentaram correlacionar velocidade de condução nervosa e diâmetro da fibra (GASSER; ERLANGER, 1927; GASSER; GRUNDFEST, 1939). Investigações adicionais foram realizadas para se obter uma classificação referente ao diâmetro das fibras mielínicas aferentes e eferentes (ECLES; SHERRINGTON, 1930; LLOYD, 1943; LLOYD; CHANG, 1948).

O objetivo principal de estudos morfométricos de nervos normais é a obtenção de valores característicos e específicos que permitam a comparação com nervos anormais (MEZIN et al., 1994). A análise morfométrica de nervos tem sido extensivamente utilizada em pesquisas sobre reparo dos mesmos (ORGEL; TERZIS, 1977); (LUGNEGARD et al., 1984a); (OLIVEIRA et al., 2004), regeneração (GUTMANN; SANDERS, 1943); (SCHRODER, 1972); (LUTHMAN et al., 1988); (MENDONÇA et al., 2003); (RASO et al., 2005), implante e transplante (LUGNEGARD et al., 1984b); (SECKEL et al., 1986); MACKINNON et al., 1987); (DE SÁ et al., 2004), sendo que os métodos quantitativos constituem ferramentas importantes no estudo de neuropatias experimentais. Além disso, a morfometria tem sido amplamente utilizada nas investigações de modelos experimentais de doenças que acometem o sistema nervoso periférico, tais como o diabetes (RODRIGUES FILHO; FAZAN, 2005); (FAZAN et al., 2006), a hipertensão (FAZAN et al., 1999); FAZAN et al., 2001), (FAZAN et al., 2005) e o envelhecimento (JERONIMO et al., 2005).

Além da ampla utilização da morfometria nos estudos de neuropatias, essa técnica tem se mostrado extremamente útil nas definições de parâmetros normais de nervos, tanto no homem (BERTHOLD, 1968); (FRAHER, 1978); (SWALLOW, 1966); (O'SULIVAN;

SWALLOW, 1968) quanto em animais de laboratório (FRIEDE; SAMORAJSKI, 1967); (FAZAN et al., 1997); (FAZAN et al., 2002), sendo que os dados obtidos fornecem a base morfológica para os estudos dos danos causados pelas doenças que acometem o sistema nervoso periférico.

A utilização de técnicas morfométricas para diagnóstico de neuropatias periféricas é também extensamente utilizada na prática clínica (ORGEL; TERZIS, 1977); (LUGNEGARD et al., 1984b), (TORCH et al., 1989a) de forma que essa técnica torna o diagnóstico o mais rápido e confiável possível. Assim sendo, não é surpresa o grande número de métodos que têm sido empregados na morfometria de nervos, numa tentativa de se ganhar mais precisão na obtenção de dados quantitativos.

Em estudos experimentais com ratos, o nervo sural tem sido amplamente utilizado naqueles trabalhos que envolvem lesões nervosas e a necessidade de interposição de um segmento de nervo (CUNHA; SILVA, 1997); (JERGOVIC et al., 1998), estudos de dor neuropática experimental (DECOSTERED; WOOLF, 2000); (LEE et al., 2000), trabalhos com estimulação elétrica para estudos de fibras C (GOZARIU et al., 2000), transplantes de patas (YEH et al., 2000) e, principalmente, estudos de regeneração nervosa (POLVLSSEN et al., 1993; BARANOWSKI et al., 1994; NAVARRO et al., 1994).

1.5 Desenvolvimento e Maturação do Nervo Periférico

A função dos nervos periféricos é significativamente afetada pela idade, sendo os déficits funcionais consequência de perda de fibras, anormalidades da bainha de mielina ou alterações do tecido conjuntivo e vascularização nervosa. A idade também influencia a

capacidade dos nervos periféricos se regenerarem e reinervarem os órgãos-alvo, com diferentes padrões para fibras motoras, sensitivas a autonômicas (VERDU et al., 1996). Entretanto, em estudos de envelhecimento, diferenças entre os animais adultos e velhos são comumente baseados em apenas dois grupos experimentais (um grupo de adulto e outro de animais velhos), ao passo que toda a vida e a duração dos períodos de crescimento devem ser cuidadosamente levados em consideração para se comprovar especificamente que animais adultos e velhos estejam sendo comparados (CEBALLOS et al., 1999). Coleman et al. (1990) chamaram a atenção para a necessidade e a importância de múltiplos grupos experimentais nos estudos de maturação e envelhecimento. A realização de um estudo prévio em nosso laboratório, utilizou três grupos experimentais, 30, 90 e 180 dias de vida para descrever os parâmetros normais do nervo sural de ratas Wistar (JERONIMO et al., 2005).

Estudos eletrofisiológicos encontraram redução na velocidade de condução nervosa em animais mais velhos comparados aos jovens (VERDÚ et al., 2000). Entretanto, existem algumas controvérsias em relação a essa redução. Alguns estudos mostram um declive linear na velocidade de condução nervosa com a idade (LAFRATA; CASTETRARI, 1966); (DORFMAN; BOSLEY, 1979), e outros mostraram uma diminuição não linear (TROJABORG, 1976); (TAYLOR, 1984); (SCHMELZER; LOW, 1987); (BOUCHE et al., 1993).

Quando o nervo periférico de ratos é estudado através de técnicas morfológicas e morfométricas, avaliando-se várias fases da vida, estudos demonstraram que alterações não lineares estão presentes em vários parâmetros (CEBALLOS et al., 1999), confirmando o que se observa nos estudos de velocidade de condução. Verdú et al. (2000) descreve que existe uma aparente estabilização morfológica dos nervos periféricos de camundongos de

6 a 12 meses de idade, sendo que 12 meses representa o final do período de maturação das fibras mielínicas. Em ratos da linhagem Wistar, Sharma et al. (1980), mostraram que o diâmetro das fibras mielínicas apresenta um crescimento muito rápido até o 40º dia de vida pós-natal e continuam a crescer com uma taxa menor, estabilizando no 6º mês de vida. Esses autores demonstraram, na análise da curva de crescimento dos animais, que há um rápido aumento do peso corporal desses animais até o 100º dia de vida. Estes continuam crescendo, com velocidade menor, até por volta do 6º mês de idade e, então, o peso corporal se estabiliza para idades maiores. Existe, portanto, clara evidência de crescimento contínuo nos nervos periféricos por um período de, pelo menos seis meses de idade.

Interessante mencionar que são raros os estudos que descrevem a morfometria normal dos nervos periféricos de ratos com idades acima de um ano, uma vez que essa idade não é comumente utilizada em experimentos. Entretanto, uma vez que experimentos de regeneração necessitam do estudo por longo tempo de sobrevivência, o conhecimento dos valores normais se faz necessário, principalmente daquelas variáveis que sabidamente se alteram com a idade.

2 OBJETIVO

2.1 Objetivos Gerais

O objetivo do presente trabalho foi realizar uma descrição detalhada dos parâmetros normais da morfologia e morfometria do nervo sural de ratos da linhagem Wistar, fêmeas, em diferentes fases do seu envelhecimento, bem como determinar se estes parâmetros mudam ao longo do nervo (estudo longitudinal) e/ou se existe diferença entre os níveis correspondentes dos lados direito e esquerdo do mesmo animal.

2.2 Objetivos Específicos

1- Descrever os aspectos morfológicos e morfométricos gerais dos nervos surais de ratos da linhagem Wistar, fêmeas, em diferentes segmentos do mesmo nervo.

2- Descrever os aspectos morfológicos e morfométricos gerais dos nervos surais de ratos da linhagem Wistar, fêmeas, nos lados direito e esquerdo do mesmo animal.

3- Acompanhar as eventuais alterações morfológicas e morfométricas dos nervos surais de ratos da linhagem Wistar, fêmeas, decorrentes do envelhecimento, comparando 3 fases de vida dos animais entre si, em diferentes segmentos do mesmo nervo.

4- Acompanhar as eventuais alterações morfológicas e morfométricas dos nervos surais de ratos da linhagem Wistar, fêmeas, decorrentes do envelhecimento, comparando 3 fases de vida dos animais entre si, nos lados direito e esquerdo do mesmo animal.

3 MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados ratos albinos da linhagem Wistar, fêmeas, provenientes do Biotério da Disciplina de Fisiologia da Universidade Federal do Triângulo Mineiro. Esses animais foram transferidos para o Biotério de Criação e Manutenção, do Laboratório de Neurologia Aplicada e Experimental, do Departamento de Neurologia, Psiquiatria e Psicologia Médica, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP (FMRP-USP), onde permaneceram até o dia do experimento. Os animais foram mantidos aos trios, em gaiolas plásticas grandes (34 x 42 x 37 cm), em ambiente com temperatura e umidade do ar controlados, ciclo claro/escuro de 12 horas (início do ciclo as 7:00 horas) e receberam água e ração (Nuvilab CR1 - Nuvital®) *ad libitum*, até o dia do experimento. A composição da ração encontra-se apresentada em anexo. Os procedimentos experimentais utilizados no presente estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da FMRP-USP, sob o protocolo de número 184/2005 . Todos os esforços foram realizados no sentido de reduzir o número de animais utilizados nesse estudo.

3.2 Grupos Experimentais

Os experimentos se iniciaram com 24 animais, provenientes de 4 ninhadas, separados aleatoriamente nas caixas, para aguardar a data do experimento. Ao final dos experimentos, foram utilizados 17 animais, separados em três grupos experimentais, de acordo com o tempo de envelhecimento (contado em dias de vida):

1- Grupo I: Animais com 360 dias de vida (N = 8) (aproximadamente 1 ano de vida)

2- Grupo II: Animais com 640 dias de vida (N = 5) (aproximadamente 1 ano e 9 meses de vida)

3- Grupo III: Animais com 720 dias de vida (N = 4) (aproximadamente 2 anos de vida)

Na data marcada para o experimento com os animais do Grupo I, todos os 24 animais estavam vivos e em boas condições. Foram utilizados 8 animais nesse dia e os 16 animais restantes, aguardaram as futuras datas para os experimentos. Na data marcada para o experimento com os animais do Grupo II, restavam 14 animais, dos quais 5 foram utilizados, e o restante (9 animais) continuaram aguardando o último experimento. Aos 720 dias, restavam somente 4 animais, que foram utilizados para completar o Grupo III.

3.3 Procedimentos Histológicos

Imediatamente antes do experimento, os animais foram pesados e profundamente anestesiados com tiopental sódico (Thionembatal, Abbott, S.A.), na dose de 40 mg/Kg, por via intraperitoneal. Após posicionamento do animal na mesa cirúrgica, em decúbito dorsal, com as patas fixadas em abdução, foi realizada uma ampla abertura da cavidade abdominal para exposição do diafragma. Após a secção do mesmo, junto à sua origem esternocostal, a cavidade torácica foi aberta lateralmente, através da secção das costelas, para exposição do coração. Após punção do ventrículo cardíaco esquerdo e a secção do átrio direito, os animais foram perfundidos sistemicamente, com auxílio com uma bomba de perfusão, como mostra a figura 3. Inicialmente, o leito vascular foi lavado com salina tamponada (PBS 0,05 M), para a remoção do sangue do interior dos vasos. A seguir, foi realizada a

perfusão com a solução fixadora, composta de glutaraldeído a 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,4, preparada imediatamente antes da perfusão. Tanto a solução salina tamponada (PBS 0,05 M) quanto a solução fixadora (glutaraldeído a 2,5 %) foram perfundidas na proporção de 1 ml de solução para cada 1 g de peso corporal do animal.

Os nervos surais direitos e esquerdos foram retirados das patas posteriores, em toda sua extensão, desde sua origem a partir do nervo isquiático, até o nível do maléolo lateral, imediatamente antes da sua distribuição para o território cutâneo correspondente (Figura 4).

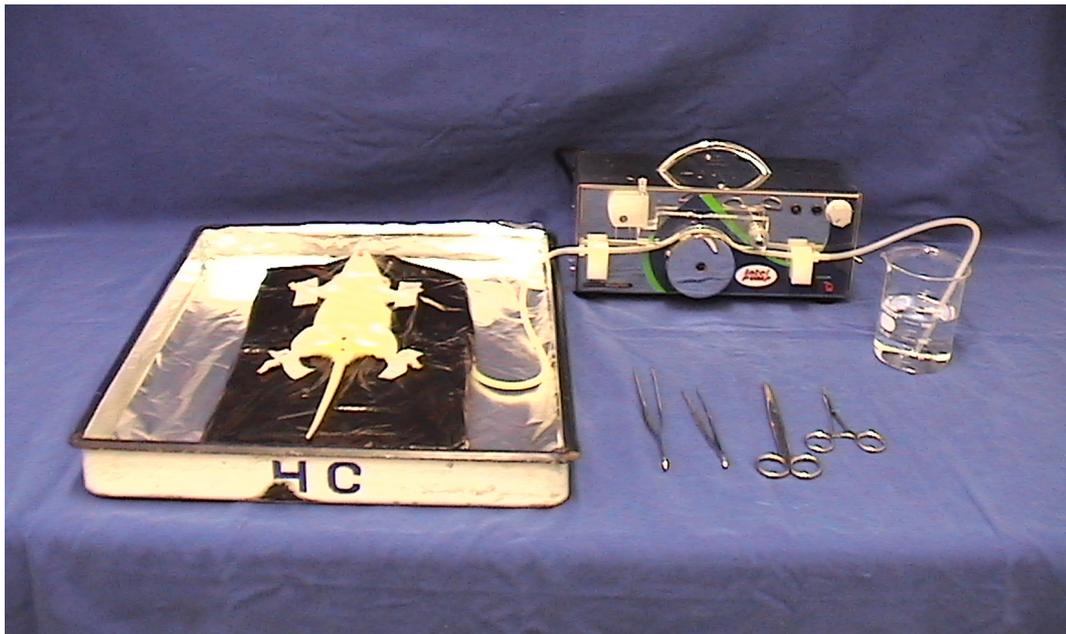


Figura 3: Fotografia ilustrativa da bomba de perfusão, instrumental cirúrgico e posicionamento do animal anestesiado para início da perfusão intra-cardíaca.

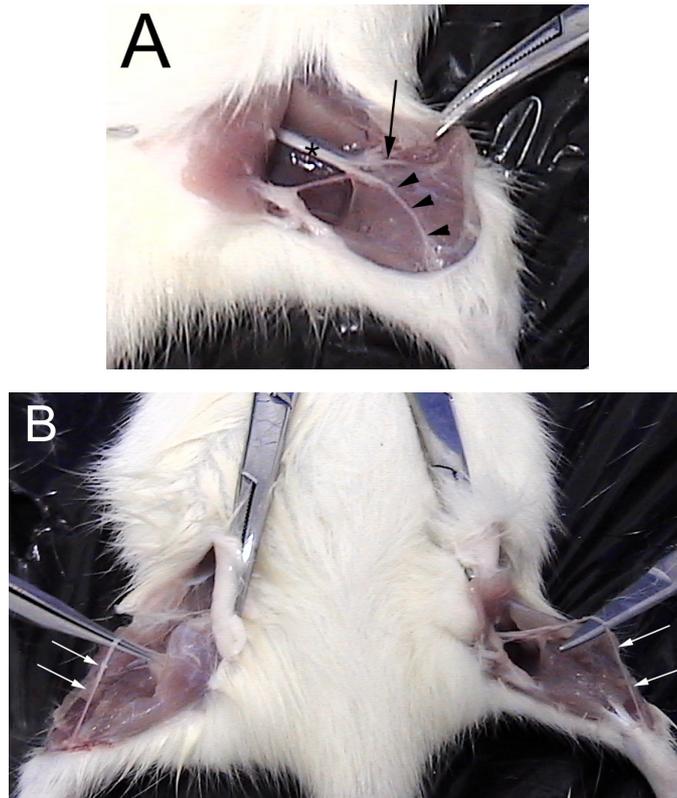


Figura 4: A: Dissecação do nervo sural direito (cabeça de setas), desde sua origem como ramo direto do nervo isquiático (asterisco) até seu desaparecimento no nível do calcanhar. Notar que o nervo ainda se encontra aderido à fáscia dos músculos da sura. A seta indica a origem do nervo fibular comum. B: Dissecação bilateral completa do nervo sural (setas brancas), imediatamente antes da sua retirada para processamento histológico.

Os nervos foram pós-fixados por imersão na mesma solução fixadora utilizada na perfusão, por pelo menos 12 horas e preparados com técnicas histológicas convencionais, padronizadas no Laboratório de Microscopia e Morfometria do Setor de Cirurgia Experimental do Departamento de Cirurgia e Anatomia da FMRP-USP. Os segmentos proximal e distal dos nervos surais foram pós-fixados com OsO_4 a 1% em tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH 7,4, por duas horas a 4 °C, desidratados em concentrações crescentes de etanol e incluídos em resina epóxi Polibed 812® (Polysciences, Inc.). Colocados em moldes de silicone, os fragmentos nervosos foram orientados sob lupa para a futura obtenção de secções transversais. Uma vez incluídos os fragmentos, os blocos foram removidos dos moldes e aparados com lâminas descartáveis para microtomia.

Os segmentos proximais e distais dos nervos estudados tiveram, secções transversais semifinas (0,2 a 0,3 μ m de espessura) obtidas com navalhas de vidro através de um ultramicrotomo MT 6000 – XF (RMC Inc.), transferidas para lâminas de vidro com uma gota de água destilada, secadas em placa aquecedora a 60 °C e coradas com azul de toluidina a 1% em ácido bórico saturado. Tais secções foram utilizadas para estudos de microscopia de luz. Os procedimentos histológicos utilizados nesse trabalho são aqueles utilizados de rotina no preparo de espécimes de nervos, para estudos tanto em nível de microscopia de luz (FAZAN et al., 1999); (JERONIMO et al., 2004); (JERONIMO et al., 2005); (RODRIGUES FILHO; FAZAN, 2006); (FAZAN et al., 2006); (SCHIAVONI; FAZAN, 2006) quanto em nível de microscopia eletrônica de transmissão (FAZAN et al., 1997); (FAZAN et al., 2001); (FAZAN et al., 2002); (SATO et al., 2006). Tais procedimentos foram realizados no Laboratório de Microscopia e Morfometria do Setor de Cirurgia Experimental do Departamento de Cirurgia e Anatomia da FMRP-USP.

3.4 Análise Morfológica e Morfométrica

As secções transversais semifinas dos segmentos proximais e distais dos nervos retirados foram observadas em um fotomicroscópio (Axiophot II, Carl Zeiss) usando as objetivas 40 e/ou 100 vezes, com imersão em óleo. Quando necessário, lentes auxiliares (optovar de 1,25 ou 1,6 vezes) foram utilizadas para proporcionar uma ampliação adicional das imagens. As imagens dos fascículos foram digitalizadas com o auxílio de uma câmara de alta resolução (TK- 1270, JVC) acoplada a um microcomputador (IBM/PC-AT Pentium® 100), equipado com uma interface digitalizadora de imagens. As camadas celulares perineurais e os vasos capilares do interior dos fascículos foram identificados

nessas imagens, por inspeção visual, e contados. Dessas mesmas imagens, foram obtidas as medidas da área e diâmetro mínimo dos fascículos, com o auxílio de um programa analisador de imagens (KS 400, v 2.0). O diâmetro mínimo é o menor diâmetro obtido de uma estrutura de forma aparentemente circular. Após a digitalização da imagem dos fascículos, com o auxílio de uma platina motorizada acoplada ao microscópio, campos microscópicos adjacentes, da área endoneural dos mesmos, foram digitalizadas. Essa platina motorizada proporcionou o deslocamento automático das lâminas, em campos microscópicos com 640 x 470 pixels, sem sobreposição dos mesmos.

Essas imagens adjacentes da área endoneural geraram um número entre 6 e 30 quadros (dependendo do tamanho do fascículo), que foram digitalizados com objetiva de 100 vezes com imersão em óleo, lente auxiliar (optovar) de 1,6 vezes e lente da câmera de 0,5 vezes. A montagem seqüencial desses campos microscópicos (quadros) gera a imagem da secção transversal do fascículo correspondente (figura 5). Em cada campo microscópico digitalizado, as fibras mielínicas e os núcleos das células de Schwann foram contados na sua totalidade e, ao término desse processo, o número total e a densidade (número/mm²) de fibras mielínicas e de núcleos de células de Schwann foram obtidos. Todas essas imagens foram digitalizadas em cores, no formato RGC (vermelho, verde e azul).

Para as medidas das fibras mielínicas, as imagens dos campos microscópicos passaram por um processo de identificação da bainha de mielina, através de uma ferramenta do programa computacional, capaz de identificar, por seleção de cores, as estruturas desejadas. As estruturas marcadas, especificamente a bainha de mielina, foram então transformadas em uma imagem binária em preto e branco, para que pudessem ser identificadas de maneira automática (figura 6).

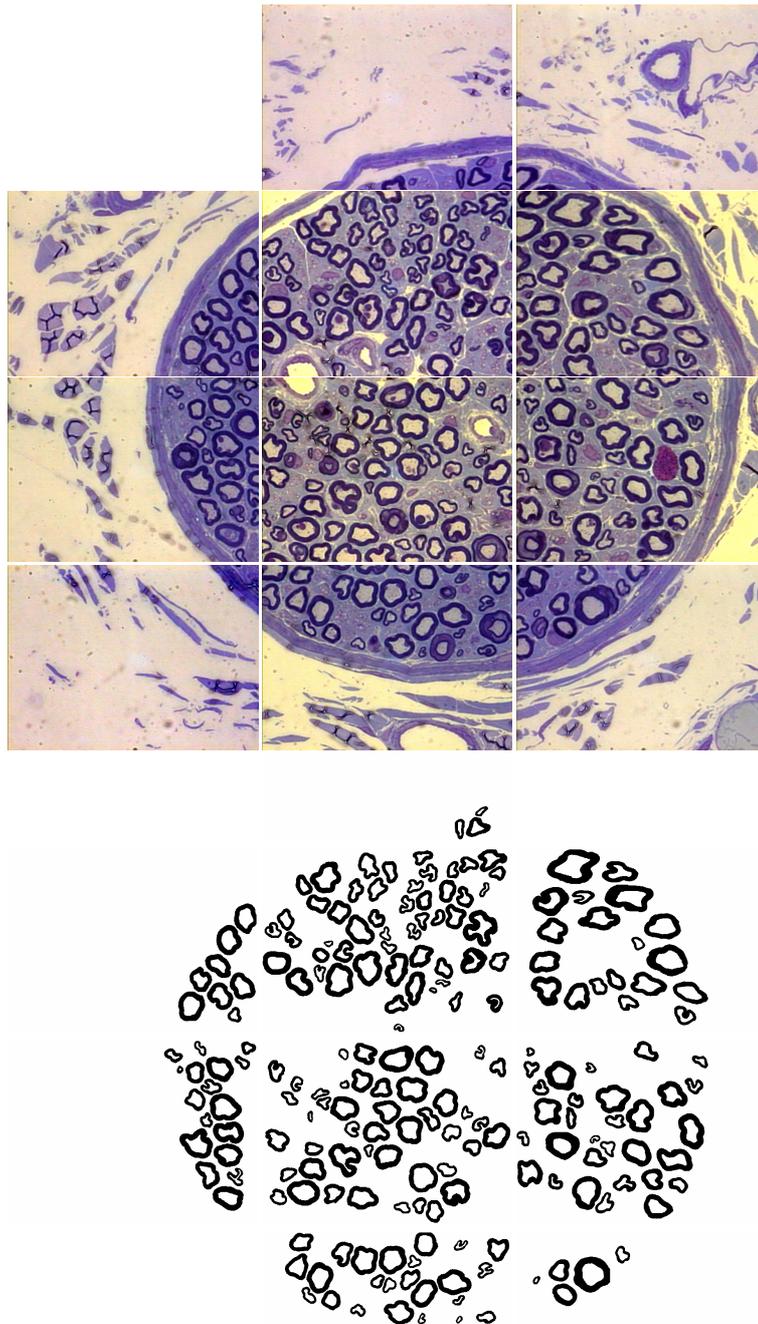


Figura 5: *Painel superior:* Figura ilustrativa da montagem seqüencial de campos microscópicos digitalizados com objetiva de 100 vezes com imersão a óleo, lente auxiliar (optovar) de 1,6 vezes e lente da câmara de 0,5 vezes. A montagem seqüencial desses campos microscópicos (quadros) gera a imagem da secção transversal do fascículo correspondente. Coloração= azul de toluidina a 1%. *Painel inferior:* figura ilustrativa da montagem seqüencial dos campos microscópicos do mesmo fascículo representado à esquerda, com imagens binárias em preto e branco. Notar que as fibras que tocavam as bordas dos quadros foram eliminadas na imagem binária.

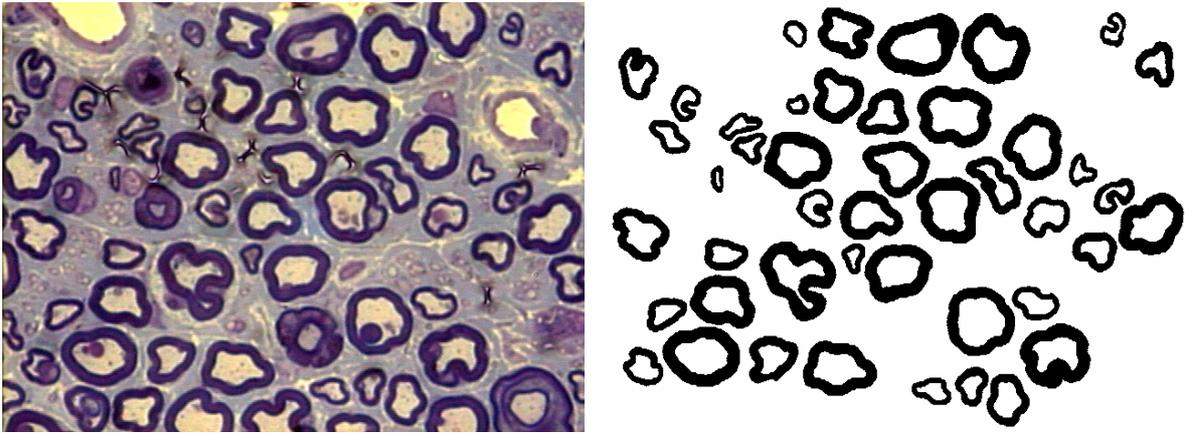


Figura 6: *Painel esquerdo:* Exemplo de campos microscópico com 640 x 470 pixels, digitalizado, no formato RGB, a partir de um fascículo do nervo sural. Essa imagem foi digitalizada com objetiva de 100 vezes com imersão em óleo, lente auxiliar (optovar) de 1,6 vezes e lente da câmera de 0,5 vezes. Coloração= azul de toluidina a 1%. *Painel direito:* figura ilustrativa da imagem binária em preto e branco do mesmo quadro apresentado em A. Notar que as fibras que tocavam as bordas dos quadros foram eliminadas na imagem binária.

Durante esse processo, as fibras irregulares, as que se apresentaram seccionadas no nível do nó de Ranvier ou nas incisuras de Schmidt-Lanterman e as que tocam as bordas dos quadros são automaticamente eliminadas. Neste estudo foram medidas 60 a 84% de todas as fibras miélicas presentes no espaço endoneural. Após esse processo, o programa ainda permite um ajuste manual da imagem para que pequenas irregularidades e/ou artefatos possam ser eliminados antes da realização das medidas automáticas. Concluído o ajuste, foram obtidos, automaticamente, tanto do diâmetro mínimo axonal, definido pelo limite externo do axolema, quanto o diâmetro mínimo da fibra, definido pelo limite externo das lamelas de mielina. A razão entre ambos os diâmetros, conhecida como razão G, que é uma medida indicativa do grau de mielinização (SCHMITT; BEAR, 1937); (RUSHTON, 1951); (SMITH; KOLES, 1970), a área da fibra, do respectivo axônio e a área da bainha de mielina foram então calculadas. Os resultados dessas medidas possibilitaram a elaboração de planilhas eletrônicas utilizadas na representação gráfica e na análise estatística dos

dados. A porcentagem da área fascicular total, ocupada pelas fibras mielínicas foi também calculada.

Histogramas de distribuição de tamanho das fibras mielínicas e dos seus respectivos axônios foram construídos, com intervalos de classe de 0,5 μm . Histogramas de distribuição da razão G foram construídos, com intervalos de classe de 0,1. Esses histogramas foram construídos com o auxílio do aplicativo Sigma Plot, versão 9.01 (Jandel Scientific).

Todos os procedimentos morfométricos descritos no presente estudo, foram realizados nos Laboratórios de Microscopia e Morfometria, do Setor de Cirurgia Experimental do Departamento de Cirurgia e Anatomia, e de Neurologia Aplicada e Experimental, do Departamento de Neurologia, Psiquiatria e Psicologia Médica, ambos da FMRP-USP.

3.5 Análise Estatística

O teste de Kolmogorov-Smirnov foi aplicado para testar a normalidade da distribuição de todos os dados obtidos (peso corporal e dados morfométricos), através do aplicativo Sigma Stat, versão 3.1 (Jandel Scientific). Em seguida, a equivalência das variâncias foi testada automaticamente, através do teste de medianas de Levene, por esse mesmo programa, antes de prosseguir com o teste desejado. Os dados de peso corporal apresentaram distribuição normal e foram comparados entre grupos através de uma análise de variância para fator único (ONE WAY ANOVA), seguida do pós-teste de Holm-Sidak.

3.5.1 Comparações Morfométricas Intra-Grupos:

Para a análise dos dados morfométricos, aqueles parâmetros que passaram no teste de normalidade e no teste de equivalência das variâncias, os valores médios foram comparados pelo teste de t de Student pareado (entre os segmentos proximais e distais), ou não pareado (entre os lados direito e esquerdo).

Os parâmetros morfométricos que não apresentaram distribuição normal, foram comparados entre os segmentos proximais e distais, através do teste não paramétrico de Wilcoxon. A comparação dos valores médios obtidos para os segmentos de mesmo nível, entre os lados direito e esquerdo, foram comparados através do teste de Mann-Whitney. Nenhum parâmetro analisado apresentou distribuição normal e não equivalência das variâncias.

Os histogramas de distribuição do tamanho das fibras, do tamanho dos axônios e da razão G, foram comparados entre os segmentos proximal e distal de um mesmo lado e entre lados através de uma análise de variância para fator único (ONE WAY ANOVA), on Ranks, uma vez que todos os dados não apresentaram uma distribuição normal.

3.5.2 Comparações Morfométricas Entre os Grupos:

Para a análise de dados morfométricos entre os grupos, aqueles parâmetros que passaram no teste de normalidade e no teste de equivalência das variâncias, os dados foram comparados entre grupos através de uma análise de variância para fator único (ONE WAY ANOVA), seguida de um pós-teste de Tukey.

Para a análise de dados morfométricos entre os grupos, aqueles parâmetros que não passaram no teste de normalidade e/ou no teste de equivalência das variâncias, os dados

foram comparados entre grupos através de uma análise de variância para fator único (ONE WAY ANOVA) on Ranks, seguida de um pós-teste de Dunn.

Para as comparações dos histogramas entre os grupos, foi utilizada uma análise de variância bi-variada (TWO WAY ANOVA), seguida de um pós-teste de Dunn, uma vez que todos os dados não apresentaram distribuição normal.

O nível de significância adotado para todas as análises foi o de $p < 0,05$