

UNIVERSIDADE DO SAGRADO CORAÇÃO

JULIA MENEZES LOPES GONÇALVES

**EFEITO DA ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA DE MÉDIA
FREQUÊNCIA NA REGENERAÇÃO DO MÚSCULO
TIBIAL CRANIAL APÓS NEURORRAFIA
TÉRMINO-LATERAL DO NERVO FIBULAR DE
RATOS**

BAURU

2015

JULIA MENEZES LOPES GONÇALVES

**EFEITO DA ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA DE MÉDIA
FREQUÊNCIA NA REGENERAÇÃO DO MÚSCULO
TIBIAL CRANIAL APÓS NEURORRAFIA TÉRMINO-
LATERAL DO NERVO FIBULAR COMUM DE RATOS**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Centro de Ciências
da Saúde como parte dos requisitos
para obtenção do título de bacharel
em Biomedicina, sob orientação do
Professor Dr. Geraldo Marco Rosa
Junior.

BAURU

2015

G635e	<p data-bbox="511 1381 917 1413">Gonçalves, Julia Menezes Lopes</p> <p data-bbox="511 1444 1242 1570">Efeito da estimulação elétrica de média frequência na regeneração do músculo tibial cranial após neurorrafia término-lateral do nervo fibular de ratos / Julia Menezes Lopes Gonçalves. -- 2015.</p> <p data-bbox="555 1572 646 1600">41f. : il.</p> <p data-bbox="555 1625 1156 1654">Orientador: Prof. Dr. Geraldo Marco Rosa Junior.</p> <p data-bbox="511 1680 1242 1770">Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade do Sagrado Coração – Bauru – SP.</p> <p data-bbox="511 1795 1242 1890">1. Neurorrafia Término-Lateral. 2. Eletroestimulação. 3. Nervo fibular. 4. Músculo tibial cranial. I. Rosa Junior, Geraldo Marco. II. Título.</p>
-------	---

JULIA MENEZES LOPES GONÇALVES

**EFEITO DA ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA DE MÉDIA
FREQUÊNCIA NA REGENERAÇÃO DO MÚSCULO
TIBIAL CRANIAL APÓS NEURORRAFIA TÉRMINO-
LATERAL DO NERVO FIBULAR DE RATOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Centro de Ciências da Saúde da Universidade do Sagrado Coração como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Biomedicina sob orientação do Prof. Dr. Geraldo Marco Rosa Junior.

Banca examinadora:

Prof. Dr. Geraldo Marco Rosa Junior
Universidade do Sagrado Coração

Prof. Me. Carlos Henrique Fachin Bortoluci
Universidade do Sagrado Coração

Bauru, 25 de Novembro de 2015.

Dedico esse trabalho a minha família,
principalmente a minha mãe.

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente a Deus por me presentear com uma família maravilhosa, que me criou, me guiou e me fizeram chegar aqui com tanto esforço, amor e carinho. Sem esquecer de agradecer aos meus amados pais Adriane Gonçalves e Roberto Gonçalves, que estiveram todo esse tempo ao meu lado, me orientando e promovendo o ensino mais importante, que vem de dentro do nosso lar.

Ao meu irmão Roberto Gonçalves Junior que mesmo distante esteve presente em meu coração com toda força de sempre.

Agradeço aos meus avós Lauricy Menezes e Antônio Lopes, que sempre com tanta doçura, almoços gostosos e amor dobrado foram papéis fundamentais para minha criação e participaram assiduamente da minha carreira escolar.

A minha madrinha Andréa Menezes, sempre tão presente e participativa, uma segunda mãe com o coração enorme, que soube lidar com todos os momentos difíceis que passei.

À tão lembrada vovó Fiica, que de lá do céu, guiou cada passo meu, me abençoou e permitiu que toda minha jornada fosse iluminada.

Aos meu primos irmãos Mariana, Bárbara e Dillian, bases fortes e animadas que me ajudaram a chegar onde cheguei.

Ao meu namorado tão paciente Renan Miranda, que trouxe pra minha vida tudo aquilo que me faltava, me ajudou e me acompanhou nessa jornada.

Às minha amigas Nicoli, Camila, Rafaela, Maitê, Flávia, Débora, Marielle e Giedre que foram mais que amigas, foram parceiras, irmãs de estudos e de coração.

A meu querido orientador Geraldo Marco Rosa Junior, que foi papel fundamental para meu crescimento científico e de pesquisa juntamente com os professores Luís Henrique Simionato e Carlos Fachin e o grupo de estudos GEIM, em especial as amigas Marcella, Thais, Tamiris, Izabella, Letícia e Carla, grandes alunos que tornaram a jornada muito mais fácil com o trabalho em grupo.

À Universidade do Sagrado Coração e a todos os professores que me proporcionaram todos esses anos, ensino de qualidade e desenvolvimento estudantil.

Obrigada a todos por participarem da minha vida, estará guardado comigo, em meu coração todos os momentos, amo vocês!

“Arregacei as mangas, passei um batom e preendi o cabelo. Estou pronta e partindo pra luta, não me subestime, tenho tudo que preciso aqui comigo... Força, fé, saúde, coragem e Deus.”
(Autor Desconhecido)

RESUMO

Introdução: A estimulação elétrica de média frequência é um dos recursos utilizados no processo de reabilitação das características tróficas do tecido muscular. A lesão nervosa periférica ocasiona uma perda funcional elevada ao paciente. A Neurorrafia Término Lateral (NTL), é uma técnica cirúrgica que resulta num grande percentual de recuperação nesse tipo de lesão. A NTL, pelo trauma cirúrgico provocado na fibra nervosa, leva a atrofia das fibras musculares. A utilização das correntes elétricas de média frequência pode minimizar essa sequela. **Objetivo:** Este trabalho objetivou estudar a eficiência da estimulação elétrica de média frequência, na regeneração do músculo tibial cranial após secção e neurorrafia termino-lateral do coto distal do nervo fibular à face lateral do nervo tibial. **Metodologia:** Foram utilizados 48 ratos *Wistar*, machos, com 80 dias de vida, fornecidos pelo Biotério da Universidade do sagrado coração - USC. Os animais foram divididos, aleatoriamente nos seguintes grupos: Grupo Controle Inicial (GCI) com 8 animais, Grupo Controle Cirúrgico 90 dias (GCC90) com 8 animais, Grupo Neurorrafia Término-Lateral com Estimulação Aussie 90 dias (EA90) com 8 animais, Grupo Neurorrafia Término Lateral com Estimulação Russa 90 dias (ER90) com 8 animais Grupo Desnervado 90 dias (GD90) com 8 animais e Grupo Controle final 90 dias (GCF90) com 8 animais. Para avaliar a melhora funcional e histológica foram realizadas análises morfométricas dos tecidos musculares, a eletromiografia e a análise de marcha de todos os grupos, comparando a resposta entre os mesmos. **Resultados:** Houve regeneração do músculo tibial cranial e do nervo fibular através da Neurorrafia término-lateral. A eletroestimulação através das correntes Aussie e Russa promoveram melhoria significativa da marcha. **Conclusão:** Houve um resultado superior, e significativo, avaliado pelos testes de análise de variância e Tukey, $p \leq 0,05$ entre os valores das médias da área e do diâmetro mínimo das fibras dos grupos EA90 e ER90 em relação ao grupo GCC90, indicando que o efeito da EE foi positivo para a recuperação morfométrica do musculo após a Neurorrafia término- lateral. Não foi observada diferença significativa entre os diferentes tipos de eletroestimulação.

Palavras-Chave: Neurorrafia termino-lateral; Eletroestimulação; Nervo fibular; Músculo tibial cranial.

ABSTRACT

Introduction: Electrical stimulation of medium frequency is one of the resources used in the process of rehabilitation of the trophic characteristics of muscle tissue. Peripheral nerve injury causes a high functional loss to the patient. The end-to-side neurorrhaphy (ESN), is a technique that has a large recovery percentage in this type of injury. ESN, the surgical trauma caused in the nerve fiber, leads to atrophy of muscle fibers. The use of medium frequency electrical currents will minimize this sequel. **Objective:** This research aimed was to study the efficiency of electrical stimulation of medium frequency in the regeneration of the cranial tibial muscle after section and end-lateral neurorrhaphy the distal stump of the peroneal nerve to the lateral aspect of the tibial nerve. **Methods:** 48 males Wistar rats were used, with 80 days of life, provided by the biotery of the University of the Sacred Heart - USC. The animals were divided randomly into the following groups: Initial Control Group (ICG) with 8 animals, Surgical Control Group 90 days (SCG90) with 8 animals, Neurorrhaphy End Side Group with Aussie Stimulation 90 days (AS90) with 8 animals, Neurorrhaphy End Side Group with Russian Stimulation 90 days (RS90) with 8 animals, Denervated Group 90 days (DG90) with 8 animals and Ultimate Control Group 90 days (UCG90) with 8 animals. To evaluate the functional and histological morphometric improvement were performed of muscle tissues and electromyography and walking trak analisys of all groups, comparing the response across the same. **Results:** There was regeneration of the cranial tibial muscle and the peroneal nerve by end-side neurorrhaphy. Electrical stimulation through Aussie and Russian currents caused significant improvement in the walking trak. There was a greater result, and mean, among the average values of the area and the minimum diameter of the fibers of AS90 and RS90 groups in relation to SCG90 group, indicating that the effect of electrical stimulation was positive for morphometric muscle recovery after end-side neurorrhaphy. **Conclusion:** There was no significant difference between the different types of stimulation.

Keywords: Neurorrhaphy End-Side; Electrostimulation; Peroneal nerve; Cranial tibial muscle.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Parâmetros para eletroestimulação.....	18
Figura 2:Cápsula metálica utilizada para imobilização dos animais durante protocolo das correntes.....	19
Figura 3: Demonstração do teste eletrofisiológico.....	20
Figura 4:Separação dos grupos de estudo para avaliação de Índice Funcional do nervo fibular.....	24
Figura 5: Resultado da latência do teste eletrofisiológico	25
Figura 6: Resultado da amplitude do teste eletrofisiológico	26
Figura 7:Gráfico das médias das áreas das fibras do músculo tibial nos grupos estudados. Letras minúsculas iguais não diferem entre si, $p \leq 0,05$	27
Figura 8:Gráfico das médias dos diâmetros menores das fibras do músculo tibial nos grupos estudados.....	28

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:Índice funcional do ciático dos animais em um período de 6 semanas pós-cirúrgico*	23
Tabela 2:Análise eletrofisiológica com dados da amplitude e latência*	24
Tabela 3:Médias (μm^2) e Desvio Padrão das Áreas das Fibras do Músculo Tibial. Letras diferentes apresentam diferença estatística ($p \leq 0,05$).	26
Tabela 4:Médias (μm) e Desvio Padrão dos Diâmetros das Fibras do Músculo Tibial.....	27

LISTA DE ABREVIATURAS

kHz-Quilohertz

ms- Milissegundo

mg- Miligrama

kg- Quilograma

cm-Centimêtro

ml- Mililitro

HE- Hematoxilina-Eosina

GB- Giga Byte

DDR- Taxa de dupla transferência

TB- Tera Byte

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVOS	15
2.1 OBJETIVO GERAL	15
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
3 METODOLOGIA	16
3.1 ANIMAIS	16
3.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS	16
3.3 CIRURGIA	17
3.4 ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA	17
3.5 TESTE DE MARCHA	19
3.6 TESTE ELETROFISIOLÓGICO	19
3.7 COLETA DAS PEÇAS HISTOLÓGICAS DOS MÚSCULOS E SACRIFÍCIO	21
3.8 PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO DOS MÚSCULOS: TIBIAL CRANIAL	21
3.9 DIGITALIZAÇÃO DAS IMAGENS DOS MÚSCULOS	21
3.10 MEDIDAS DAS FIBRAS MUSCULARES	21
3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA	21
4 RESULTADOS	23
4.1 OBSERVAÇÕES EXTERNAS	23
4.2 ANÁLISE DE MARCHA	23
4.3 ELETRONEUROMIOGRAFIA	24
4.4 ANÁLISE MORFOMÉTRICA DO MÚSCULO TIBIAL CRANIAL	26
5 DISCUSSÃO	29
5.1 MODELO ANIMAL	29
5.2 AUTOFAGIA	29
5.3 ANESTÉSICO E VIA DE ADMINISTRAÇÃO	29
5.4 AVALIAÇÃO FUNCIONAL DA MARCHA	30
5.5 ELETRONEUROMIOGRAFIA	31
5.6 ANÁLISE DO MÚSCULO TIBIAL CRANIAL	31
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	33
7 CONCLUSÕES	34
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35
9 ANEXOS	38
9.1 ANEXO 1 – ESTATÍSTICA M. TIBIAL CRANIAL - ÁREA	38
9.2 ANEXO 2 – PROTOCOLO DE APROVAÇÃO DO CÔMITE DE ÉTICA	39

1 INTRODUÇÃO

Um nervo periférico, quando lesionado, sofre alterações em diversos pontos, inclusive perde sua capacidade de inervação e conseqüentemente o músculo é comprometido pela perda de função. (CHEM, 1978; DA-SILVA, 1995).

O nervo pode ser lesionado por doenças inflamatórias, genéticas, neoplásicas e até mesmo rupturas. Tais lesões provocam inúmeras alterações nos cotos do nervo, fazendo com que seja necessário, por meio de cirurgia, a religação dos nervos para possível reinervação. A neurorrafia término-terminal (NTT) vem sendo muito utilizada como recurso cirúrgico no reparo de lesões de nervo periférico (ROVAK *et al.*, 2001). Segundo YU *et al.*, (2011) o nervo doador possui ramos, onde os axônios promovem um processo de brotamento colateral sendo transferidos ao nervo coaptado até que atinjam a estrutura-alvo.

A neurorrafia término-lateral foi proposta por Viterbo, 1992 & Viterbo *et al.*, (1994) que optou pela não remoção do epineuro e não causar lesão ao nervo doador. Esta pesquisa foi realizada em ratos, onde foi feita a secção do nervo fibular inervando o músculo tibial cranial e tendo seu coto suturado a face lateral do nervo tibial. Sendo assim, a reinervação cumpriu com seu objetivo e não causou prejuízo ao nervo doador, tornando a neurorrafia término-lateral uma técnica muito utilizada em pesquisas, por permitir a utilização de qualquer nervo sem causar nenhum dano ao mesmo. Quando ocorre uma desnervação, não se observa a substituição de tecido muscular por tecido fibroso, no entanto, pode ser observada uma substituição por tecido adiposo. (BOWDEN & GUTMANN, 1944).

Certamente, a neurorrafia não pode ser constatada como totalmente efetiva, pois é necessário que o nervo esteja em boa função e mantendo o movimento de contração.

Hoje, para o tratamento de lesões nervosas periféricas, é muito utilizada a eletroestimulação, que busca manter a funcionalidade do membro, retardando sua atrofia muscular. Para outros pesquisadores, a eletroestimulação também estimula a proliferação das células satélites, diminuindo a apoptose. (LIM, 2010; ZHANG et al., 2010; GUO et al., 2012).

São comuns as investigações extensas sobre a eletroestimulação, mas ainda assim não se sabe se todos os procedimentos são realmente funcionais. Por isso, os pesquisadores entram em desacordo quanto à frequência, duração, intensidade e parâmetros de avaliação (NEMETH, 1982; KANAYA; TAJIMA, 1992; WILLIAMS, 1996; IÑIGO, 1998; GORDON et al., 2009; MACIEL et al., 2013). Como tratamento, a estratégia clínica utilizada tem sido a estimulação elétrica que permite uma melhora muscular significativa. (DELITTO A.; SNYDER-MACKLER, 1990).

De acordo com Delitto e Rose (1986), existe atualmente no mercado dois tipos distintos de corrente de média frequência, a corrente Russa e a Aussie. A corrente Russa apresenta os seguintes dados: frequência de 2,5 kHz e burst de 4ms. É recomendado que a corrente seja utilizada durante 10 minutos por sessão e alternadamente, podendo ser utilizada no tratamento da atrofia muscular e aumento de força, associada a exercícios físicos esse aumento de força tem um resultado significativo.

Ward (2007) explica que a corrente Aussie possui parâmetros funcionais semelhantes ao da corrente Russa, podendo ser diferenciada através do pulso de 2 ms, do comprimento de onda e da frequência de 1kHz, alternadamente. Segundo alguns estudos, certos dados devem ser mantidos para que a estimulação seja eficiente e não provoque dano e desconforto a quem a utilizará, esses dados mantêm um Burst durando 2 ms e a frequência de 1 kHz.

O estudo da regeneração nervosa e da recuperação de um músculo após neurografia termino-lateral e eletroestimulação pode ser efetuado por meio de análises de alterações histológicas, da marcha, da medida de velocidade da

condução elétrica e análise eletromiográfica, parâmetros estes avaliados neste trabalho. (DE MEDINACELLI *et al.*, 1982; BAIN *et al.*, 1989; SATO, 2005).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Verificar a eficácia da estimulação elétrica através de Correntes Elétricas de média frequência, Aussie e Russa na regeneração morfológica e funcional da musculatura estriada esquelética (músculo tibial cranial) após neurorafia-término-lateral no nervo fibular de ratos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar a regeneração funcional e morfométrica do músculo tibial cranial nos grupos em estudo;

Comparar os resultados entre os grupos que sofreram inervação e estimulação com os grupos que não sofreram nenhum desses procedimentos;

Comparar os resultados funcionais com os resultados morfológicos e verificar apresentação de resultados semelhantes;

Efetuar as avaliações estatísticas e a partir dos resultados comparar e verificar qual dos grupos obteve melhor resultado.

3 METODOLOGIA

3.1 ANIMAIS

Os procedimentos realizados seguiram as normas dos Princípios Éticos na Experimentação Animal criado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), para os quais foram recebidos o protocolo de número 1042/2013 após a análise do Comitê de Ética.

Utilizaram-se 48 ratos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Wistar, machos com 80 dias de vida, que foram dividiram em grupos experimentais e controles, sendo sacrificados com 90 dias. O fornecimento de todos os animais foi feito pelo Biotério da Universidade do Sagrado Coração.

3.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os animais foram divididos em:

- Grupo Controle inicial (GCI) com 8 animais,
- Grupo Controle Cirúrgico 90 dias (GCC90) com 8 animais,
- Grupo Neurorrafia Término-Lateral com Estimulação Aussie 90 dias (EA90) com 8 animais,
- Grupo Neurorrafia Término-Lateral com Estimulação Russa 90 dias (ER90) com 8 animais,
- Grupo Desnervado 90 dias (GD90) com 8 animais e
- Grupo Controle final 90 dias (GCF90) com 8 animais.

Nos Grupos GD90, o nervo fibular foi seccionado e seus cotos foram invertidos 180 graus. O coto distal foi fixado à musculatura subjacente. O coto proximal foi transpassado por uma incisão na musculatura glútea e suturado no plano subcutâneo a fim de impedir reinervação motora.

Nos Grupos EA90 e ER90, o nervo fibular foi seccionado e seu coto proximal encurvado medialmente 100 graus, a musculatura adjacente foi transfixada e suturado na face superficial dessa musculatura, impedindo dessa forma, a regeneração espontânea. O coto distal do nervo fibular foi

encurvado, aproximadamente 80 graus, e suturado lateralmente ao nervo tibial. Após a cirurgia, os animais receberam estimulação elétrica Aussie e Russa, respectivamente, no músculo tibial cranial como parte do tratamento.

3.3 CIRURGIA

Padronizou-se o método no qual todos os procedimentos cirúrgicos e de coleta foram realizados pelo pesquisador. Os animais foram anestesiados em cada procedimento cirúrgico com ketamina (80 mg/Kg) e xilasina (10 mg/Kg) intramuscular após realização da tricotomia. Houve uma incisão no dorso-lateral de 3 cm do membro posterior direito longitudinalmente ao maior eixo do membro, deixando pele e tecido subcutâneo comprometidos com posterior divulsão da musculatura. Feito isso, realizou-se o procedimento de acordo com o grupo experimental.

Após a cirurgia os animais foram mantidos sob observação para controle da dor. A conduta analgésica pós-cirúrgica foi realizada com acetaminofenol (paracetamol) 2 mg/mL de água, na água do bebedouro.

Todas as cirurgias foram realizadas com o auxílio do microscópico cirúrgico DF Vasconcelos. A neurrorafia foi feita com o fio monofilamentar de nylon 10-0 com agulha cilíndrica e circular, sem retirada de janela de epineuro e com dois pontos simples. A incisão foi suturada por planos com pontos simples após o procedimento no qual se utilizou fio monofilamentar de nylon 4-0 na musculatura e pele. Os animais, até o momento do sacrifício, ficaram mantidos em caixas apropriadas e temperatura controlada $-25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ – com 4 animais cada, ciclo claro-escuro de 12 horas, com ração e água *ad libitum*.

3.4 ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA

Empregou-se para as estimulações elétricas o aparelho Neurodyn® 4 Canais da empresa Ibramed, com início da aplicação 05 dias após a cirurgia.

Foram realizadas um total de 36 sessões com os grupos eletro estimulados EA90 e ER90 divididas em três sessões semanais durante 90 dias.

Os parâmetros utilizados na aplicação das correntes estão apresentados na Figura 1.

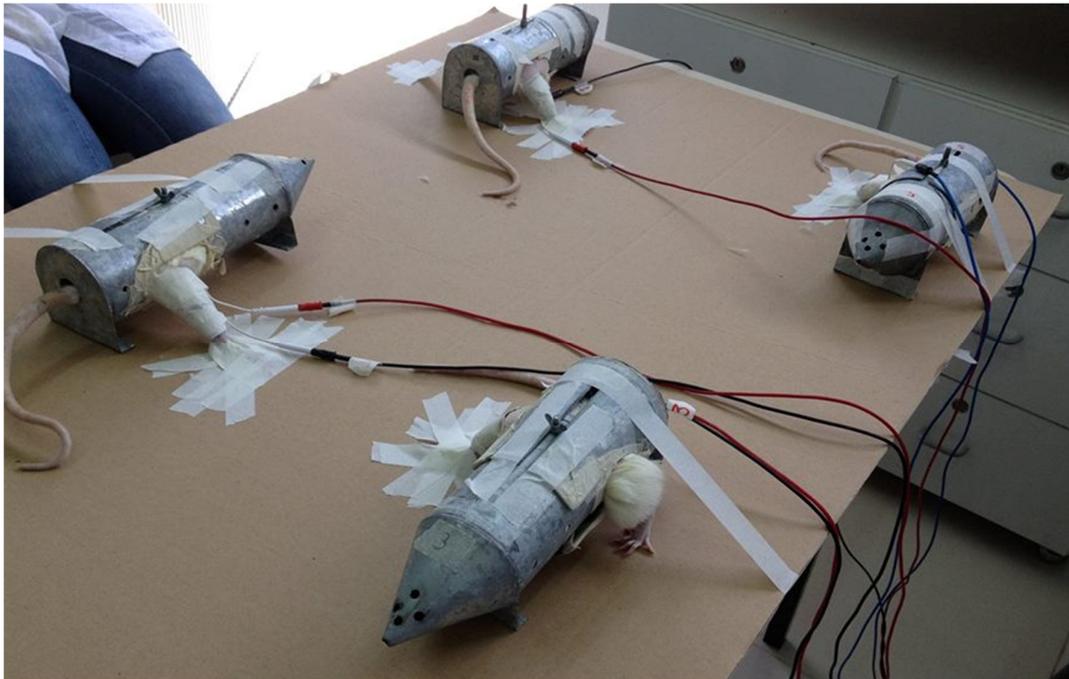
Figura 1: Parâmetros para eletroestimulação

Corrente	Aussie	Russa
Frequência Carrier	1000 kHz	2500 kHz
Burst (Modulação)	30 e 100 Hz (2 ms)	30 e 100 Hz (4 ms)
Contração (on)	10"	9"
Relaxamento (off)	20"	18"
Tempo de aplicação (por modulação)	10'	10'

Fonte: elaborada pela autora

A estimulação foi feita sem anestesia e com os animais acordados. Para a realização do procedimento foi desenvolvida uma cápsula metálica com abertura posterior para a cauda e duas aberturas laterais para fixação dos membros posteriores (Figura 2). Com o término da imobilização, os eletrodos de um centímetro quadrado de área foram anexados sobre o ventre dos respectivos músculos com eletrodos autoadesivos.

Figura 2: Cápsula metálica utilizada para imobilização dos animais durante protocolo das correntes



Fonte: elaborada pela autora

3.5 TESTE DE MARCHA

Os animais foram submetidos a avaliação funcional antes da eutanásia. Tal avaliação foi feita através de CatWalk, composta por uma plataforma de acrílico onde os animais caminhavam com sob a mesma e uma câmera captou todas as pegadas durante dois percursos. De acordo com a equação de BAIN, MACKINNON e HUNTER (1989), pode-se medir a distância entre as pegadas dos membros inferiores com base nos estudos de DE MEDINACELI, FREED e WYATT (1982). Fizeram-se as mensurações com calibração e objetivas corretas somente com as pegadas sem falhas, as outras foram descartadas. Utilizou-se para mensuração das fibras, o programa SigmaScan Pro 5 e os dados obtidos foram submetidos ao tratamento estatístico obedecendo ao índice de $p < 0,05$ para todas as amostras.

3.6 TESTE ELETROFISIOLÓGICO

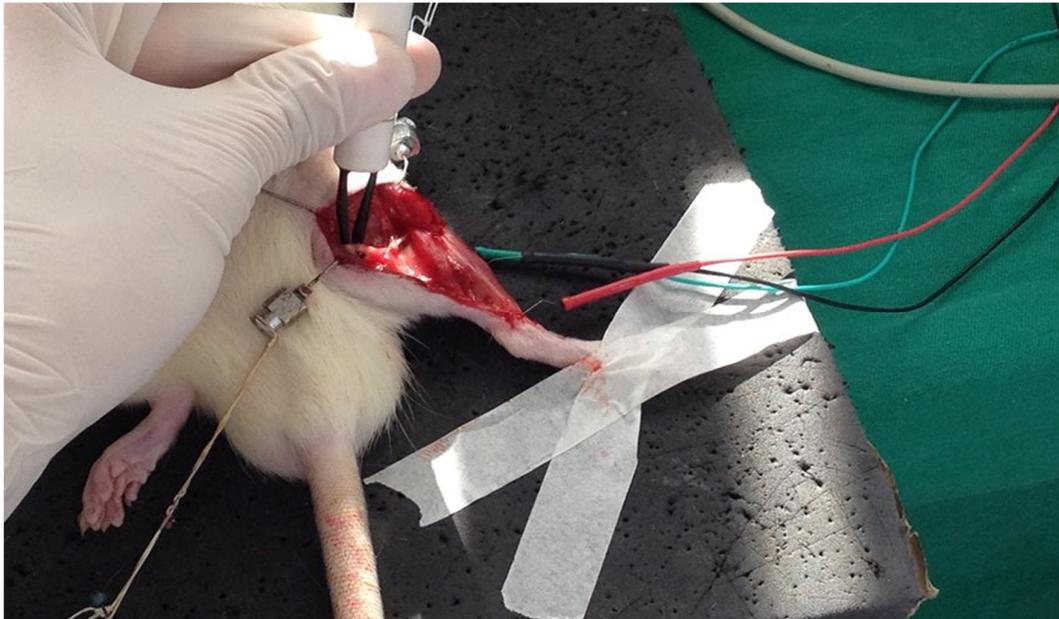
Os animais foram mantidos em um ambiente com temperatura entre 25°C. Após a imobilização em decúbito ventral realizou-se anestesia com

ketamina (80mg/kg) e xilasina (10mg/kg) intramuscular, tricotomia (retirada dos pelos da região que sofreu a cirurgia), em seguida a incisão com bisturi para exposição do nervo isquiático e sua trifurcação. O potencial de ação composto foi registrado por eletrodos de agulha ativo e de referência.

Para o teste eletrofisiológico foi utilizado o eletromiógrafo da marca Sapphire II 4ME, onde o eletrodo vermelho (referência) foi colocado no tendão do músculo tibial cranial do rato; o eletrodo preto (ativo), no ventre do músculo tibial cranial do rato, e o eletrodo verde (dispersivo), introduzido em local distante da região estudada (vide Figura 3).

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

Figura 3: Demonstração do teste eletrofisiológico



Fonte: elaborada pela autora

3.7 COLETA DAS PEÇAS HISTOLÓGICAS DOS MÚSCULOS E SACRIFÍCIO

Depois da retirada dos músculos, os animais receberam intraperitonealmente uma dose letal de pentobarbital sódico. Os músculos foram pesados, mensurados e colocados em soro fisiológico. Até que os mesmos fossem processados, as peças foram mergulhadas e armazenadas em nitrogênio líquido (-196°C).

3.8 PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO DOS MÚSCULOS: TIBIAL CRANIAL

Após armazenamento em nitrogênio líquido, os músculos foram fixados em placas de parafina e submetidos a secções transversais de 10 µm em criostato *Leica* CM1850. As secções foram feitas na região central do músculo e fez-se de 4 a 6 cortes para que, no momento da mensuração das fibras, as lâminas possam ser escolhidas. A coloração das lâminas foi feita com (HE) o corante Hematoxilina-Eosina, muito utilizado na área de histopatologia, permitindo observação das estruturas teciduais.

3.9 DIGITALIZAÇÃO DAS IMAGENS DOS MÚSCULOS

Com as lâminas já prontas, as mesmas foram fotografadas por uma *scanner* de Imagens *Scan Scope (Aperio)* e salvas em notebook DELL, 8 GB DDR, HD 1 TB. Foi utilizado um aumento de 100x para confecção das imagens e posterior análise das fibras. Analisou-se 5 imagens de um corte mas em campos diferentes.

3.10 MEDIDAS DAS FIBRAS MUSCULARES

A análise das imagens foi feita através do software *SigmaScan Pro 5* e aferiu-se 200 fibras do músculo tibial de cada animal, utilizou-se os parâmetros de medida de área, perímetro e diâmetro mínimo.

3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a comparação dos resultados dos grupos, utilizou-se o teste de análise de variância (ANOVA) e quando houve grande diferença entre os

grupos foi utilizado o teste de TUKEY. Para os resultados que apresentaram alta discrepância utilizou-se análise de variância em ranques de Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn, quando detectada diferença. Em relação aos músculos dos animais dos grupos controle e dos grupos experimentais utilizou-se o Test t pareado. Em todas as análises, foi utilizado o nível de significância $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 OBSERVAÇÕES EXTERNAS

Na maioria das vezes, os animais submetidos a procedimentos cirúrgicos no nervo isquiático sofrem autofagia, mas no caso desse experimento não se observou esse fato. Como na neurrrafia término-lateral, a lesão foi provocada somente no nervo tibial-cranial, os animais tiveram suas articulações em estado normal.

4.2 ANÁLISE DE MARCHA

No caso da análise funcional, houve diferença significativa entre os grupos GCF 90 e GCI, e para os grupos EA90 e ER90 não houve diferença. Já o grupo GD90 apresentou o pior resultado comparando-se aos outros grupos (Tabela 1 e Figura 4). Sendo considerado o valor de -100, para animais com nervo isquiático seccionado e valores próximos à zero em animais com função normal.

Tabela 1:Índice funcional do ciático dos animais em um período de 6 semanas pós-cirúrgico*

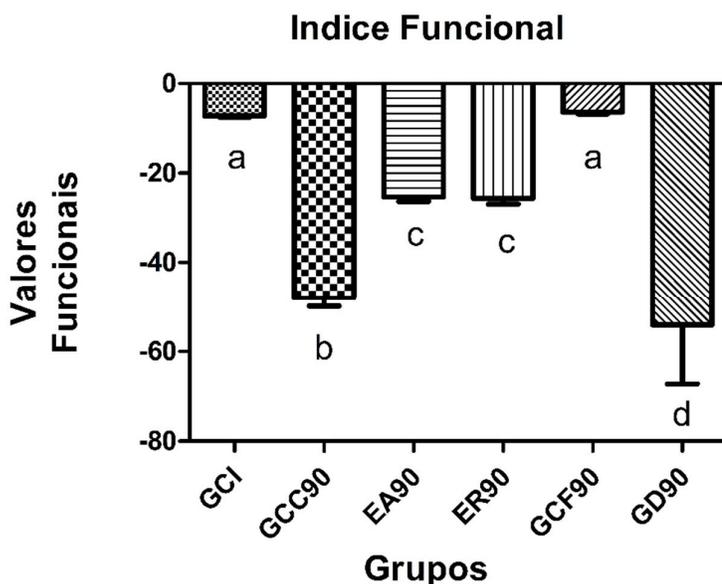
ÍNDICE FUNCIONAL DO NERVO TIBIAL (PFI)		
Grupos	Média**	Desvio Padrão
GCI	-9,95 ^a	3,29
GCC90	-25,84 ^b	3,71
EA90	-22,35 ^c	1,98
ER90	-22,12 ^c	3,20
GD90	-7,50 ^a	1,77
GCF90	-54,05 ^d	41,78

*Análise estatística: ANOVA seguida de teste de Tukey, $p \leq 0,05$.

** Médias seguidas por letras minúsculas iguais não diferem entre si.

Fonte: elaborada pela autora

Figura 4: Separação dos grupos de estudo para avaliação de Índice Funcional do nervo fibular



Fonte: elaborada pela autora

4.3 ELETRONEUROMIOGRAFIA

Para análise eletromiográfica, utilizou-se os parâmetros de latência e de amplitude. No caso do parâmetro latência, o GCF90 obteve resultados diferentes de todos os grupos, já no caso da amplitude o grupo GCC90 obteve menor índice, sendo que os grupos controle tiveram resultados diferentes dos grupos experimentais (vide Tabela 2 e Figura 5).

O GD90 passou por processo de desnervação total e não apresentou resultados eletrofisiológicos, o GCI e GCF90 apresentaram resultados sem diferença estatística o mesmo ocorrendo entre os grupos EA90 e ER90 (vide Tabela 2 e Figura 4).

Tabela 2: Análise eletrofisiológica com dados da amplitude e latência*

Grupos	Amplitude		Latência	
	Média**	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão
GCI	20,17 ^a	20,17	1,69 ^a	0,03
GCC 90	6,68 ^b	6,68	2,11 ^b	0,05

EA 90	9,70 ^c	9,70	1,95 ^c	0,26
ER 90	9,04 ^c	9,04	2,11 ^c	0,16
GD 90	0,00 ^d	0,00	1000,00 ^d	0,00
GCF 90	20,53 ^a	20,53	1,67 ^a	0,04

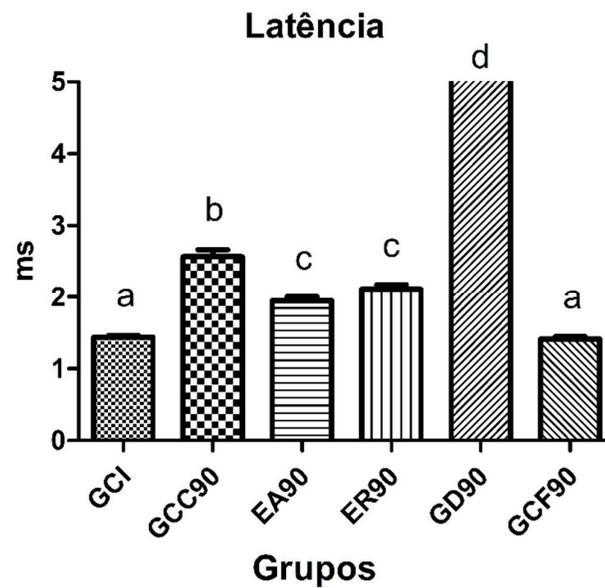
*Análise estatística: ANOVA seguida de teste de Tukey, $p \leq 0,05$.

*Análise estatística: ANOVA seguida de teste de Tukey, $p \leq 0,05$.

** Médias seguidas por letras minúsculas iguais não diferem entre si.

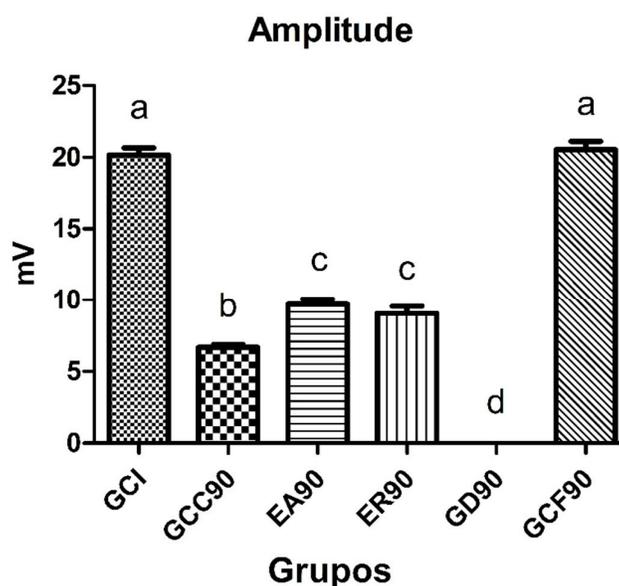
Fonte: elaborada pela autora

Figura 5: Resultado da latência do teste eletrofisiológico



Fonte: elaborada pela autora

Figura 6: Resultado da amplitude do teste eletrofisiológico



4.4 ANÁLISE MORFOMÉTRICA DO MÚSCULO TIBIAL CRANIAL

Na morfometria das fibras do músculo tibial cranial foi observado que os grupo EA90 e ER90 não apresentaram diferenças estatísticas nas variáveis área e diâmetro menor, atingindo os valores de $1768,30 \mu\text{m}^2 \pm 157,32 / 49,25 \mu\text{m} \pm 3,09$ e $1638,07 \mu\text{m}^2 \pm 173,71 / 49,55 \mu\text{m} \pm 3,45$ respectivamente. Os valores apresentados foram semelhantes ao GCI ($1791,13 \mu\text{m}^2 \pm 136,61 / 48,63 \mu\text{m} \pm 3,38$), melhores que o GD90 ($679,13 \mu\text{m}^2 \pm 84,93 \mu\text{m} / 13,75 \mu\text{m} \pm 1,91 \mu\text{m}$) e GCC90 ($1305,75 \mu\text{m}^2 \pm 151,42 \mu\text{m} / 34,00 \mu\text{m} \pm 2,93 \mu\text{m}$) e inferiores ao GCF90 ($3527,50 \mu\text{m}^2 \pm 122,94 \mu\text{m} / 67,00 \mu\text{m} \pm 2,27 \mu\text{m}$). Os dados podem ser visualizados nas tabelas 3 e 4 e nas figuras 7 e 8.

Tabela 3: Médias (μm^2) e Desvio Padrão das Áreas das Fibras do Músculo Tibial. Letras diferentes apresentam diferença estatística ($p \leq 0,05$).

Áreas das Fibras do Músculo Tibial						
	GCI	GCC90	EA90	ER90	GCF90	GD90
Média	1791,13 ^a	1305,75 ^b	1768,30 ^a	1638,07 ^a	3527,50 ^c	679,13 ^d
DP	136,61	151,42	157,32	173,71	122,94	84,93

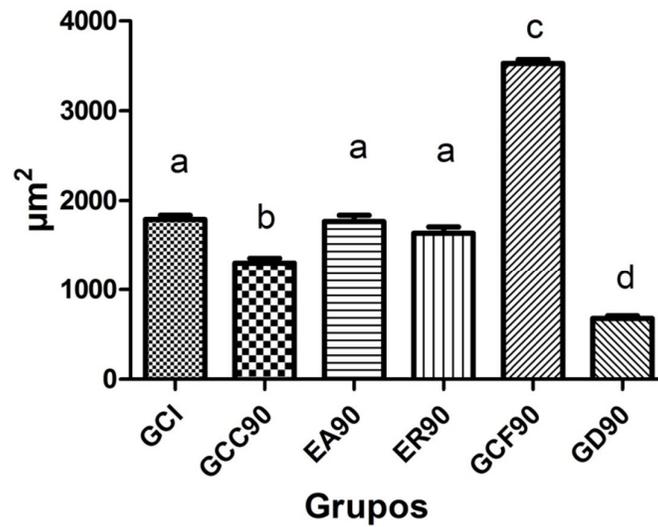
Fonte: elaborada pela autora

Tabela 4: Médias (μm) e Desvio Padrão dos Diâmetros das Fibras do Músculo Tibial. Letras diferentes apresentam diferença estatística ($p \leq 0,05$).

Diâmetros Menores das Fibras do Músculo Tibial						
	GCI	GCC90	EA90	ER90	GCF90	GD90
Média	48,63 ^a	34,00 ^b	49,25 ^a	49,55 ^a	67,00 ^c	13,75 ^d
DP	3,38	2,93	3,09	3,45	2,27	1,91

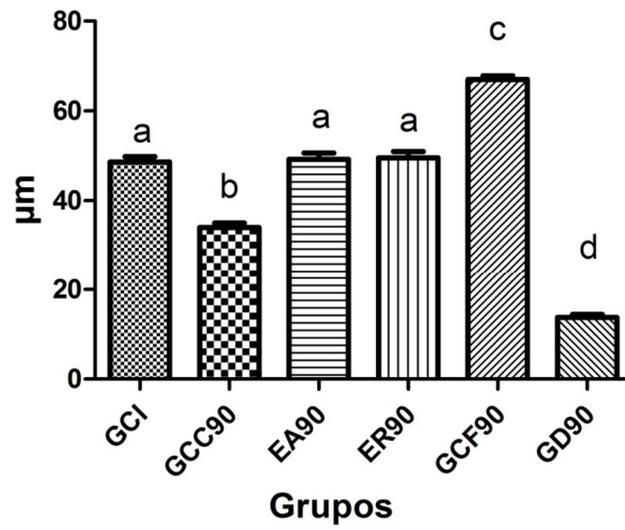
Fonte: elaborada pela autora

Figura 7: Gráfico das médias das áreas das fibras do músculo tibial nos grupos estudados. Letras minúsculas iguais não diferem entre si, $p \leq 0,05$



Fonte: elaborada pela autora

Figura 8: Gráfico das médias dos diâmetros menores das fibras do músculo tibial nos grupos estudados. Letras minúsculas iguais não diferem entre si, $p \leq 0,05$.



Fonte: elaborada pela autora

5 DISCUSSÃO

5.1 MODELO ANIMAL

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

Foram escolhidos animais do gênero masculino por apresentarem menor variação hormonal que as fêmeas, uma vez que outros estudos já comprovaram que tal variação pode influenciar na regeneração nervosa através de efeitos neurotróficos. (CARANDENTE *et al.*, 1989). Segundo Kane *et al.* 2002 os cientistas tem optado por animais do sexo masculino para impedir tal variação. Além do sexo masculino, é indicado também o uso de animais jovens, pois aqueles com idade mais avançada apresentam retardo do reparo nervoso periférico. (KANG; LICHTMAN, 2013).

5.2 AUTOFAGIA

Segundo Dias (2001) e Rosa-Junior (2010), os animais de suas pesquisas que apresentaram autofagia foram submetidos a secção do nervo isquiático. O mesmo é responsável pela inervação total da pata e possui outras estruturas que são diretamente ligadas a ele, como o nervo sural responsável pela inervação sensitiva dorso-lateral e conseqüente autofagia. Já nesse estudo, nenhum animal foi detectado com autofagia devido ao fato que o nervo lesionado era o nervo tibial cranial.

5.3 ANESTÉSICO E VIA DE ADMINISTRAÇÃO

É necessário que nesses casos de cirurgia em animais sejam utilizados anestésicos que atuem tanto como sedativo e também como relaxante muscular, que é responsável pela vasoconstrição, fazendo com que a cirurgia não cause intensos sangramentos no animal. Um sangramento intenso pode

causar risco de morte em animais de pequeno porte. Portanto, esse estudo utilizou o Cloridrato de Xilazina e de Ketamina, que cumpre com essas restrições.

5.4 AVALIAÇÃO FUNCIONAL DA MARCHA

A avaliação funcional ainda é muito questionada perante pesquisadores, alguns acreditam que a mesma não avalia corretamente os resultados encontrados nas pesquisas, já outros afirmam que a avaliação funcional é insubstituível e necessária para que se observe a função normal do músculo ou nervo analisado, alvo da maioria das pesquisas. A avaliação da marcha foi desenvolvida por De Medinacelli, et al., (1984) que utilizavam um método quantitativo para avaliação do Índice Funcional do Isquiático. Em seguida, Bain *et al.* (1989) aperfeiçaram o método de De Medinacelli e desenvolveram específicas avaliações para o nervo fibular e nervo tibial. Os pesquisadores também fizeram com que a distância entre as pegadas não fosse levada em consideração devido à sua velocidade.

Neste estudo utilizou-se o Índice Funcional do Tibial para posterior identificação. Para a captura das pegadas do animal utilizou-se um método semelhante ao de Varejão et al. (2003), que possui uma câmera acoplada sob uma plataforma de vidro transparente para que os animais caminhem sobre ela e uma canaleta que os guia pelo percurso. Esse método substituiu o de De Medinacelli, que utilizava filmes radiográficos ou a pintura da pata dos animais, pois o mesmo apresentava variações que causavam interferências no resultado.

De acordo com o resultado funcional deste estudo pode-se observar uma melhora significativa nos grupos EA90 e ER920, tendo semelhança com o estudo de Maciel *et al.* (2013), que também apresentou melhora funcional nos grupos que foram submetidos a cirurgia término-lateral e tratamento com estimulação elétrica modelo de Corrente Russa. No caso da Corrente Aussie, este estudo ainda não apresentou resultados significantes.

Neste estudo a eletroestimulação foi avaliada como tratamento e complemento da neurrrafia término-lateral e apresentou resultados

promissores na melhora funcional que podem ser observados pela diferença entre os grupos ER90, que foi submetido ao protocolo de corrente Russa, e GCC90, que foi submetido somente a neurografia término-lateral.

5.5 ELETRONEUROMIOGRAFIA

Os parâmetros utilizados para análise eletrofisiológica são a latência e a amplitude. A latência revela fibras mielínicas e tem a capacidade de capturar o tempo do impulso desde a sua origem até a captação pela musculatura, a amplitude avalia o quando o impulso se deslocou e as fibras musculares que se submeteram a estimulação elétrica enviada (ROBINSON; SNYDER-MACKLER, 2010).

Neste estudo, no caso da análise eletrofisiológica, os grupos que sofreram estimulação elétrica das correntes Aussie e Russa, ER90 e EA90, apresentaram um valor acima do grupo que não foi estimulado eletricamente, GCC90. Esse resultado demonstrou discrepância com o resultado da análise de marcha, mas isso pode estar relacionado ao fator do tempo destinado a eletroestimulação no pós-operatório, pois *Maciel et al.* (2013), em um de seus estudos demonstrou resultados positivos utilizando um protocolo de eletroestimulação pós-cirurgia término-lateral de 180 dias. Neste estudo, utilizou-se um protocolo de 90 dias, um tempo menor que o utilizado por Maciel, se fosse utilizados um protocolo com maior número de dias poderíamos obter melhores resultados.

5.6 ANÁLISE DO MÚSCULO TIBIAL CRANIAL

Foi utilizada a coloração com HE pois esta técnica evidencia bem a fibra muscular, o que é importante para a realização da morfometria. A utilização da medida do diâmetro mínimo é utilizada pois essa medida não sofre alterações durante o preparo histoquímico (*Romão et al.* 2007).

Os resultados obtidos na morfometria, referentes aos parâmetros de área e diâmetro mínimo do corte transversal do músculo, indicam que não existe diferença significativa entre os grupos GCI, EA90 e ER90, mas estes

diferem significativamente dos demais grupos e estes entre si. Notam-se valores superiores ao grupo desnervado, GD90, para todos os grupos analisados.

Quando observados os valores da área e diâmetro mínimo da fibra muscular, nota-se que o grupo GCF90, grupo controle final que não sofreu nenhuma intervenção, apresenta um resultado superior aos demais grupos.

É observado neste trabalho que tanto os resultados das médias dos valores da área e do diâmetro mínimo das fibras do MTC dos grupos EA90 e ER90, estroestimulados, sempre foram maiores que do grupo GCC90. Isto demonstra que o efeito da EE foi positivo para o MTC após a neurorafia término- lateral, pois existe uma relação direta entre a secção transversal da fibra muscular com a força que um músculo pode produzir (Neto, 2008).

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A eletroestimulação vem sendo muito estudada pelo mesmo motivo da neurografia, também se estuda suas correntes Aussie e Russa e seus protocolos, os mesmos podem ser aperfeiçoados a cada pesquisa, fazendo com que tratamentos possam ser protocolados e dêem soluções a pacientes que necessitam de reabilitação.

Portanto nesse estudo apresentado, temos a associação das correntes Aussie e Russa com a Neurografia término-lateral apresentando resultados efetivos e esperançosos para que continuem a ser estudados.

7 CONCLUSÕES

Não foi observada diferença significativa entre os diferentes tipos de correntes utilizadas.

A estimulação elétrica com as correntes russa e aussie apresentaram resultados funcionais e morfométricos superiores ao grupo não eletroestimulado.

A utilização das correntes potencializa a recuperação de indivíduos com lesão nervosa periférica submetidos a neurraxia termino-lateral.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKGUL, T.; GULSOY, M.; GULCUR, H. O. **Effects of early and delayed laser application on nerve regeneration.**In: Lasers Med. Sci., v. 29, p.351-357, 2014.

BAIN, J.R.; MACKINNON, S.E.; HUNTER, D.A. **Functional evaluation of complete sciatic, peroneal, and posterior tibial nerve lesions in the rat.** In:Plast Reconst Surg. 1989; 83(1): 129-36.

BOWDEN R. E. M.; GUTMANN E. **Desnervation and re-innervation of human voluntary muscle.** Brain, 67, 273, 1944.

CARANDENTE, F. *et al.* **Rhythms in the ovulatory cycle. 2nd: LH, FSH, estradiol and progesterone.** Chronobiologia, v. 16, n. 4, p. 353-363, 1989.

CHEM, R.C. **Cirurgia sobre nervos periféricos.** Rev Amrigs. 1978; 22:20-37.

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

DE MEDINACELI L, F. W.; WYATT R.J. **An index of the functional condition of rat sciatic nerve based an measurements made from walking tracks.** Experimental Neurology. 1982; 77:634-43.

DELITTO A., ROSE J. **Comparative comfort of three waveforms used in electrically eliciting quadriceps femoris muscle contractions.** Phys Ther, 1986; 66:1704-7.

DELITTO A., SNYDER-MACKLER L. **Two theories of muscle strength augmentation using percutaneous electrical stimulation.** Phys Ther, 1990; 70:158-64.

DIAS, D.V. **Tecido adipose a enxerto com tubo de polietileno poroso usados na técnica de tubulização influenciaria na reinervação de músculos de contração lenta e rápida de ratos?.** 2011. 138 f. Dissertação (Mestrado de Ciências) Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, 2011.

GHAYEMI, N. *et al.* **Functional effect of local administration of glial derived neurotrophic factor combined with inside-out artery graft on sciatic nerve regeneration in rat.** Int. J. Surg., v. 12, n. 5, p. 457-463, 2014.

GORDON, T.; SULAIMAN, G. A. R.; LADAK, A. **Electrical stimulation for improving nerve regeneration: where do we stand?.**International Review of Neurobiology, v. 87, p. 433-444, 2009.

GUO, B.S.*et al.* **Electrical stimulation influences satellite cell proliferation**

and apoptosis in unloading-induced muscle atrophy in mice. PLoS One, v.7, n.1, 2012.

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

KANAYA, F.; TAJIMA, T. Effect of electrostimulation on denervated muscle. Clin Orthop Relat Res, (283):296-301, 1992.

KANG, H.; LICHTMAN, J. W. Motor axon regeneration and muscle reinnervation in young and aged animals. J. Neurosci., v. 33, n. 50, p. 19480- 19491, 2013.

KAVLAK, E. et al. Effects of pulsed electromagnetic field and swimming exercise on rats with experimental sciatic nerve injury. J. Phys. Ther. Sci., v. 26, n. 9, p. 1355-1361, 2014.

LIM, J.; HAN, T. R. Effect of electromyostimulation on apoptosis-related factors in denervation and reinnervation of rat skeletal muscles. Muscle Nerve, v. 42, p. 422-430, 2010.

MACIEL, F. O. et al. Effect of electrical stimulation of the cranial tibial muscle after end-to-side neurotomy of the peroneal nerve in rats. Acta Cirúrgica Brasileira, v. 28, p.39-47, 2013.

MOHAMMADI, R.; SAADATI, A. Influence of insulin-like growth factor I on nerve regeneration using allografts: a sciatic nerve model. Journal of Craniofacial Surgery, v. 25, n. 4, p. 1510-1514, 2014.

NEMETH, P.M. Electrical stimulation of denervated muscle prevents decreases in oxidative enzymes. Muscle Nerve, 5(2): 134-9, 1982.

NETO, A.G. Comparação entre estimulação elétrica funcional e contração voluntária máxima no treinamento de força muscular da preensão palmar. 2007. 132f. Dissertação (Mestrado em Educação Física). Faculdade de Educação Física, Universidade Católica de Brasília, 2008.

ROBINSON, A. J., SNYDER-MACKLER, L. Eletrofisiologia clínica. 3 ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

ROMÃO, A.M., VITERBO, F., STIPP, E., GARBINO J.A., RODRIGUES, J.A. Eletroestimulação do músculo tibial cranial após esmagamento do nervo fibular comum: estudo neurofisiológico e morfométrico no rato. Rev Bras Ortop.; v. 42, n. 3, p. 41-46, 2007

ROSA-JUNIOR, GM. Enxerto venoso preenchido com gordura no reparo de nervo periférico: Uma nova proposta. 2009. 115f. Dissertação (Mestrado

em Ciências). Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, 2010.

ROVAK, J.M.; CEDERNA, P.S.; KUZON, W.M. **Terminolateral neurorrhaphy: a review of the literature.** J Reconstr Microsurg. 2001; 17(8): 615-24.

TAGAMI, Y. et al. **Axonal Regeneration Induced by Repetitive Electrical Stimulation of Crushed Optic Nerve in Adult Rats.** Jpn J Ophthalmol., v. 53, p. 257-266, 2009.

SATO, K. M. **Comparação de neurorrafias término-terminais e término-laterais na reconstrução do nervo mediano: pesquisa experimental em ratos Wistar adultos.** Ano. Nº folhas. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Medicina) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005

VAREJÃO, A. S. P.; CABRITA, A. M.; GEUNA, S.; PINTO, P.M.; FILIPI, V. M.; GRAMSBERGEN, A.; MEEK, M. F. **Toe out angle: a functional index for the evaluation of sciatic nerve recovery in the rat model.** Explore Neurology. Vila Rosa, v. 183, p. 695-99, Outubro.2003.

VITERBO, F. **Neurorrafia TÉRMINO-LATERAL, estudo experimental no rato.** [Tese de Doutorado]. Botucatu: Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina, 1992.

VITERBO, F.; TRINDADE, J.C.; HOSHINO, K.; MAZZONI, NETO A. **End-to-side neurorraphy with removal of the epineurial sheath: an experimental study in rats.** Plastic and Reconstructive Surgery. 1994a; 94: 1038-47.

WARD, A.R.; LUCAS-TOUMBOUROU, S.; (2007). **Lowering of sensory, motor and pain-tolerance thresholds with burst duration using kHz frequency alternating current electrical stimulation.** Archives of Physical Medicine and Rehabilitation, 88(8). 1036-1041.

WILLIAMS, H.B. **The value of continuous electrical muscle stimulation using a completely implantable system in the preservation of muscle function following motor nerve injury and repair: an experimental study.** Microsurgery, 17(11): 589-96, 1996.

YU, Q. et al. **Functional motor nerve regeneration without motor-sensory specificity following end-to-side neurorrhaphy: an experimental study.** J Hand Surg, v. 36A, p. 2010-2016, 2011.

ZHANG, B. et al. **The effects of low frequency electrical stimulation on satellite cell activity in rat skeletal muscle during hindlimb suspension.** Cell Biology, v. 87, n. 11, p. 1-9, 2010.

9 ANEXOS

9.1 ANEXO 1 – ESTATÍSTICA M.TIBIAL CRANIAL - ÁREA

Table Analyzed	Áreas das Fibras do Músculo Sóleo				
One-way analysis of variance					
P value	< 0.0001				
P value summary	***				
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes				
Number of groups	6				
F	113,1				
R squared	0,9371				
Bartlett's test for equal variances					
Bartlett's statistic (corrected)	16,11				
P value	0,0065				
P value summary	**				
Do the variances differ signif. (P < 0.05)	Yes				
ANOVA Table	SS	df	MS		
Treatment (between columns)	24230000	5	4847000		
Residual (within columns)	1628000	38	42840		
Total	25860000	43			
Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	p< 0.05?	Sum	95% CI of diff
GCI vs GCC90	397,0	5,425	Yes	**	86.28 to 707.7
GCI vs EA90	-154,3	1,952	No	ns	-489.9 to 181.3
GCI vs ER90	-64,22	0,8125	No	ns	-399.8 to 271.4
GCI vs GCF90	-1486	20,30	Yes	***	-1796 to -1175
GCI vs GD90	823,1	11,25	Yes	***	512.4 to 1134
GCC90 vs EA90	-551,3	6,975	Yes	***	-886.9 to -215.7
GCC90 vs ER90	-461,2	5,835	Yes	**	-796.8 to -125.6
GCC90 vs GCF90	-1883	25,72	Yes	***	-2193 to -1572
GCC90 vs GD90	426,1	5,823	Yes	**	115.4 to 736.8
EA90 vs ER90	90,08	1,066	No	ns	-268.7 to 448.9
EA90 vs GCF90	-1331	16,84	Yes	***	-1667 to -995.6
EA90 vs GD90	977,4	12,37	Yes	***	641.8 to 1313
ER90 vs GCF90	-1421	17,98	Yes	***	-1757 to -1086
ER90 vs GD90	887,3	11,23	Yes	***	551.7 to 1223
GCF90 vs GD90	2309	31,55	Yes	***	1998 to 2619

9.2 ANEXO 2 – PROTOCOLO DE APROVAÇÃO DO CÔMITE DE ÉTICA



UNESP

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE BOTUCATU
FACULDADE DE MEDICINA





CEUA



Comissão de Ética no Uso de Animais
Criada através da Portaria DFM nº 611 de 13/12/2012

Certificado

CERTIFICAMOS que o (Protocolo CEUA 1042-2013) "Efeito da estimulação elétrica de média frequência na regeneração muscular após neurografia término-lateral do nervo fibular de ratos", a ser conduzido por Luis Henrique Simionato, orientado pelo Prof. Dr. Fausto Viterbo de Oliveira Neto, está de acordo com o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA, com a ressalva de que os "ratos" são provenientes de Biotério convencional, sem condições de atestar a Sanidade dos mesmos.



Prof. Adjunto Katashi Okoshi
Presidente da CEUA



Alberto Santos Capelluppi
Secretário da CEUA

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

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