

UNIVERSIDADE METODISTA DE PIRACICABA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOTERAPIA

**Eletroestimulação Diária e Alternada na Morfometria do Músculo Sóleo  
de Rato Desnervado**

**Rodrigo Santiago Barbosa Rocha**

**2006**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

Rodrigo Santiago Barbosa Rocha

# Eletroestimulação Diária e Alternada na Morfometria do Músculo Sóleo de Rato Desnervado

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia, da Universidade Metodista de Piracicaba, para obtenção do Título de Mestre em Fisioterapia. Área de concentração: Intervenção Fisioterapêutica. Linha de Pesquisa: Plasticidade do Sistema Neuromuscular.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Viviane Balisardo Minamoto.

PIRACICABA  
2006

### Ficha Catalográfica

Rocha, Rodrigo Santiago Barbosa

Eletroestimulação Diária e Alternada na Morfometria do Músculo Sóleo de Rato Desnervado. Piracicaba, 2006

65p.

Orientadora: Profa. Dra. Viviane Balisardo Minamoto.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia, Universidade Metodista de Piracicaba.

1. Desnervação. 2. Eletroestimulação. 3. Tecido conjuntivo. 4. Área de secção transversa I. Minamoto, Viviane Balisardo. II. Universidade Metodista de Piracicaba, Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia. III. Título.

## Dedicatória

Este trabalho é dedicado aos meus pais, Carlos Anselmo e Maria Benedita, e a minha irmã, Juliana, por proporcionarem a realização de um sonho e pelo apoio familiar e em meus estudos. Dedico também a minha namorada, Larissa, pelo apoio em todos os sentidos na realização desta dissertação. Amo todos vocês. Muito obrigado por tudo.

## **AGRADECIMENTOS**

À FAPESP (05/52720-0) e ao FAP–UNIMEP (384/05) pelo apoio financeiro.

Ao Laboratório de Pesquisa em Plasticidade Muscular da Universidade Federal de São Carlos, em especial à Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Tânia Salvini, por permitir a realização de parte deste estudo. E aos alunos de doutorado João Durigan e Thiago Russo pela atenção e colaboração.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Viviane Balisardo Minamoto que apesar do tempo que esteve no pós-doutorado soube orientar com paciência e competência esta dissertação.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Rosana Teodori, muito obrigado por colaborar e pela dedicação a este trabalho.

Ao Prof Dr Rinaldo Guirro, muito obrigado pela colaboração neste trabalho.

Ao Prof. Dr Richard e à prof<sup>a</sup>. DR<sup>a</sup> Elaine pela participação na banca e nas sugestões.

Aos alunos de iniciação científica Renata Passos, Joice Betini e Vinícius Fornasari Pinto pela dedicação no auxílio da parte experimental do estudo.

Um agradecimento especial a Eliane Silva pela dedicação e amizade durante todo o estudo.

À todos da minha família pelo conforto, carinho e dedicação durante todos os momentos, em especial aos meus avós Ana, Paulo e Gercina.

Aos funcionários da secretaria de pós-graduação Dulce e Angelise e à secretária Miriam Castro pela dedicação e atenção.

## Epígrafe

"A princípio escrevia simplesmente  
Para entreter o espírito... Escrevia  
Mais por um impulso de idiosincrasia  
Do que por uma propulsão consciente.

Entendi, depois disso, que devia,  
Como Vulcano, sobre a forja ardente  
Da Ilha de Lemnos, trabalhar contente,  
Durante as vinte e quatro horas do dia!

Riam de mim, os monstros zombeteiros,  
Trabalharei assim dias inteiros,  
Sem ter uma alma só que me idolatre..."

Augusto dos Anjos

## RESUMO

A desnervação promove alterações estruturais no músculo, com conseqüente perda da função, sendo a eletroestimulação (EE) bastante utilizada como forma de tratamento. O objetivo deste estudo foi comparar a EE aplicada diariamente e em dias alternados sobre a área de secção transversa (AST) das fibras e densidade de área de tecido conjuntivo (TC) do músculo sóleo de rato previamente desnervados. Além disso, foi também estudado em qual período de desnervação (10, 20 e 30 dias) a EE é mais eficaz. Foram utilizados 55 ratos *Wistar* (200±50g) divididos em 11 grupos: Controle (C), Desnervado (D) e analisado após 10, 20 e 30 dias, Desnervado e submetido à eletroestimulação diariamente (EED) durante 10, 20 e 30 dias, Desnervado e submetido à eletroestimulação em dias alternados (EEA) durante 10, 20 e 30 dias, e Desnervado e analisado após 6 dias (D6), onde o nervo foi analisado para comprovar a eficácia do esmagamento. A desnervação foi realizada por esmagamento do nervo isquiático (4 pinçamentos de 20seg e intervalo de 1seg entre eles). A EE foi realizada no músculo sóleo 24 horas após a desnervação, por meio de eletrodos de superfície, com os seguintes parâmetros: corrente bifásica quadrática simétrica; T=3ms; f=10Hz; i=5mA; t=30min, durante 10, 20 ou 30 dias. Foram obtidos cortes histológicos do músculo sóleo sendo os mesmos corados com HE para análise da AST e densidade de área de TC nos programas Motic Images Advanced 3.2 e Image Pro-Plus 4.0, respectivamente. Testes Estatísticos: Shapiro-Wilk, seguido de ANOVA com Tukey ( $p \leq 0.05$ ). Os animais dos grupos D, EEA e EED analisados após 10 e 20 dias apresentaram valores menores de AST que o grupo C (10 dias:  $855 \pm 33.57 \mu\text{m}^2$ ;  $866 \pm 34.50 \mu\text{m}^2$ ;  $1034 \pm 34.06 \mu\text{m}^2$ ;  $1769 \pm 45.11 \mu\text{m}^2$ ; respectivamente; 20 dias  $948 \pm 73.02 \mu\text{m}^2$ ;  $1224 \pm 44.15 \mu\text{m}^2$ ;  $1441 \pm 80.77 \mu\text{m}^2$ ;  $1769 \pm 45.11 \mu\text{m}^2$ ; respectivamente), sendo que em ambos períodos o grupo EED apresentou AST maior que os grupos D e EEA. Nos animais analisados após 30 dias, os grupos D, EEA e EED apresentaram valores de AST menores que o grupo C ( $1497 \pm 91.42 \mu\text{m}^2$ ;  $1567 \pm 52.26 \mu\text{m}^2$ ;  $1603 \pm 32.34 \mu\text{m}^2$ ;  $1769 \pm 45.11 \mu\text{m}^2$ ,  $p < 0.05$ ), não havendo diferença entre os grupos D e eletroestimulados. Em relação à densidade de área de TC, os grupos D, EEA e EED analisados após 10 e 20 dias apresentaram valores maiores que o grupo C (10 dias:  $26 \pm 2.04\%$ ;  $17 \pm 2.27\%$ ;  $15 \pm 1.25\%$ ;  $9 \pm 1.07\%$ ; 20 dias:  $28 \pm 3.40\%$ ;  $20 \pm 1.18\%$ ;  $20 \pm 3.35\%$ ;  $9 \pm 1.07\%$ ;  $p < 0.05$ ), respectivamente). Além disso, os grupos eletroestimulados apresentaram menores valores de TC do que o grupo D em ambos os períodos. No período de 30 dias, os valores dos grupos D e EEA foram maiores que os grupos EED e C ( $21 \pm 2.98\%$ ;  $19 \pm 1.69\%$ ;  $11 \pm 1.11\%$ ;  $9 \pm 1.07\%$ ;  $p < 0.05$ , respectivamente). A EE minimizou a proliferação do TC e atrofia decorrentes da desnervação, sendo os efeitos da mesma evidenciados principalmente em períodos onde a reinervação ainda não estava totalmente restabelecida. Os resultados sinalizam para maior frequência na utilização do recurso, já que a EED foi mais eficaz que a EEA.

**Palavras-chave:** desnervação, eletroestimulação, tecido conjuntivo, área de secção transversa.

## ABSTRACT

The denervation promotes structural alterations in the muscle, with consequent loss of the function, being the electrical stimulation (ES) commonly used as treatment form. The aim of this study was to compare the EE applied daily and in alternated days on the cross sectional area (CSA) and connective tissue (CT) density area of the soleus muscle rat previously denervated. Moreover, it was also studied in which period of denervation (10, 20 and 30 days) the EE is more efficient. Fifty *Wistar* rats ( $200\pm 50\text{g}$ ) were divided into 10 groups: Control (C); Denervated (D) and analyzed after 10, 20 and 30 days; Denervated and submitted to daily electrical stimulation (EED) during 10, 20 and 30 days; Denervated and submitted to alternated electrical stimulation (EEA) during 10, 20 and 30 days, and Denervated and analyzed after 6 days, where the nerve was analyzed to prove efficacy of nerve crushing. The denervation process was made by crushing the sciatic nerve (4 pinches of 20 seconds and interval of 1 second between them). ES was applied in the soleus muscle 24 hours after the denervation, through surface electrodes, with the following parameters: symmetrical biphasic quadratic impulse;  $T=3\text{ms}$ ;  $f=10\text{Hz}$ ;  $i=5\text{mA}$ ;  $t=30\text{min}$ , during 10, 20 or 30 days. Histological cross-sections of the soleus muscle were obtained and submitted to HE stain. The CSA and CT density area were analyzed using the software Motic Images 3.2 Advanced and Image Pro-Plus 4.0, respectively. Statistical tests: Shapiro-Wilk, followed by ANOVA with Tukey ( $p<0.05$ ). The animals of groups D, EEA and EED analyzed after 10 and 20 days showed smaller values of CSA than the group C (10 days:  $855\pm 33.57\mu\text{m}^2$ ;  $866\pm 34.50\mu\text{m}^2$ ;  $1034\pm 34.06\mu\text{m}^2$ ;  $1769\pm 45.11\mu\text{m}^2$ ; respectively; 20 days  $948\pm 73.02\mu\text{m}^2$ ;  $1224\pm 44.15\mu\text{m}^2$ ;  $1441\pm 80.77\mu\text{m}^2$ ;  $1769\pm 45.11\mu\text{m}^2$ ;  $p< 0.05$  respectively), and in both periods, the EED group presented bigger CSA values than groups D and EEA. In the animals analyzed after 30 days, groups D, EEA and EED showed smaller values than group C ( $1497\pm 91.42\mu\text{m}^2$ ;  $1567\pm 52.26\mu\text{m}^2$ ;  $1603\pm 32.34\mu\text{m}^2$ ;  $1769\pm 45.11\mu\text{m}^2$ ,  $p< 0.05$ ), and there was no difference between D and electrical stimulated groups. Related to the CT density area, groups D, EEA and EED analyzed after 10 and 20 days presented higher values than the group C (10 days:  $26\pm 2.04\%$ ;  $17\pm 2.27\%$ ;  $15\pm 1.25\%$ ;  $9\pm 1.07\%$ ; 20 days:  $28\pm 3.40\%$ ;  $20\pm 1.18\%$ ;  $20\pm 3.35\%$ ;  $9\pm 1.07\%$ ;  $p< 0.05$ , respectively). Moreover, the electrical stimulated groups presented smaller values of CT density than group D, in both periods. In the period of 30 days, the values of D and EEA groups were higher than groups EED and C ( $21\pm 2.98\%$ ;  $19\pm 1.69\%$ ;  $11\pm 1.11\%$ ;  $9\pm 1.07\%$ ;  $p< 0.05$ , respectively). Electrical stimulation minimized the proliferation of the CT and muscle fiber atrophy on denervated muscles, and the effect of this treatment was mainly evidenced in period where the reinnervation has not been reestablished. The results suggest for a higher frequency in the use of this treatment, since the EED was more efficient than the EEA.

**Key-words:** denervation, electrical stimulation, connective tissue, cross sectional area.



## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	10
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	13
2.1 O Músculo Esquelético.....	13
2.2 Tipos de Lesão Nervosa Periférica.....	18
2.3 Resposta do Sistema Muscular após desnervação.....	20
2.4 Eletroestimulação do Músculo Desnervado.....	23
3 OBJETIVO.....	27
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	28
4.1 Animais.....	28
4.2 Grupos Experimentais.....	28
4.3 Protocolo de esmagamento do nervo isquiático.....	29
4.4 Protocolo de Eletroestimulação.....	31
4.5 Procedimento de coleta do nervo isquiático.....	32
4.6 Procedimento de coleta do músculo sóleo.....	33
4.7 Análise da Densidade de Área do Tecido Conjuntivo.....	33
4.8 Mensuração da Área da Fibra Muscular.....	34
4.9 Análise Estatística.....	35
5 RESULTADOS.....	36
5.1 Esmagamento do nervo isquiático.....	36
5.2 Área de Secção Transversa das Fibras Musculares.....	37
5.3 Densidade de Área do Tecido Conjuntivo.....	40
6 DISCUSSÃO.....	46
7 CONCLUSÃO.....	55
REFERÊNCIAS.....	56
ANEXOS.....	64

## 1 INTRODUÇÃO

O sistema muscular é plástico, tem a capacidade de adaptar-se à situações de aumento ou diminuição da atividade. Alguns exemplos de estímulos que promovem aumento da atividade muscular são eletroestimulação crônica, alongamento crônico, hipertrofia compensatória e treinamento de *endurance* (Pette e Staron, 2001; Lieber, 2002). Por outro lado, pode-se citar a ausência de gravidade, tenotomia, transecção da medula espinhal, imobilização articular e desnervação como algumas condições que promovem diminuição da atividade muscular (Michel e Gardiner, 1989; Ohira et al., 2002; Lieber, 2002).

A desnervação de músculos esqueléticos promove efeitos deletérios neste sistema, fato que pode ser observado pela diminuição do trofismo, aumento do tecido gorduroso e do tecido conjuntivo no músculo acometido (Kern et al., 2002). Em humanos, a diminuição da atividade neuromuscular, decorrente da desnervação, pode desencadear complicações secundárias, como úlceras por pressão, osteoporose e disfunções neurovegetativas (Kern et al., 2002; Modlin et al., 2005).

A recuperação da função muscular pós-desnervação depende não somente da regeneração nervosa, mas também das condições do músculo no momento da reinervação, tais como trofismo muscular, tamanho da área de fibrose e capacidade miogênica das células satélites (Bain et al., 2001; Aydin, 2004; Dow et al., 2004).

As lesões de nervos periféricos são comuns, ocorrendo com maior frequência devido à acidentes automobilísticos e de esporte, seguidos de traumas

penetrantes e lesões ao nascimento por tração excessiva (Welch, 1996; IJkema-Paassen et al., 2004).

Na clínica de fisioterapia, um dos métodos mais empregados no tratamento após desnervação é a eletroestimulação fásica. Existem relatos de que este tipo de tratamento pode manter a excitabilidade do músculo, massa muscular, força e área da fibra muscular (Hennig, 1987; Dow et al., 2004).

No entanto, algumas variáveis relacionadas à eletroestimulação devem ser consideradas quanto à utilização deste tipo de tratamento, entre elas o tempo de estimulação ou o número de contrações que o músculo sofre durante uma sessão de tratamento. Estudo prévio relata que o número de contrações parece ser determinante na manutenção das propriedades do músculo desnervado, relatando que um número pequeno de contrações diárias não é suficiente para minimizar a atrofia; por outro lado, um número de contrações diárias em excesso pode aumentar o dano ao tecido pelo excesso de energia aplicada durante a eletroestimulação (Dow et al., 2004).

Outro aspecto importante a ser considerado durante a aplicação da eletroestimulação é se os benefícios da mesma estão relacionados ao tempo de desnervação. Ou seja, a eletroestimulação é benéfica somente quando o músculo encontra-se desnervado? O uso da eletroestimulação quando o músculo já encontra-se em período de reinervação irá acelerar, retardar ou não ter nenhum efeito sobre as características musculares?

Cole e Gardiner (1984) mostram que após a reinervação muscular, os benefícios da eletroestimulação diminuem gradativamente até que na 9ª semana após a reinervação ela perde o efeito, e tanto músculos estimulados quanto não

estimulados não apresentam diferença no seu peso e na área de secção transversa das fibras musculares.

Devido à carência de estudos relacionados à eletroestimulação da forma como utilizada clinicamente, o presente estudo tem como objetivo comparar 2 protocolos de eletroestimulação fásica: aplicação diária e alternada. Além disso, os efeitos desses protocolos serão avaliados em diferentes períodos de desnervação (após 10, 20 e 30 dias). Os resultados fornecerão subsídios para eleição de melhor tratamento fisioterapêutico, no que diz respeito de qual protocolo (diário ou alternado) e em qual período de desnervação a eletroestimulação é mais benéfica para a prevenção de atrofia muscular e proliferação de densidade de área de tecido conjuntivo no músculo desnervado.

## **2 REVISÃO DA LITERATURA**

### **2.1 O Músculo Esquelético**

No embrião o músculo esquelético é derivado dos somitos, um segmento do mesoderma praxial, o qual também dá origem a outros tecidos como pele, osso, tendão, tecido vascular e sangue. Inicialmente os somitos são células epiteliais rodeadas por uma cavidade central de células mesenquimais, que iniciam a diferenciação em dermomiótomos por volta do 8º dia embrionário (Cossu, Talbakhsh e Buckingham, 1996; Buckingham et al., 2003).

As células musculares diferenciam-se das outras principalmente por um processo de alongamento gradativo, originando-se no embrião pela fusão de células alongadas derivadas dos dermomiótomos, chamadas de mioblastos. O resultado final da diferenciação muscular é a organização das células musculares, túbulos transversais e retículo sarcoplasmáticos no sistema músculo esquelético (Engel e Franzini-Armstrong, 1994; Cossu, Talbakhsh e Buckingham, 1996).

Após a formação das primeiras células musculares, axônios motores crescem em direção ao músculo e formam um nervo intramuscular principal, dando origem à placa motora terminal. A formação do terminal nervoso normalmente ocorre na região central do músculo, devido ao mecanismo de contração, especialmente em músculos maiores, ter melhor sincronismo em regiões próximas ao ventre muscular (Arber, Burden e Harris, 2002).

Por volta do 17º dia embrionário, quando a lâmina basal engloba um aglomerado de células miogênicas, já podem ser encontradas células

responsáveis pelo desenvolvimento muscular e reparo do tecido muscular, as células satélites (Engel e Franzini-Armstrong, 1994; Chimelli e Sverzut, 1999).

As células satélites são formadas por um único núcleo oval com heterocromatina, citoplasma com organelas usuais, células de superfície, vesículas do plasmalema, poucas mitocôndrias, com complexo de golgi e retículo endoplasmático não desenvolvidos (Allbrook, 1981).

Essas células são consideradas um reservatório de células progenitoras que estão mitoticamente em estado quiescente na lâmina basal do músculo saudável, proliferando durante a ontogenia e regeneração muscular (Chimelli e Sverzut, 1999). A proliferação e migração das células satélites podem ser influenciadas por células como os macrófagos, que através da produção de fatores de crescimento promovem a quimiotaxia, proliferação e diferenciação das células satélites (Allbrook, 1981; Morgan e Partridge, 2003). Outras células que podem atuar nesses processos são os leucócitos polimorfos, os quais podem ser vistos no local da lesão muscular 3 horas após a mesma (Chimelli e Sverzut, 1999).

Além de células, alguns fatores de crescimento podem influenciar a migração das células satélites, como o IGF-1 (Insulin Growth Factor-1), o qual também estimula a proliferação de fibroblastos. O aumento de fibroblastos pode ser prejudicial, visto que os mesmos se depositam no músculo mais rapidamente que as células satélites, o que pode resultar em formação de tecido cicatricial no músculo (Engel e Franzini-Armstrong, 1994).

Para atravessar a barreira da lâmina basal, as células satélites liberam enzimas como a tripsina e pronase, as quais dissolvem esta membrana, o que permite a chegada das células satélites ao centro da lesão, favorecendo a regeneração da fibra muscular lesada (Chimelli e Sverzut, 1999).

A resposta regenerativa do tecido muscular depende do tipo e intensidade da lesão, sendo que uma lesão focal, induzida pelo excesso de trabalho, envolve a degeneração e alteração das propriedades de poucas fibras. Por outro lado, a desnervação muscular altera as propriedades da maior parte das fibras musculares (Engel e Franzini-Armstrong, 1994; Morgan e Partridge, 2003).

Além da capacidade de regeneração, o músculo esquelético adapta-se à vários estímulos, sendo esta propriedade conhecida como plasticidade muscular. Esta adaptação pode ocorrer no padrão metabólico, fenotípico ou estrutural das fibras musculares, envolvendo alterações no conteúdo ou expressão das isoformas de proteínas musculares (Engel e Franzini-Armstrong, 1994).

As isoformas de proteínas são moléculas com pequena variação na composição de aminoácidos podendo alterar a forma, a função e as propriedades enzimáticas das proteínas.

O conteúdo das proteínas musculares é dado pelo balanço entre a síntese e degradação de proteínas, o qual pode ser influenciado pela contração muscular, fato que determina o ganho ou perda de massa muscular (Baldwin e Haddad, 2002).

As proteínas musculares possuem meia-vida em torno de 7 a 10 dias, entretanto a interrupção do estímulo contrátil leva a diminuição da síntese protéica

e ao aumento da degradação, fazendo com que a meia-vida das mesmas diminua para um período inferior a 7 dias, levando à diminuição da massa protéica muscular. O balanço protéico que determina a plasticidade da fibra muscular ocorre no sarcômero, a unidade funcional do músculo, o qual é formado por proteínas que localizam-se entre 2 linhas Z consecutivas (Baldwin e Haddad, 2002; Lieber, 2002).

Músculos lentos, como o sóleo, quando submetidos à desnervação apresentam degeneração da linha Z em estágios tardios. Por outro lado, em músculos rápidos, como o extensor longo dos dedos (EDL) a linha Z degenera-se em estágios precoces, diferença que se deve ao conteúdo protéico de miosina entre os tipos de fibras musculares. Entretanto, quando há desnervação de músculos mistos, como é o caso do gastrocnêmio, a linha Z do sarcômero apresenta-se mais íntegra em comparação a músculos rápidos e mais degenerada em relação a músculos lentos (Tomanek e Lund, 1973; Gauthier e Dunn, 1973).

A desnervação também promove alterações em estruturas que dão sustentação ao material protéico e aos sarcômeros, os envoltórios de tecido conjuntivo (Lieber, 2002).

O tecido conjuntivo pode ser encontrado em tendões, ligamentos, ossos, cartilagens e envoltórios musculares, constituindo cerca de 1 a 9% da massa muscular (Culav, Clark e Merrilees, 1999).

As propriedades do tecido conjuntivo são determinadas pela quantidade, tipo e organização de um conjunto de proteínas e carboidratos, a matriz extracelular. Esta é composta principalmente de água, glicosaminoglicanas, elastina, proteínas e fibras colágenas. O espaçamento entre as fibras colágenas



dá viscoelasticidade à matriz extracelular, aumentando a capacidade de resistir a cargas de tensão e facilitando o deslizamento tridimensional de uma fibra sobre a outra (Bendall, 1967 citado por Light e Champion, 1984; Culav, Clark e Merrilees, 1999; Mueller e Maluf, 2002; Kovanen, 2002).

Uma série de proteínas forma a matriz extracelular, sendo o colágeno a proteína mais abundante, correspondendo de 20–25% de todo conteúdo protéico. Atualmente são conhecidos 19 tipos de proteínas colágenas, predominando no tecido muscular os tipos I, III, IV e V, que estão presentes nas bainhas de sustentação do músculo (Takala e Virtanen, 2000).

O colágeno do tipo I forma fibras em paralelo e conferem força tênsil e rigidez; o colágeno do tipo III, encontrado inicialmente rodeando o tecido cicatricial e o músculo esquelético em regeneração, é mais frouxo que o anterior e dá conformidade e flexibilidade ao tecido. Já o colágeno do tipo V é encontrado em menor proporção, mas possui papel fundamental no controle da fibrilogênese colágena (Bailey e Sims, 1977 citado por Light e Champion, 1984; Letho, Duance e Restall, 1985; Kovanen, 2002; Mackey, Donnelly e Roper, 2005).

Os diferentes tipos de fibras musculares apresentam em sua conformação densidades distintas de colágeno. As fibras musculares do tipo I apresentam maior densidade de colágeno quando comparados ao tipo II, fato que determina as características mecânicas da fibra, já que as fibras do tipo I apresentam maior força tênsil (Letho, Duance e Restall, 1985).

O tecido conjuntivo do músculo esquelético é organizado em 3 bainhas que se interconectam, epimísio, perimísio e endomísio (Light e Champion, 1984).

O epimísio envolve todo o músculo, sendo que é formado predominantemente de colágeno tipo I. O perimísio envolve feixes ou fascículos musculares, sendo formado por colágeno dos tipos I e III. Finalmente, o endomísio forma a membrana plasmática da fibra muscular, alterando sua forma de acordo com o estímulo recebido, e retornando à forma original com a interrupção do mesmo. No endomísio estão presentes colágenos dos tipos I, III e V (Light e Champion, 1984; Engel e Franzini-Armstrong, 1994; Kovanen, 2002).

Quando há lesão do músculo esquelético uma série de processos resultam no reparo tecidual. A lesão muscular pode levar a inflamação, ativação das células satélites, miogênese, proliferação dos fibroblastos e reorganização do tecido conjuntivo e matriz extracelular (Stauber, Fritz, Dahlmann 1990).

Uma das formas de agressão ao músculo e conseqüente ativação da plasticidade do sistema muscular é através da lesão nervosa periférica.

## **2.2 Tipos de Lesão Nervosa Periférica**

O sistema nervoso periférico é formado de 12 pares de nervos cranianos e 36 pares de nervos espinhais (IJKema-Paassen et al., 2004).

Os nervos espinhais mais suscetíveis à lesões são os nervos mediano (32,3%), seguido do ulnar (24,1%), radial (12,1%), isquiático (10,7%) e fibular comum (7,7%). Raramente os nervos tibial e femoral são lesados (Welch, 1996; Robinson, 2000; Evans, 2001; Daneyemez et al., 2005).

A lesão nervosa periférica foi classificada primeiramente por Seddon (1943) citado por Burnett e Zager (2004) em 3 tipos: neuropraxia (tipo I), axoniotmese (tipo II) e neurotmese (tipo III).

Neuropraxia é a lesão nervosa periférica mais leve; não envolve perda da continuidade nervosa e causa perda funcional transitória. Neste tipo de lesão há compressão local leve, com bloqueio reversível da condução nervosa, sendo que o nervo não passa pelo processo de degeneração Walleriana (Welch, 1996; Robinson, 2000; Burnett e Zager, 2004).

A lesão do tipo axoniotmese ocorre quando há interrupção completa do axônio e mielina, no entanto estruturas mesenquimais, incluindo o epineuro e perineuro, estão preservadas. Como resultado desta agressão há perda da continuidade axonal no nível da lesão, com preservação do tubo endoneural mas com degeneração Walleriana distalmente à lesão (Robinson, 2000; Burnett e Zager, 2004; Lundy-Ekman, 2004).

A neurotmese é o grau de lesão nervosa periférica mais grave. Envolve desconexão nervosa, com perda funcional e prognóstico de recuperação funcional ruim. O tratamento deste tipo de lesão é cirúrgico, na tentativa de evitar-se a formação de cicatriz e direcionar o crescimento axonal através do guia mesenquimal (Lundborg, 1987; Burnett e Zager, 2004).

Sunderland (1978), citado por Burnett e Zager (2004), classificou a lesão nervosa do tipo neurotmese, anteriormente descrita por Seddon (1943), em 3 graus (III, IV e V), de acordo com o comprometimento do endoneuro, perineuro e epineuro, respectivamente.

Nesta classificação, a lesão de grau III ocorre quando há rompimento do axônio com lesão parcial do endoneuro, devido a perda dos tubos endoneurais, sendo este grau de lesão posicionado entre a axoniotmese e a neurotmese. Quando todas as porções do nervo são rompidas, exceto o epineuro, temos uma

lesão do tipo neurotmesa grau IV. Para este grau de lesão é necessário o reparo cirúrgico, com retirada do segmento lesado e reconstrução do nervo. Para as lesões de grau V, há rompimento nervoso completo, com prognóstico muito ruim de recuperação da função, devido à presença de hemorragia no perineuro e formação de cicatriz no local da lesão.

Dellon e Mackinnon (1989) descreveram outro grau de lesão nervosa periférica, tipo VI, onde há combinação entre os graus de lesão, sendo esta classificação mais observada na prática clínica.

A extensão e o grau de lesão, bem como a resposta celular à lesão nervosa, definem o prognóstico do reparo nervoso, e conseqüentemente, da recuperação da função motora (Evans, 2001).

Lesões nervosas do tipo axionotmesa promovem alterações no tecido muscular, como alteração dos tipos de fibras, atrofia das fibras musculares e aumento da densidade do tecido conjuntivo (Fernandes et al., 2005).

### **2.3 Resposta do Sistema Muscular Após Desnervação**

Parry e Wilkinson (1990), Schiaffino et al. (1999) e Bobinac et al. (2000) relatam que a inervação é fundamental para a manutenção das propriedades e plasticidade dos diferentes tipos de fibras musculares.

Sabe-se que a ausência do estímulo nervoso sobre os músculos lentos faz com que ocorra uma diminuição da isoforma lenta da cadeia pesada de miosina, transformando-os em músculos rápidos (Pette e Staron, 2001; Baldwin e Haddad, 2002).

Em estudo prévio com o músculo sóleo, músculo com predomínio de fibras lentas, foi observado que após 30 dias de desnervação, a porcentagem de fibras rápidas do tipo IIB aumentam de 4% para 9%, bem como as fibras do tipo IIX que aumentam de 13% para 23%. Por outro lado, as fibras do tipo IIA e do tipo I, diminuem de 42% para 32% e de 41% para 36%, respectivamente, comprovando que a inervação é responsável pela determinação das propriedades histoquímicas das fibras musculares (Pette e Staron, 2001).

Outra alteração encontrada no tecido muscular após a desnervação é a atrofia (Ijkema-Paassen et al., 2002; Fernandes et al., 2005), sendo que esta ocorre devido à diminuição ou ausência da síntese protéica e ao aumento da proteólise miofibrilar, acompanhadas pelo aumento de proteases lisossomais e de cálcio (Engel e Franzini-Armstrong, 1994).

O aumento do cálcio no interior das fibras musculares leva à destruição celular, desencadeando um fenômeno denominado Efeito Calpaína (Lieber, 2002). Este efeito parece ser mais severo em fibras lentas do que rápidas, onde ainda é encontrada maior atrofia, maior diminuição do diâmetro muscular e maior diminuição da força muscular após a desnervação (Michel e Gardiner, 1989; Keilhoff e Fansa, 2005).

A atrofia por desnervação pode ser classificada em 3 estágios, segundo Muscatello, Margareth e Aloisi (1965). No primeiro estágio (fase de retardo) o músculo perde menos de 5% de seu peso, sem qualquer alteração nos componentes miofibrilares, com pequeno aumento da banda I no sarcômero. Com a persistência da desnervação o peso muscular diminui de 5 a 25% , iniciando o segundo estágio de atrofia (fase precoce de atrofia), onde pode-se observar

redução das proteínas contráteis e aumento da concentração dos componentes estruturais do retículo sarcoplasmático. Finalmente, numa fase avançada de desnervação (atrofia degenerativa) há redução do peso muscular acima de 30%, associado à alterações no sarcoplasma. Neste estágio ainda pode-se observar diminuição no número de filamentos de actina e miosina, com aumento do espaço intracelular.

Além disso, a atrofia muscular, resultante da desnervação, diminui a habilidade da insulina em estimular a formação de glicogênio e altera a atividade intrínseca dos transportadores GLUT 4 no transporte e metabolismo da glicose (Silva, Guirro e Polacow, 1998).

A desnervação de músculos esqueléticos também promove o aumento da densidade do tecido conjuntivo (Fernandes et al., 2005).

A resposta do tecido conjuntivo à desnervação inclui a proliferação e síntese de componentes da matriz extra celular, sendo que durante o reparo celular ocorre aumento da síntese de colágeno tipo III e de alguns fibroblastos (Bazin e Delaunay, 1964 citado por Letho, Duance e Restall, 1985), principalmente no endomísio e perimísio (Gulati, 1988; Polacow et al., 2003).

Em nível estrutural, após a desnervação, ainda podem ser observadas alterações no retículo sarcoplasmático e no disco Z do sarcômero, que levam à contraturas de miofibrilas ocorridas principalmente pelo aumento do influxo de cálcio (Muscatello, Margareth e Aloisi, 1965).

A desnervação também afeta a capilarização dos músculos desnervados, diminuindo seu número em até 70% no músculo gastrocnêmio de ratos

desnervados, em comparação a músculos normais (Borisov, Huang e Carlson, 2000; Wagatsuma, Tamaki e Ogita, 2005).

Finalmente, são encontradas alterações nas células satélites de músculos desnervados, como diminuição do tamanho da célula, do núcleo, da densidade de cromatina e da atividade celular (Kujawa, Baran e Jankowska-Steifer, 2004; Kujawa, Baran e Jankowska-Steifer, 2005).

As alterações musculares decorrentes da desnervação são correlacionadas à diminuição da habilidade do músculo ser reinervado e ao tempo para a restauração da função motora (Aydin, 2004; Dow et al., 2004).

Na clínica de fisioterapia um dos recursos utilizados para a manutenção das propriedades de músculos desnervados é a eletroestimulação.

## **2.4 Eletroestimulação do Músculo Desnervado**

A eletroestimulação do músculo desnervado é amplamente utilizada em modelos experimentais com o objetivo de verificar a influência deste estímulo sobre os músculos desnervados (Pette e Vrbova, 1999).

Em modelos experimentais, a eletroestimulação pode ser utilizada de forma crônica e fásica.

A eletroestimulação crônica é realizada por períodos superiores a 8 horas por dia, sendo que em animais experimentais utiliza-se, normalmente, eletrodos e eletroestimuladores implantados, sendo este tipo de eletroestimulação incomum na prática clínica devido ao risco de infecções (Windisch et al., 1998; Dow et al., 2004).

A utilização da eletroestimulação muscular crônica tem se apresentado bastante controversa. Enquanto alguns resultados apontam ser a mesma prejudicial ao músculo, devido ao atraso da reinervação do mesmo (Hennig, 1987), há também evidências de que a mesma é benéfica (Eberstein e Pachter 1986; Dow et. al, 2004).

Uma hipótese para o atraso da reinervação muscular com a aplicação de eletroestimulação crônica é que a mesma possa interferir na produção de moléculas facilitadoras da reinervação, como a NCAM (Neural Cell Adhesion Molecule), o IGF a tenascina, HSPG (Heparan-Sulfate Proteoglican) e a glicoproteína glicotransferase. Como essas moléculas são estimuladas quando há diminuição ou ausência de estímulo elétrico e mecânico no músculo, o uso da eletroestimulação crônica pode diminuir a expressão dessas moléculas, diminuindo, portanto, a capacidade de reparo nervoso e conseqüente reinervação muscular (Engel e Franzini-Armstrong, 1994; Lieber, 2002).

Por outro lado, existem estudos que demonstram que a eletroestimulação crônica pode ser benéfica, devido à manutenção das propriedades contráteis e metabólicas do músculo desnervado, o que favorece o restabelecimento da função motora após a reinervação (Cole e Gardiner 1984; Eberstein e Pachter 1986; Dow et. al, 2004).

Para alguns autores, a estimulação de músculos desnervados não impede efetivamente a regeneração axonal. No entanto, os benefícios da eletroestimulação são observados apenas quando um padrão apropriado de estímulo for aplicado, ou seja, quando o padrão de estimulação for semelhante ao do motoneurônio normal (Nix e Hopf, 1983; Eberstein e Pachter, 1996).



Outro modo de eletroestimar músculos desnervados é por meio da aplicação de estimulação fásica, onde o período de estimulação não ultrapassa alguns minutos. Este tipo de estimulação é comumente utilizada na prática clínica para minimizar os efeitos deletérios da desnervação, no entanto somente alguns estudos a utilizam em modelos experimentais (Hämäläinen e Pette, 1996; Fernandes et al., 2005).

Estudos mostram que a eletroestimulação fásica tem reduzido a atrofia e a proliferação de tecido conjuntivo de músculos desnervados, e conseqüentemente possibilitado melhor recuperação funcional muscular após a reinervação (Kanaya e Tajima, 1992; Fernandes et al., 2005).

A efetividade da eletroestimulação depende dos parâmetros de freqüência, tempo de duração do pulso e amplitude (Eberstein e Pachter 1986).

A freqüência é o número de ciclos por segundo (Hertz), que afeta os potenciais de ação desencadeados durante a estimulação. Sabe-se que músculos lentos, como o sóleo, necessitam de freqüências mais baixas para contrair; quando uma freqüência alta é aplicada por um longo período a este músculo, o mesmo pode aumentar a tensão gerada e conseqüentemente ocorre a fadiga muscular (Dennis, Dow e Faulkner, 2003).

Por outro lado, músculos predominantemente rápidos, como o EDL, quando submetidos à desnervação, necessitam de freqüências mais elevadas para a manutenção das propriedades contráteis. Quando esses músculos são submetidos à eletroestimulação crônica de baixa freqüência, pode haver uma diminuição relativa na concentração da isoforma rápida da cadeia pesada de

miosina, o que altera a composição dos tipos de fibras musculares (Hennig, 1987; Dow et al., 2004).

Quando há lesão do nervo isquiático é possível observar perda significativa do peso muscular e alteração dos tipos de fibras musculares no sentido lenta para rápida, independente do tipo histoquímico do músculo (Cole e Gardiner, 1984).

A utilização da eletroestimulação crônica tem se mostrado efetiva na manutenção do peso muscular e das propriedades metabólicas, evitando a alteração dos tipos de fibras musculares (Cole e Gardiner, 1984).

Dentre os benefícios encontrados com o uso da eletroestimulação aplicada em músculos desnervados estão a manutenção da excitabilidade do músculo, massa e força muscular (Eberstein e Pachter, 1986; Hennig, 1987; Dow et al., 2004).

### **3 OBJETIVO**

O objetivo do presente estudo foi investigar a influência da eletroestimulação fásica de baixa frequência sobre a morfometria do músculo sóleo de ratos previamente desnervados em diferentes períodos (10, 20 e 30 dias) e tratados com 2 protocolos de estimulação: aplicação diária e em dias alternados.

## 4 MATERIAIS e MÉTODOS

### 4.1 Animais

Foram utilizados 55 ratos Wistar machos, com idade de 6 a 7 semanas e peso de  $200\pm 50$ g, mantidos no biotério da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade Metodista de Piracicaba (UNIMEP).

Os animais permaneceram em gaiolas individuais de polietileno, com ração (Purina para roedores) e água *ad libitum*, ciclo fotoperiódico de 12 horas claro e 12 horas escuro e temperatura controlada ( $23\pm 2^\circ\text{C}$ ).

O presente estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa Animal da Universidade Federal de São Carlos (protocolo n° 008-06).

### 4.2 Grupos Experimentais

Os animais foram randomizados em 11 grupos experimentais:

- A) Controle (C; n=5).
- B) Desnervado (D): animais submetidos ao esmagamento nervoso, sendo submetidos à eutanásia após 10 (D-10; n=5), 20 (D-20; n=5) e 30 (D-30; n=5) dias.
- C) Eletroestimulação Alternada (EEA): animais submetidos ao esmagamento nervoso e ao protocolo de eletroestimulação, realizado em dias alternados, sendo submetidos à eutanásia após 10 (EEA-10; n=5), 20 (EEA-20; n=5) e 30 (EEA-30; n=5) dias.
- D) Eletroestimulação Diária (EED): animais submetidos ao esmagamento nervoso e ao protocolo de eletroestimulação, realizado diariamente, sendo

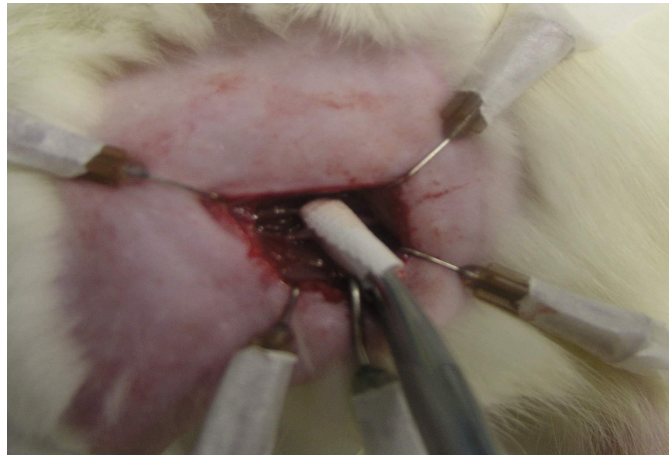
submetidos à eutanásia após 10 (EED-10; n=5), 20 (EED-20; n=5) e 30 (EED-30; n=5) dias.

E) Desnervado 6 dias (D-6; n=5): animais submetidos ao esmagamento nervoso, sendo submetidos à eutanásia após 6 dias. O intuito deste grupo foi para comprovar a eficiência do protocolo de desnervação, observada pelo processo de degeneração e regeneração do nervo após 6 dias.

#### **4.3 Protocolo de esmagamento do nervo isquiático**

Os animais foram anestesiados com injeção intramuscular na região glútea com uma mistura de Ketalar<sup>®</sup> (Cloridrato de Cetamina) 50mg/mL e Rompun<sup>®</sup> (Cloridrato de Xilazina) 2g/100 mL, na proporção de 1:1 e dose de 0.3mL/100g de peso corporal. Quando ocorria diminuição dos efeitos da anestesia durante o procedimento de esmagamento do nervo, era administrada uma dose complementar de 0.1mL da mesma mistura.

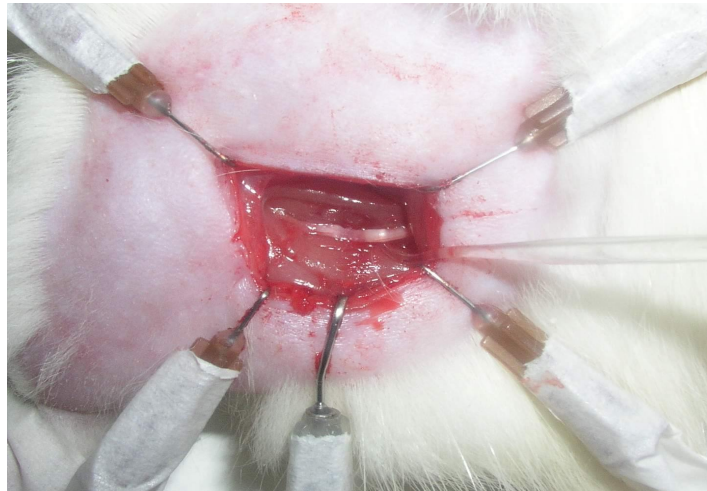
Posteriormente à anestesia, os animais foram posicionados em decúbito ventral e submetidos à tricotomia manual e assepsia da região glútea, sendo realizada incisão de aproximadamente 15 mm nesta região acompanhando o trajeto do nervo isquiático. Após a incisão, os planos musculares eram afastados para exposição e acesso ao nervo, sendo realizado o esmagamento nervoso utilizando-se de uma pinça hemostática Erwin-Guth de 12 cm adaptada com esparadrapo envolvendo a ponta da mesma, a fim de evitar o rompimento das bainhas conjuntivas do nervo (Figura 1).



**Figura. 1.** Esmagamento nervoso por meio de pinça hemostática Erwin- Guth de 12 cm.

O processo de esmagamento foi realizado por meio de quatro pinçamentos, com duração de 20 segundos e intervalo de 1 segundo entre eles, sendo que a pressão de pinçamento foi padronizada para todos os animais, utilizando-se como referência o segundo dente da pinça (Fernandes et al., 2005).

Em seguida, por meio de microscópio cirúrgico, era observada a indução da lesão nervosa, evidenciada por transparência no local do esmagamento nervoso, com preservação dos envoltórios conjuntivos, o que caracteriza uma lesão nervosa do tipo axoniotmese (Figura 2). Em seguida, os planos muscular e cutâneo eram suturados com fio de algodão 6-0 (ETHICON).



**Figura. 2.** Aspecto do nervo isquiático após o esmagamento com pinça hemostática Erwin-Guth de 12 cm.

#### **4.4 Protocolo de Eletroestimulação**

Após 24 horas do esmagamento nervoso e com os animais anestesiados conforme citado anteriormente, foi iniciada a eletroestimulação no músculo sóleo, utilizando-se o equipamento DUALPEX 961<sup>®</sup> (QUARK, Brasil). Os seguintes parâmetros foram utilizados: forma de pulso quadrada bifásica simétrica, tempo de duração do pulso de 3 ms, frequência de 10 Hz, amplitude de 5 mA (acrescida de 1 mA a cada 5 minutos afim de evitar acomodação do estímulo, totalizando 10 mA ao final da eletroestimulação) e duração de 30 minutos.

Para a aplicação da estimulação elétrica foi realizada a tricotomia das regiões inguinal e posterior da pata esquerda, onde foram acoplados eletrodos percutâneos auto-adesivos da marca VALUTRODE<sup>®</sup>, com 1 cm<sup>2</sup> de área, sendo usado gel como meio de contato entre pele e eletrodo (Figura 3).

A aplicação da eletroestimulação foi realizada em dias alternados ou diariamente, conforme os grupos experimentais, entretanto nos finais de semana não houve aplicação da eletroestimulação.



**Figura. 3.** Posicionamento dos eletrodos auto-adesivos (seta azul eletrodo na região inguinal, seta vermelha eletrodo na região posterior da pata).

#### 4.5 Procedimento de coleta do nervo isquiático

Após 6 dias da realização do esmagamento nervoso, os animais do grupo Desnervado 6 dias foram anestesiados para a coleta do nervo isquiático. Os animais tiveram o nervo isquiático exposto conforme descrito anteriormente e fixado *in situ* à 4°C, durante 10 minutos com fixador de Karnovsky (1965) modificado, contendo 1% de Paraformaldeído e 2% de Glutaraldeído em tampão Cacodilato de Sódio a 0.1M, pH 7.3.

Os fragmentos da porção distal do nervo isquiático dos animais foram mantidos em solução fixadora (Karnovsky) por 24 horas e pós-fixados em tetróxido de ósmio a 1% em tampão Cacodilato de Sódio 0.1M, pH 7.3, por duas horas.



Posteriormente, os fragmentos foram imersos em uranila 5% durante 24 horas, para coloração em bloco, desidratados em soluções crescentes (30% a 100%) de Acetona e incluídos em resina Araldite (UEGAMA<sup>®</sup>). Foram obtidos cortes transversais de 1 $\mu$ m com navalha de vidro, em Ultramicrotomo LKB<sup>®</sup>, que foram corados com Azul de Toluidina a 1%, em solução aquosa de Bórax a 1%.

#### **4.6 Procedimento de coleta do músculo sóleo**

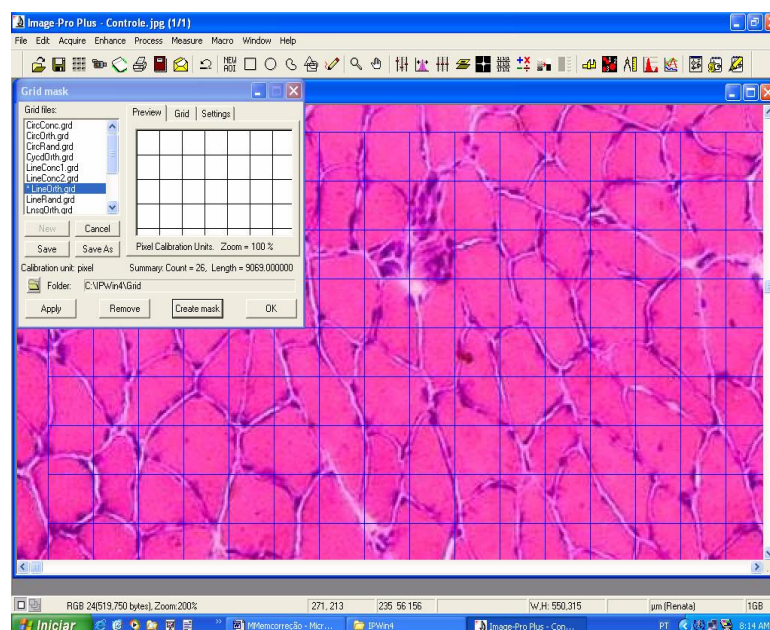
Após o período de sobrevivência estipulado para cada grupo, os animais anestesiados tiveram o músculo sóleo esquerdo dissecado e pesado em balança analítica (*Bel Engineering*<sup>®</sup>), e o terço proximal congelado em isopentano pré-congelado em nitrogênio líquido. As amostras foram armazenadas em nitrogênio líquido até o momento da microtomia.

Foram realizados cortes histológico (12 $\mu$ m) em criostato, à temperatura de -26°C. Os cortes, colhidos em lâminas histológicas, foram corados com Hematoxilina-Eosina.

#### **4.7 Análise da Densidade de Área do Tecido Conjuntivo**

O melhor corte histológico de cada lâmina, livre de artefatos de congelamento, foi fotografado em toda sua extensão, utilizando-se microscópio óptico com câmera acoplada (OLYMPUS<sup>®</sup>) em objetiva de 20 vezes. Para a análise da densidade de área de tecido conjuntivo utilizou-se o sistema de planimetria por contagem de pontos (figura 4) utilizando-se o *software* Image-Pró Plus 4.0<sup>®</sup> (*Media Cybernetics*).

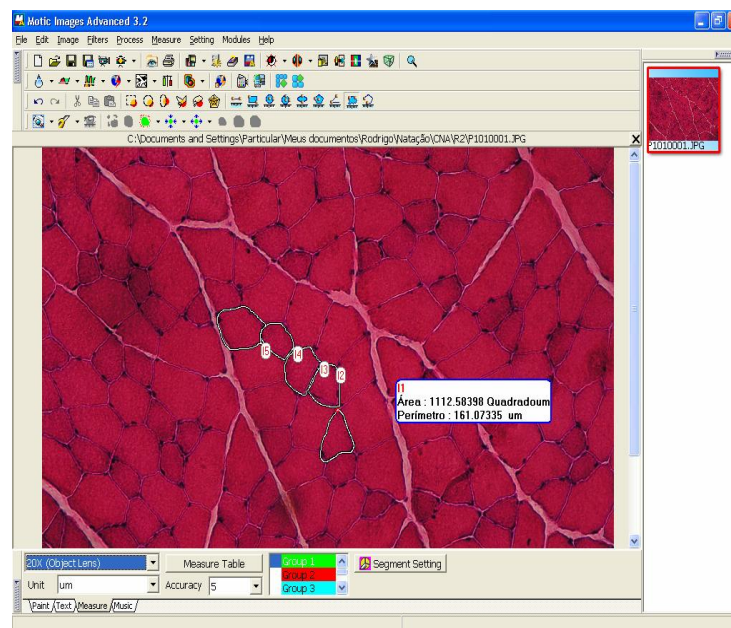
O sistema de planimetria consistia de uma planilha com 108 intersecções de reta onde, por meio de contagem manual, foram quantificadas todas as intersecções coincidentes sobre o tecido conjuntivo perimisial e endomisial, excluindo-se os pontos coincidentes sobre capilares sanguíneos.



**Figura. 4.** Mensuração da densidade do tecido conjuntivo através da planimetria por contagem de pontos no *software* Image-Pró Plus 4.0<sup>®</sup> (*Media Cybernetics*).

#### 4.8 Mensuração da Área da Fibra Muscular

O mesmo corte utilizado para a quantificação da densidade de área de tecido conjuntivo foi utilizado para a mensuração da área da fibra muscular. Para esta análise realizou-se a mensuração manual da área de secção transversa de 200 fibras do músculo sóleo de cada animal, utilizando-se o *software* *Motic Images* 3.2<sup>®</sup> (Figura 5). As fibras foram escolhidas aleatoriamente entre os campos fotografados em toda a extensão do músculo.



**Figura. 5.** Mensuração da área de secção transversa das fibras musculares do músculo sóleo no programa *Motic Images 3.2*.

#### 4.9 Análise Estatística

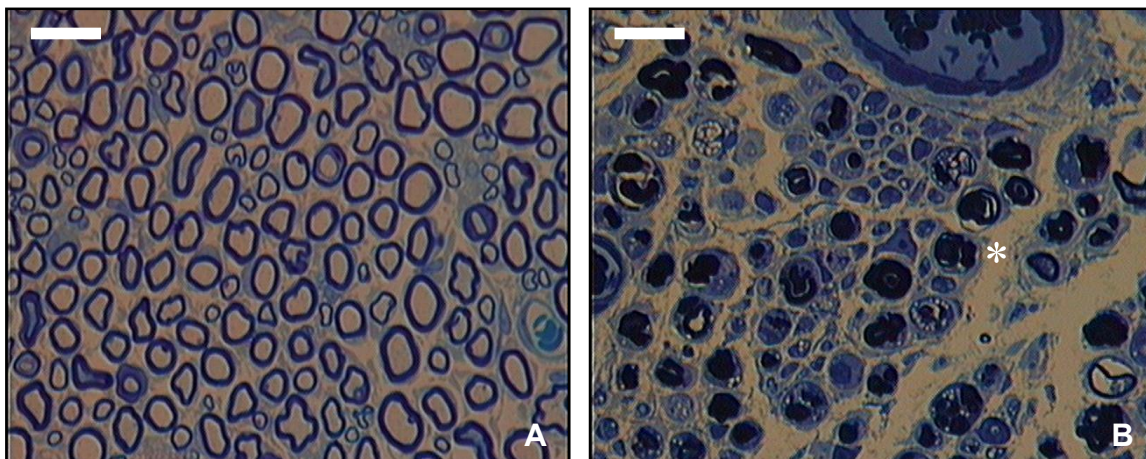
Inicialmente, para verificar as pressuposições dos métodos estatísticos paramétricos, foi aplicado o teste de normalidade Shapiro-Wilk. Em seguida, para análise de variância, foi aplicado o ANOVA *One-way* seguida de teste de Tukey HSD para as comparações múltiplas.

Para todos os testes o nível crítico de 5% foi estabelecido e os dados processados no programa BioEstat 4.0<sup>®</sup>.

## 5 Resultados

### 5.1 Esmagamento do nervo isquiático

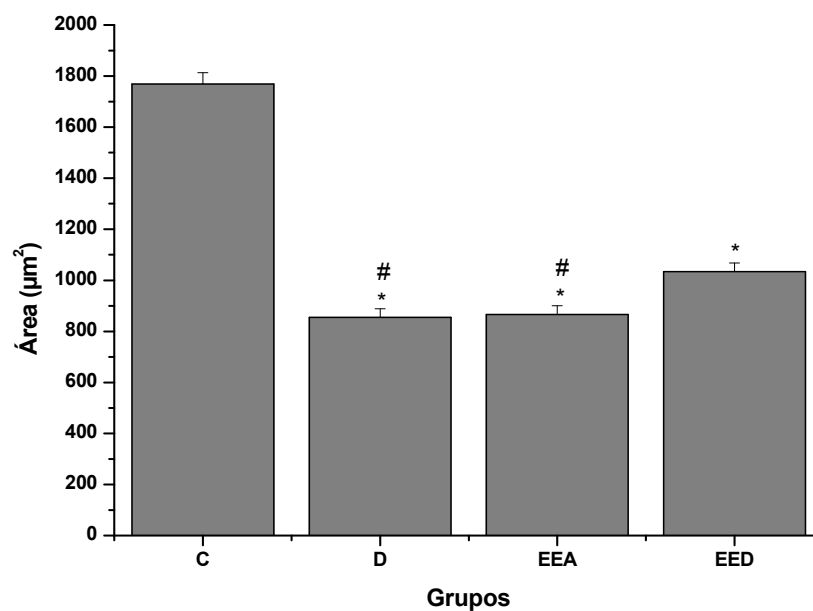
A eficácia do esmagamento nervoso pode ser demonstrada na figura 6. Na figura 6A observa-se a imagem de nervo normal, onde há integridade dos axônios e suas respectivas bainhas de mielina. Por outro lado, a Figura 6B apresenta nervo lesado, com intensa degeneração axonal e aumento da densidade de área de TC após período de 6 dias da desnervação.



**Figura. 6.** Corte transversal do nervo isquiático. (A) nervo normal; (B) 6 dias após a lesão por esmagamento, evidenciando intenso processo de degeneração axonal e aumento da densidade de área de tecido conjuntivo (asterisco). Coloração: Azul de Toluidina; Aumento: 100x, Bar=20 $\mu$ m.

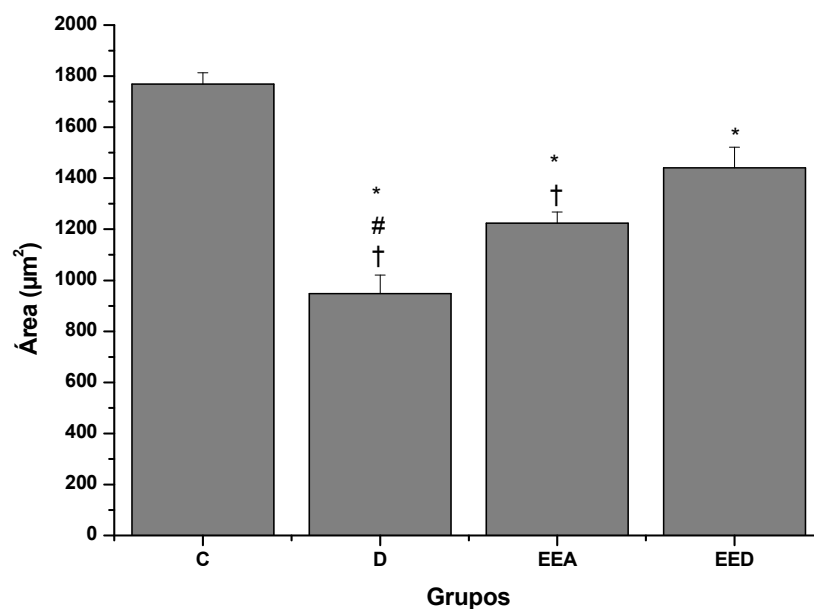
## 5.2 Área de Secção Transversa das Fibras Musculares

A análise da área de secção transversa (AST) das fibras musculares no grupo 10 dias mostrou que os animais dos grupos desnervado, assim como os submetidos à eletroestimulação alternada e diária apresentaram valores significativamente menores que os animais do grupo controle ( $855\pm 33.57\mu\text{m}^2$ ;  $866\pm 34.50\mu\text{m}^2$ ;  $1034\pm 34.06\mu\text{m}^2$ ;  $1769\pm 45.11\mu\text{m}^2$ ; respectivamente,  $p<0.05$ ). Além disso, os animais desnervado e submetidos à eletroestimulação alternada apresentaram valores significativamente menores que os animais do grupo eletroestimulado diariamente (figura 7).



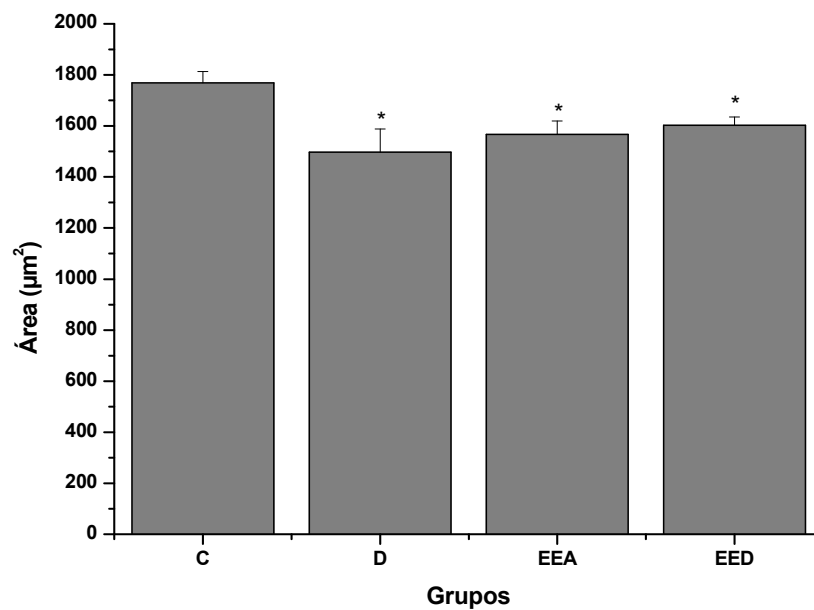
**Figura. 7.** AST ( $\mu\text{m}^2$ ) média das fibras musculares do músculo sóleo nos grupos experimentais 10 dias: Controle (C), Desnervado (D), Eletroestimulado Alternado (EEA), Eletroestimulado Diário (EED). \* Difere significativamente do C, # difere significativamente do EED,  $p<0.05$ .

Como no grupo 10 dias, os animais dos grupos desnervado, eletroestimulado alternado e eletroestimulado diário do grupo 20 dias apresentaram valores de AST significativamente menores que o grupo controle ( $948 \pm 73.02 \mu\text{m}^2$ ;  $1224 \pm 44.15 \mu\text{m}^2$ ;  $1441 \pm 80.77 \mu\text{m}^2$ ;  $1769 \pm 45.11 \mu\text{m}^2$ ; respectivamente,  $p < 0.05$ ). Além disso, o grupo eletroestimulado diário apresentou valores de AST maiores que os grupos desnervado e eletroestimulado alternado, que por sua vez apresentou valores maiores que o grupo desnervado (Figura 8).



**Figura 8.** AST ( $\mu\text{m}^2$ ) média das fibras musculares do músculo sóleo nos grupos experimentais 20 dias: Controle (C), Desnervado (D), Eletroestimulado Alternado (EEA), Eletroestimulado Diário (EED). \* Difere significativamente do C, # difere significativamente do EEA, † difere significativamente do grupo EED,  $p < 0.05$ .

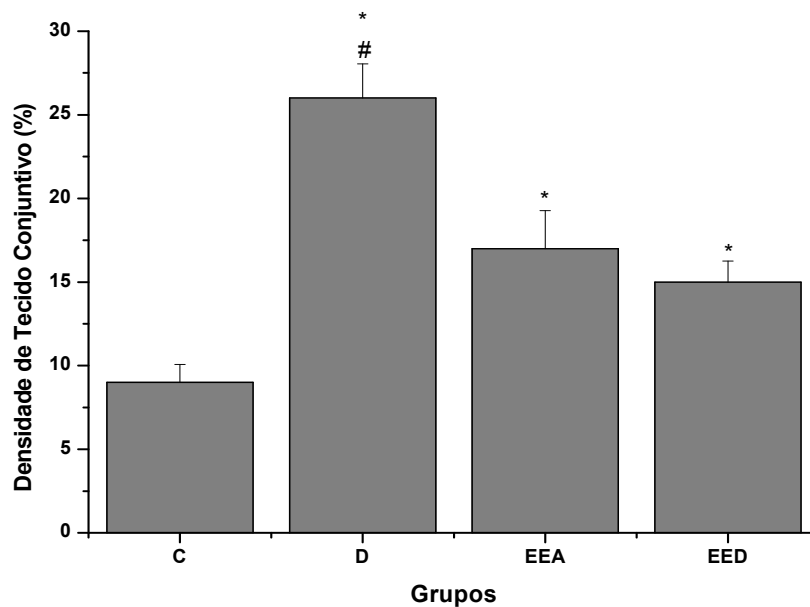
No grupo 30 dias, os animais dos grupos desnervado, eletroestimulado alternado e eletroestimulado diário apresentaram valores de AST significativamente menores que o grupo controle ( $1497\pm 91.42\mu\text{m}^2$ ;  $1567\pm 52.26\mu\text{m}^2$ ;  $1603\pm 32.34\mu\text{m}^2$ ;  $1769\pm 45.11\mu\text{m}^2$ ), não havendo diferença entre os animais desnervados e eletroestimulados (Figura 9).



**Figura. 9.** Área ( $\mu\text{m}^2$ ) média das fibras musculares do músculo sóleo nos grupos experimentais 30 dias: Controle (C), Desnervado (D), Eletroestimulado Alternado (EEA), Eletroestimulado Diário (EED). \* Difere significativamente do C,  $p < 0.05$ .

### 5.3 Densidade de Área do Tecido Conjuntivo

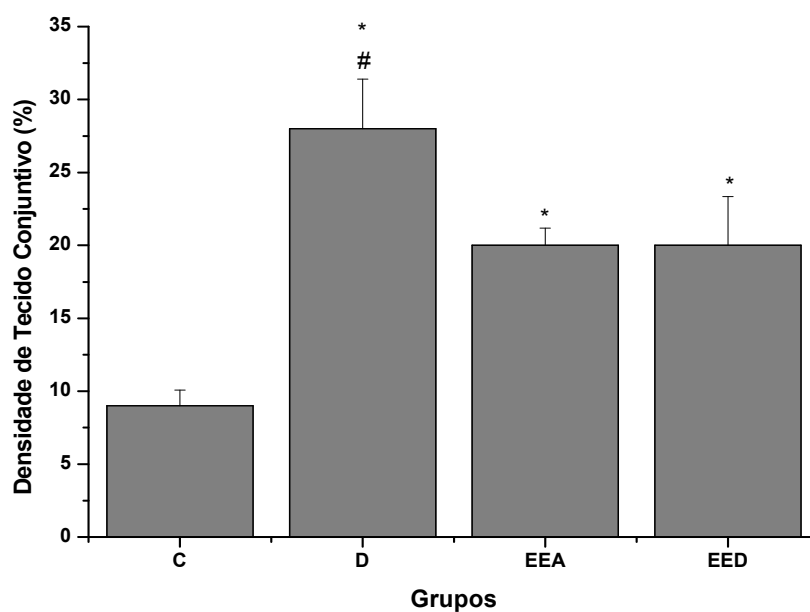
A análise da densidade de área de tecido conjuntivo (TC) no grupo 10 dias mostrou que os animais desnervado, eletroestimulado alternado e eletroestimulado diário apresentaram valores significativamente maiores que os animais do grupo controle ( $26\pm 2.04\%$ ;  $17\pm 2.27\%$ ;  $15\pm 1.25\%$ ;  $9\pm 1.07\%$ ; respectivamente,  $p < 0.05$ ). Além disso, o grupo desnervado apresentou aumento significativo da densidade de área de TC em relação aos grupos eletroestimulados. Não houve diferença entre os grupos eletroestimulados (Figuras 10 e 13).



**Figura. 10.** Densidade média de área de TC do músculo sóleo nos grupos 10 dias: Controle (C), Desnervado (D), Eletroestimulado Alternado (EEA), Eletroestimulado Diário (EED). \* Difere significativamente do C, # difere significativamente do EEA e EED,  $p < 0.05$ .

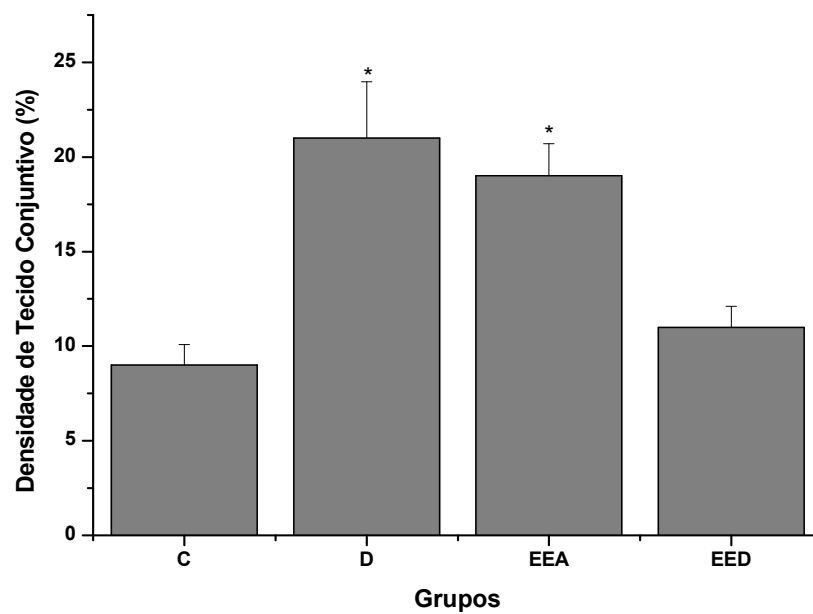


No grupo 20 dias, a densidade de área de TC nos músculos dos animais desnervado, eletroestimulado alternado e eletroestimulado diário foram significativamente maiores que no grupo controle ( $28\pm 3.40\%$ ;  $20\pm 1.18\%$ ;  $20\pm 3.35\%$ ;  $9\pm 1.07\%$ ; respectivamente,  $p < 0.05$ ). Além disso, o grupo desnervado apresentou aumento significativo da densidade de área de TC em relação aos grupos eletroestimulados diário e alternado. Não houve diferença entre os grupos eletroestimulados (Figuras 11 e 14).

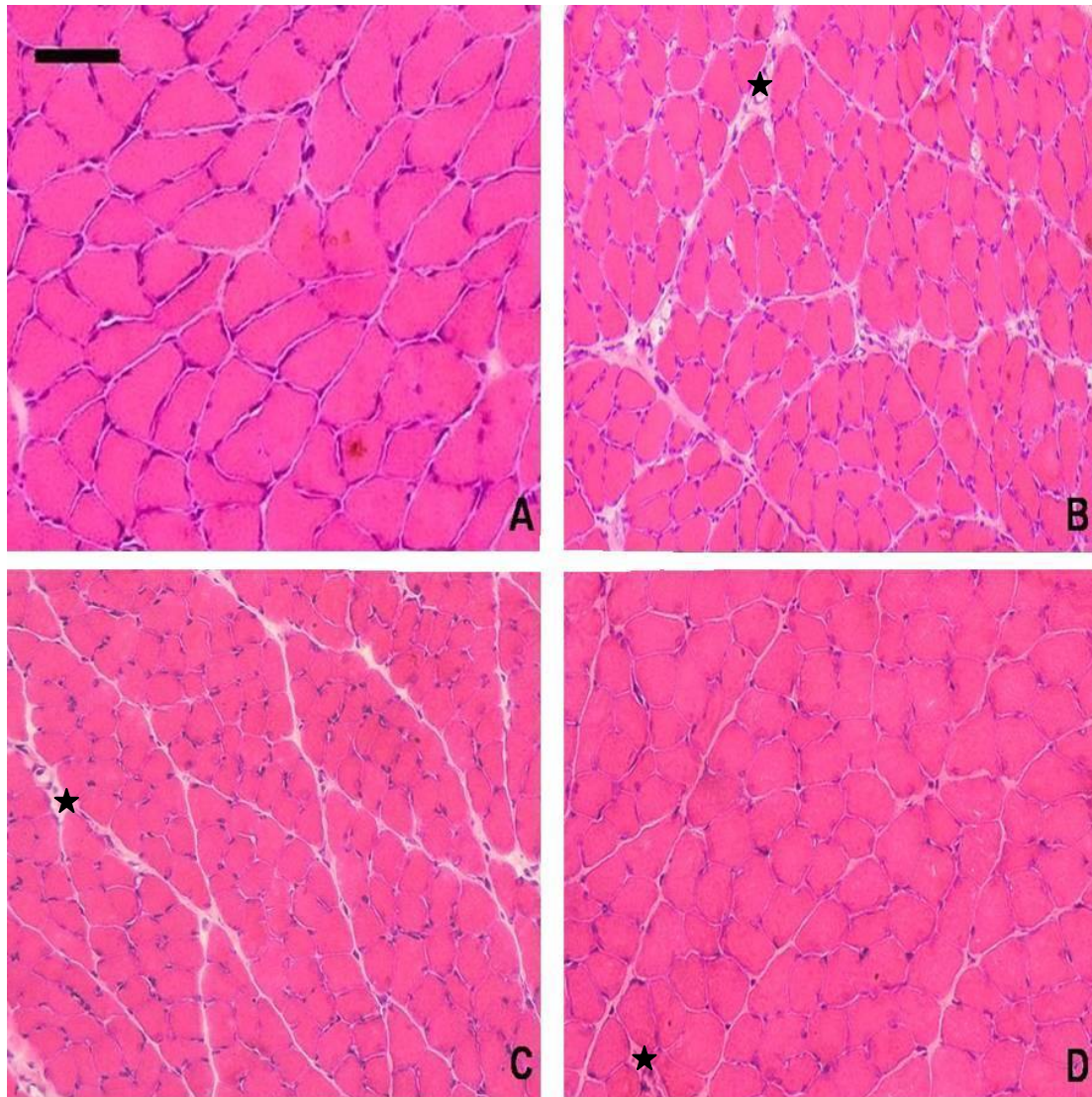


**Figura. 11.** Densidade média de área de TC do músculo sóleo nos grupos 20 dias: Controle (C), Desnervado (D), Eletroestimulado Alternado (EEA), Eletroestimulado Diário (EED). \* Difere significativamente do C, # difere significativamente do EEA e EED,  $p < 0.05$ .

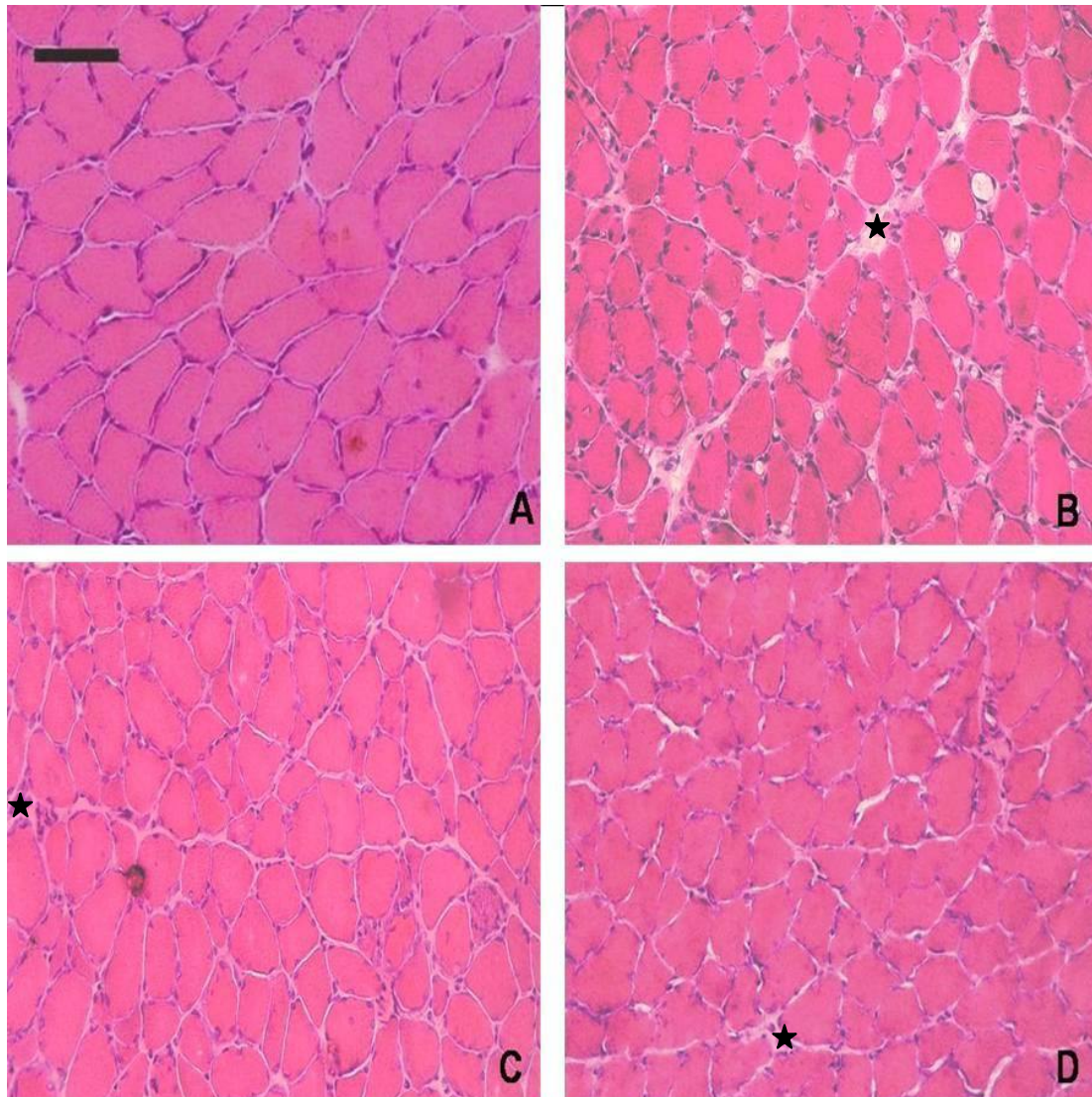
Para a densidade de área de TC no grupo 30 dias, os valores dos D e EEA foram significativamente maiores que os grupos eletroestimulado diário e controle ( $21\pm 2.98\%$ ;  $19\pm 1.69\%$ ;  $11\pm 1.11\%$ ;  $9\pm 1.07\%$ ; respectivamente,  $p < 0.05$ ) (figuras 12 e 15).



**Figura. 12.** Densidade média de área de TC do músculo sóleo nos grupos 30 dias: Controle (C), Desnervado (D), Eletroestimulado Alternado (EEA), Eletroestimulado Diário (EED). (\*) Difere significativamente do C e EED,  $p < 0.05$ .

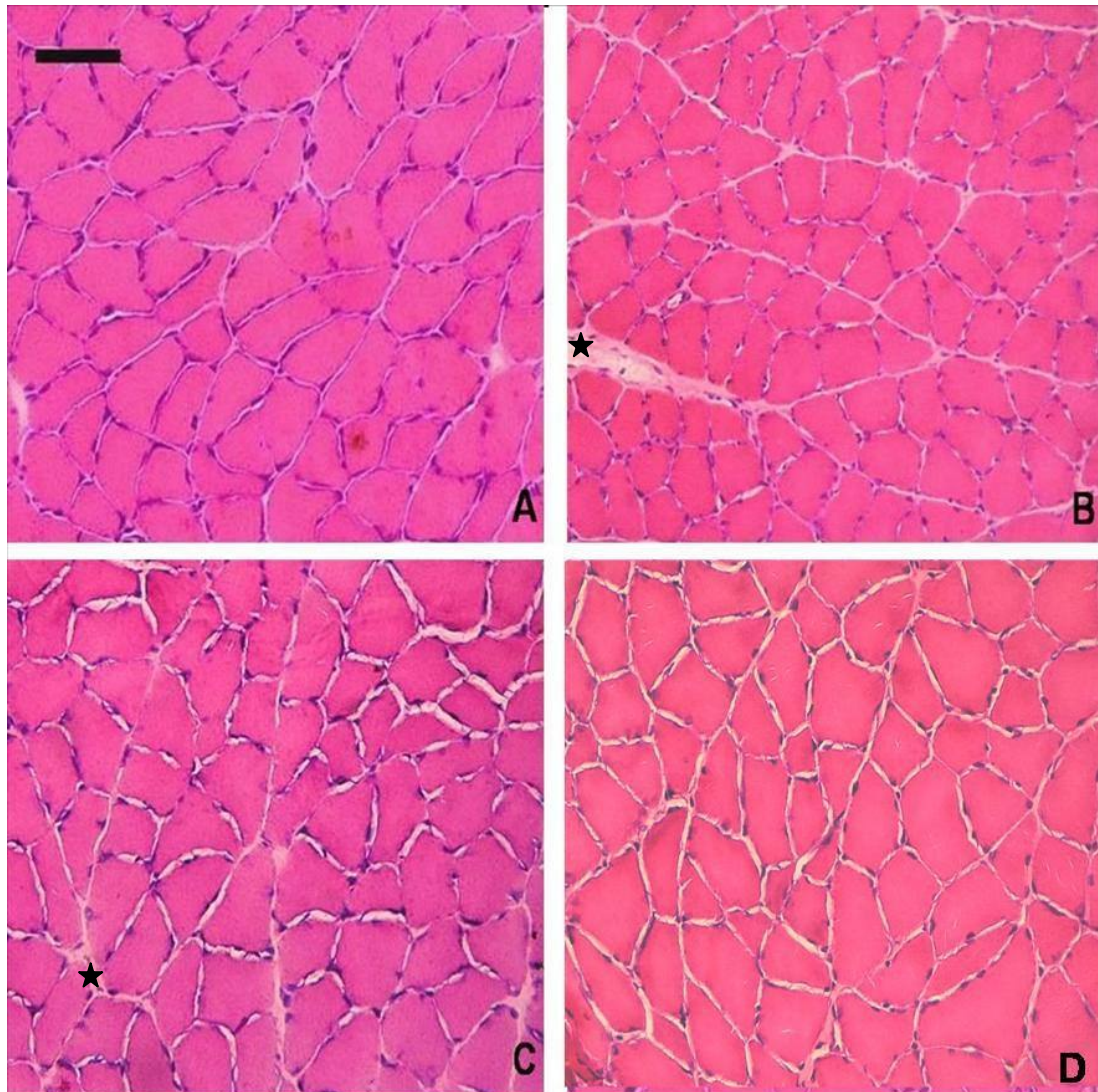


**Figura. 13.** Corte transversal do músculo sóleo de ratos dos grupos 10 dias: controle (A), desnervado (B), eletroestimulado alternado (C) e eletroestimulado diário (D). Observa-se diferença da densidade de área de TC (asterisco) entre os grupos, especialmente no perimísio. Coloração: H&E, Aumento 20x, Bar = 50 $\mu$ m.



**Figura. 14.** Corte transversal do músculo sóleo de ratos dos grupos 20 dias: controle (A), desnervado (B), eletroestimulado alternado (C) e eletroestimulado diário (D). Observa-se diferença da densidade de área de TC (asterisco) entre os grupos, especialmente no perimísio. Coloração: H&E, Aumento 20x, Bar = 50 $\mu$ m.





**Figura. 15.** Corte transversal do músculo sóleo de ratos dos grupos 30 dias: controle (A), desnervado (B), eletroestimulado alternado (C) e eletroestimulado diário (D). Observa-se diferença da densidade de área de TC (asterisco) entre os grupos, especialmente no perimísio. Coloração: H&E, Aumento 20x, Bar = 50 $\mu$ m.

## 6 DISCUSSÃO

O tipo de lesão nervosa é determinante na instalação dos efeitos degenerativos e regenerativos do sistema neuromuscular. Considerando que na lesão nervosa do tipo axoniotmese os envoltórios conjuntivos do nervo estão preservados, o processo de regeneração nervosa com conseqüente reinervação muscular é facilitado (Carter et al., 1998).

O nível onde ocorre a lesão nervosa parece ser determinante no tempo de recuperação da função muscular. Estudos prévios mostram que após axoniotmese do nervo isquiático, como a utilizada neste estudo, a reinervação muscular ocorre somente após 2 semanas, quando 25% das fibras musculares estão poli-inervadas (Carmignoto et al., 1983; Gorio et al., 1983). No entanto, quando a lesão ocorre em um ramo do nervo isquiático, como o nervo fibular comum, os primeiros sinais de reinervação aparecem entre 7 ou 8 dias, quando os valores de tensão de contração e tétano muscular são 3 e 2% dos valores do grupo controle, respectivamente (Eberstein e Patcher, 1986).

O delineamento dos grupos experimentais do presente estudo foi baseado nas fases de reinervação muscular após a desnervação por esmagamento nervoso.

Considerando que aos 14 dias inicia-se o contato entre os brotos axonais em crescimento com o músculo desnervado, optou-se avaliar o grupo 10 dias para verificar a influência da eletroestimulação do músculo sóleo em uma fase onde a reinervação das fibras musculares ainda não ocorreu.

Sabendo-se que entre 21 a 25 dias, o pico de fibras musculares poli-inervadas é atingido, objetivou-se analisar o grupo 20 dias para verificar a influência da eletroestimulação sobre o músculo em uma fase de reinervação, onde a função motora está parcialmente recuperada.

Finalmente, a análise do grupo 30 dias foi com o intuito de verificar a influência da eletroestimulação em uma fase onde a poli-inervação começa a ser substituída pela mono-inervação. Neste grupo foi possível estudar o efeito da eletroestimulação associado com a estimulação voluntária mais efetiva do músculo.

Embora a maioria dos estudos experimentais utilizem a eletroestimulação crônica para o estudo do efeito da mesma no músculo desnervado, este procedimento não é utilizado na prática clínica, já que a estimulação crônica é utilizada por períodos superiores a 8 horas diárias (Gundersen e Eken, 1992; Windisch et al., 1998; Skorjanc, Traub e Pette, 1998).

Deste modo, o presente estudo utilizou-se da eletroestimulação fásica, comumente utilizada na clínica, onde a eletroestimulação não ultrapassa alguns minutos por dia (Hämäläinen e Pette 1996).

Os parâmetros foram definidos de acordo com a característica fenotípica do músculo sóleo, pelo fato do mesmo estar desnervado e pela visualização da contração muscular vigorosa, a qual foi caracterizada pelo movimento de flexão plantar.

Devido ao fato do músculo sóleo ter predomínio de fibras musculares lentas, a frequência de 10 Hz foi determinada baseada nos achados de Lömo, Westgaard e Dahl (1974) e Kwong e Vrbová (1981), os quais demonstraram que

músculos com predomínio de fibras musculares lentas, quando desnervados e submetidos à eletroestimulação de baixa frequência à 10Hz apresentam melhor manutenção das suas propriedades contráteis. Por outro lado, quando são submetidos à eletroestimulação de alta frequência à 100Hz apresentam transformação das isoformas de proteínas no sentido lento para rápido, apresentando características contráteis de músculos rápidos após algum período de estimulação.

Uma vez que as fibras musculares desnervadas não respondem à correntes com pequenas durações de fase (Guirro e Guirro, 2002; Ashley et al. 2005), o tempo de duração de pulso utilizado no presente estudo foi maior do que o utilizado durante eletroestimulação de músculo normal. O valor de 3 ms baseou-se em estudos prévios (Silva et al., 1999; Polacow et al., 2003; Guirro et al., 2004; Fernandes et al., 2005) onde foi utilizado o mesmo protocolo do presente estudo, e além disso, por este permitir que uma pequena amplitude permita a contração muscular.

Em formatos de pulso como o triangular, a amplitude da corrente aumenta lentamente, estimulando seletivamente as fibras musculares desnervadas (Bennie, Petrofsky, Nisperos, 2002). Por outro lado, na forma de pulso quadrada a amplitude aumenta rapidamente e com isso tanto fibras musculares desnervadas, onde o limiar de excitabilidade é maior (Salmons et al., 2005), quanto fibras musculares inervadas, são estimuladas (Bennie, Petrofsky, Nisperos, 2002). Uma vez que o objetivo era recrutar ambas as fibras, desnervadas e inervadas, foi selecionado o tipo de pulso quadrado.



A amplitude de 5mA também foi utilizada em protocolo de estudo prévio com músculo desnervado (Fernandes et al., 2005) e a mesma permite uma contração vigorosa do músculo sóleo desnervado. O aumento de 1 mA a cada 5 minutos foi realizado afim de evitar acomodação do músculo ao estímulo e garantir o mesmo nível de estimulação em todos os animais.

Apesar da grande quantidade de estímulo aplicada ao músculo, cerca de 18.000 pulsos durante 30 minutos de EE, não foram observados sinais de lesão muscular, uma vez que na análise histológica do tecido muscular pôde-se observar fibras com formato poliédrico e núcleos periféricos, o que caracteriza aspecto normal de fibra muscular. Não foram observados sinais típicos de degeneração muscular, conforme relatado previamente (Engel e Franzini-Armostrong, 1994).

Outro fator que deve ser ressaltado é que eletrodos desgastam conforme o tempo de uso e com isso há aumento da resistência para a corrente, com conseqüente diminuição da estimulação muscular (Robinson, 2001). No presente estudo não houve reposição periódica dos eletrodos, no entanto não foi observada diminuição da estimulação muscular, já que todos os animais eletroestimulados apresentaram contração vigorosa durante todo período de estimulação.

Herbison, Jaweed e Ditunno (1981) observaram que ratos submetidos à desnervação do tipo axoniotmese apresentam diminuição do peso muscular e da área de secção transversa das fibras musculares até 2 semanas após a realização do esmagamento nervoso, e após a terceira semana a AST das fibras musculares aumentam, demonstrando que a reinervação ocorreu após a segunda semana. Esses resultados também foram encontrados no presente estudo onde a AST das

fibras musculares aumentou após a segunda semana, alcançando valores próximos ao normal 30 dias após a desnervação.

Lieber et al. (1986) em estudo com ratos demonstraram que o músculo sóleo, constituído principalmente por fibras musculares lentas, após um pequeno período de desnervação apresenta atrofia de todos os tipos de fibras. No entanto, a atrofia das fibras musculares lentas é mais evidente no sóleo devido ao seu maior número neste músculo.

Músculos esqueléticos atrofiam rapidamente quando submetidos à desnervação, sendo que aos 10 dias apresentam diminuição de 29% das proteínas contráteis, acompanhada da diminuição da área de secção transversa das fibras musculares (Furuno, Goodman e Goldberg, 1990). A atrofia decorrente da desnervação deve-se ao aumento da proteólise miofibrilar causada pelo aumento de cálcio intracelular, o que resulta em discreta ou ausente síntese protéica (Engel e Franzini-Armstrong, 1994).

Bodine et al. (2001) em estudo com músculos de ratos desnervados observaram que a redução da massa muscular é progressiva. Após 3 dias da desnervação a massa muscular diminui aproximadamente 10%; no 7º dia o valor da massa muscular alcança 30%, e finalmente aos 14 dias atingem o pico de 50%, quando comparados ao grupo controle.

Ashley et al. (2005) correlacionaram a diminuição da massa muscular com a diminuição da AST, e observaram que após 10 semanas de desnervação a massa muscular e a AST estavam 50% menores que no grupo controle.

A atrofia resultante da desnervação é causada pela diminuição da atividade elétrica do músculo. Diversos estudos têm demonstrado que a eletroestimulação

iniciada em um período precoce de desnervação pode minimizar os efeitos deletérios da mesma, com conseqüente restabelecimento da reinervação e função motora (Nemeth, 1982; Cole e Gardiner, 1984; Xu, Tu e Gu, 2003; Aydin, 2004; e Dow et al., 2004). Infelizmente, o início precoce da eletroestimulação não é prática comum, visto que o paciente, na maioria dos casos, é encaminhado à fisioterapia em uma fase tardia da desnervação.

Segundo Eberstein e Pachter (1986) a eletroestimulação minimiza a atrofia de músculos desnervados pela alteração da concentração do cálcio no meio sarcoplasmático, fator que diminui a degradação das proteínas musculares.

No presente estudo, os resultados para AST demonstram que a eletroestimulação foi eficiente para minimizar a atrofia em uma fase inicial de desnervação, ou seja, nos grupos 10 e 20 dias, quando a atividade neuromuscular voluntária não está completamente restabelecida. Além disso, observa-se que o grupo submetido à eletroestimulação diária teve melhores resultados, fato que pode ter ocorrido já que os grupos eletroestimulados alternadamente tiveram 40% a menos de estímulo, em relação ao eletroestimulado diário. Esses resultados estão de acordo com os achados de Dow et al. (2004), que relatam que o músculo desnervado deve ser submetido a um número adequado de contrações para minimizar as alterações musculares decorrentes da desnervação.

Já no grupo 30 dias, quando acredita-se que o músculo já esteja reinervado, tanto os protocolos de eletroestimulação diário e alternado não interferiram na AST das fibras musculares. Esses resultados sugerem que com o restabelecimento da contração voluntária, o tratamento realizado por meio da eletroestimulação não é importante para aumento da AST. Esses dados também

podem ser encontrados em estudo prévio (Brasileiro e Salvini, 2004).

O tecido conjuntivo intramuscular também sofre alterações após alguns estímulos, tais como imobilização, treinamento de endurance, alteração hormonal e desnervação (Józsa, 1990; Engel e Franzini-Armstrong, 1994; Fernandes et al., 2005).

Estudos têm demonstrado aumento do tecido conjuntivo intramuscular endomisial e perimisial em ratos submetidos à desnervação (Lieber et al. 1986; Józsa, 1990; Fernandes et al., 2005; Kostrominova et al., 2005).

Józsa et al. (1990) e Camillo, Rocha e Chopard (2004) relatam que músculos lentos, como o sóleo, apresentam alta densidade capilar, cerca de 2 capilares por fibra muscular, enquanto que músculos rápidos, como o EDL, apresentam cerca de 0.9 capilares por fibra muscular. Além disso, relatam que em músculos submetidos à desnervação a densidade de capilares por fibra muscular aumenta, o que aumenta proporcionalmente a densidade de área de TC. Como músculos lentos apresentam maior vascularização, estes músculos respondem à desnervação com maior proliferação de tecido conjuntivo do que músculos predominantemente rápidos.

Segundo Salonen et al. (1985) a desnervação de músculos esqueléticos promove a proliferação de colágeno principalmente do tipo I, no endomísio e perimísio. O colágeno tipo I apresenta menor elasticidade, o que pode levar a diminuição da elasticidade muscular, prejudicando a função muscular após a reinervação.

Neste estudo também foi observado aumento da densidade de área do tecido conjuntivo nos grupos desnervados. No entanto, foi possível observar que a

eletroestimulação minimizou a proliferação de tecido conjuntivo, já que os grupos eletroestimulados apresentaram menor densidade de tecido conjuntivo em relação aos grupos desnervados e não estimulados. A importância do estímulo elétrico com a finalidade de diminuir a proliferação de tecido conjuntivo já foi relatada em estudo anterior (Williams et al., 1988).

Outros estudos mais recentes também têm demonstrado que a eletroestimulação fásica aplicada a músculos desnervados minimiza a proliferação do tecido conjuntivo perimisial e endomisial (Polacow et al., 2003; Fernandes et al., 2005).

Diferente dos resultados referentes à AST, onde a eletroestimulação teve benefício somente nos grupos 10 e 20 dias, a utilização da eletroestimulação foi importante para minimizar a proliferação de tecido conjuntivo nos 3 períodos analisados. Além disso, nos períodos de 10 e 20 dias não houve diferença entre os protocolos diário e alternado. Entretanto, no período de 30 dias, quando o músculo já se encontra em estado avançado de reinervação, a associação da eletroestimulação diária com a atividade voluntária trouxe os valores da densidade de área do TC a níveis normais.

Os resultados apresentados ressaltam que a eletroestimulação aplicada em uma fase onde o músculo está reinervado, aos 30 dias, teve mais benefícios para o tecido conjuntivo do que para o tecido contrátil. Deste modo, embora a eletroestimulação não ter evitado a atrofia muscular, o resultado positivo em relação à densidade de área de TC é de extrema importância já que a proliferação acentuada do mesmo pode prejudicar a recuperação da função muscular após a reinervação (Carter et al., 1998).

Neste estudo as análises da densidade de área do tecido conjuntivo e da AST das fibras musculares, mostraram que o protocolo de eletroestimulação diária, em relação à eletroestimulação alternada, foi mais eficaz para minimizar as alterações musculares decorrentes da desnervação.

Segundo Carter et al. (1998) as alterações musculares decorrentes da desnervação, afetam a recuperação da função. Baseado nestes dados, minimizar a atrofia e a proliferação do tecido conjuntivo após a desnervação devem ser um dos objetivos na clínica de fisioterapia. No entanto, apesar dos resultados obtidos neste estudo, pesquisas complementares são necessárias para melhor entendimento dos efeitos da eletroestimulação no músculo desnervado.

## 7 CONCLUSÃO

Com base no modelo experimental aplicado neste estudo pode-se concluir que os efeitos da eletroestimulação no músculo desnervado sobre a área de secção transversa das fibras musculares são influenciados pelo tempo de desnervação por axôniotmese, sendo a eletroestimulação mais benéfica em uma fase onde a reinervação muscular não está completamente restabelecida, ou seja, aos 10 e 20 dias.

No entanto, quanto aos efeitos da eletroestimulação sobre a proliferação de tecido conjuntivo, o tempo de desnervação parece não interferir sobre a densidade de área de tecido conjuntivo, já que aos 30 dias ainda pode-se encontrar os benefícios da eletroestimulação. Esses resultados mostram que a eletroestimulação influenciou mais o remodelamento de tecido conjuntivo do que o trofismo muscular.

A comparação dos dois protocolos de eletroestimulação sinaliza para uma maior frequência de tratamento, uma vez que a eletroestimulação diária foi mais eficaz que a eletroestimulação em dias alternados.

## REFERÊNCIAS\*

- Allbrook D. Skeletal muscle regeneration. *Muscle Nerve*. 1981; 4(3):234-45.
- Arber S, Burden SJ, Harris AJ. Patterning of skeletal muscle. *Curr Opin Neurol*. 2002; 12(1): 100-103.
- Ashley Z, Sutherland H, Lanmuller H, Unger E, Li F, Mayr W et al. Determination of the Chronaxie and Rheobase of Denervated Limb Muscles in Conscious Rabbits. *Artif Organs*. 2005; 29(3): 212-15.
- Aydin MA, Mackinnon S, Gu XM, Kobayashi J, Kuzon WM. Force deficits in skeletal muscle after delayed reinnervation. *Plast Reconstr Surg*. 2004; 113(6): 1712-1718.
- Bain JR, Veltri KL, Chamberlain D, Fahnestock M. Improved functional recovery of denervated skeletal muscle after temporary sensory nerve innervation. *Neuroscience*. 2001; 103(2): 503-510.
- Bailey AJ, Sims TJ. Meat tenderness: distribution of molecular species of collagen in bovine muscle. *J Sci Food Agric*. 1977 Jun;28(6): 565-70. Apud Light N, Champion AE. Characterization of muscle epimysium, perimysium and endomysium collagens. *Biochem J*. 1984 May 1;219(3): 1017-26.
- Baldwin KM, Haddad F. Skeletal muscle plasticity: cellular and molecular responses to altered physical activity paradigms. *Am J Phys Med Rehabil*. 2002; 81(11): 40-50.
- Bazin S, Delaunay A. Biochemistry of inflammation. VI. fluctuations in the levels of collagen and nonfibrillar proteins in different types of inflammatory foci. comparative studies. *Ann Inst Pasteur (Paris)*. 1964; 107: 163-72. Apud Letho M, Duance VC, Restall D. Collagen and fibronectin in a healing skeletal muscle injury. *J Bone Joint Surg Br*. 1985; 67B(5): 820-828.
- Bendall ER. Calculating wastage rates. *Nurs Times*. 1967; 63(39): 1300-1. Apud Light N, Champion AE. Characterization of muscle epimysium, perimysium and endomysium collagens. *Biochem J*. 1984; 219(3): 1017-26.

---

\* Baseadas na norma do International Committee of Medical Journal Editors - Grupo de Vancouver; 2005. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.



Bennie SD, Petrofsky JS, Nisperos J. Toward the optimal waveform for electrical stimulation of human muscle. *Eur J Appl Physiol.* 2002; 88: 13-19.

Bobinac D, Malnar-Dragojevic D, Bajek S, Soic-Vranic T, Jerkovic R. Muscle fiber type composition and morphometric properties of denervated rat extensor digitorum longus muscle. *Croat Med J.* 2000; 41(3): 294-7.

Bodine SC, Latres E, Baumhueter S, Lai VK, Nunez L, Clarke BA, et al. Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science.* 2001; 294(5547):1704-8.

Borisov AB, Huang SK, Carlson BM. Remodeling of the vascular bed and progressive loss of capillaries in denervated skeletal muscle. *Anat Rec.* 2000; 258(3): 292-304.

Brasileiro JS, Salvini TF. Limites da estimulação elétrica neuromuscular no fortalecimento de músculos esqueléticos saudáveis e com déficit de força. *Fisioterapia Brasil.* 2004; 5(3): 224-30.

Buckingham M, Bajard L, Chang T, Daubas P, Hadchouei J, Meilhac S, et al. The formation of skeletal muscle: from somite to limb. *J Anat.* 2003; 202: 59-68.

Burnett MG, Zager EL. Pathophysiology of peripheral nerve injury: a brief review. *Neurosurg Focus.* 2004; 16(5): article 1.

Camillo AC, Rocha RC, Chopard RP. Structural and microvascular study of soleus muscle of wistar rats after section of the sciatic nerve. *Arq Neuropsiquiatr.* 2004; 62(3-B): 835.

Carmignoto G, Finesso M, Siliprandi R, Gorio A. Muscle reinnervation – I. Restoration of transmitter release mechanisms. *Neuroscience.* 1983; 8(3): 393-401.

Carter AJ, Kristmundsdottir F, Gilmour J, Glasby MA. Changes in muscle cytoarchitecture after peripheral nerve injury and repair. *J Hand Surg [Br].* 1998; 23(3): 365-9.

Chimelli L, Sverzut ACM. The role of satellite cells on adaptatives states of skeletal muscle tissue. *Rev Fisioter Univ São Paulo.* 1999; 6(2): 132-139.

Cole BG, Gardiner PF. Does electrical stimulation of denervated muscle, continued after reinnervation, influence recovery of contractile function? *Exp Neurol.* 1984; 85(1): 52-62.

Cossu G, Tajbakhsh S, Buckingham M. How is myogenesis initiated in embryo? *TIG*. 1996; 12(6): 218-223.

Culav EM, Clark CH e Merrilees MJ. Connective tissues: matrix composition and its relevance to physical therapy. *Phys Ther*. 1999; 79(3): 308-19.

Daneyemez M, Solmaz I, Izci Y. Prognostic factors for the surgical management of peripheral nerve lesions. *Tohoku J Exp Med*. 2005; 205(3): 269-75.

Dellon AL, Mackinnon SE. Sciatic nerve regeneration in the rat. Validity of walking track assessment in the presence of chronic contractures. *Microsurgery*. 1989; 10(3): 220-5.

Dennis RG, Dow DE, Faulkner JA. An implantable device for stimulation of denervated muscles in rats. *Med Eng Phys*. 2003; 25(3): 239-53.

Dow DE, Cederna PS, Hasset CA, Kostrominova TY, Faulkner JA. Number of contractions to maintain mass and force of a denervated rat muscle. *Muscle Nerve*. 2004; 30(1): 77-86.

Eberstein A, Pachter BR. The effect of electrical stimulation on reinnervation of rat muscle: contractile properties and endplate morphometry. *Brain Res*. 1986; 384(2): 304-10.

Engel AG, Franzini-Armstrong C. *Myology*. 2. ed. Philadelphia: McGRAW-HILL INC; 1994. 1960p.

Evans GR. Peripheral nerve injury: a review and approach to tissue engineered constructs. *Anat Rec*. 2001; 263(4): 396-404.

Fernandes KC, Fuentes CB, Campos GE, Somazz MC, Polacow ML, Guirro RR, et al. Análise morfológica dos tecidos muscular e conjuntivo após desnervação e estimulação elétrica de baixa frequência. *Rev Bras Fisiot*. 2005; 9(2): 235-241.

Furuno K, Goodman MN, Goldberg AL. Role of Different Proteolytic Systems in the Degradation of Muscle Proteins during Denervation Atrophy. *J Biol Chem*. 1990; 265(15): 8550-7.

Gauthier GF, Dunn RA. Ultrastructural and cytochemical features of mammalian skeletal muscle fibres following denervation. *J Cell Sci*. 1973; 12(2): 525-547.

Gorio A, Carmignoto G, Finesso M, Polato P, Nunzi MG. Muscle reinnervation – II Sprouting, synapse formation and repression. *Neuroscience*. 1983; 8(3): 403-16.

Guirro E, Guirro RRJ. *Fisioterapia Dermato Funcional: fundamentos, recursos e patologias*. 3.ed. São Paulo: Manole; 2002. 560p.

Guirro RRJ, Silva CA, Forti F, Cancelliero KM. Análise do músculo esquelético desnervado tratado com metformina e/ou estimulação elétrica de baixa frequência. *Rev Bras Fisiot*. 2004; 8: 21-7.

Gulati AK. Long-term retention of regenerative capability after denervation of skeletal muscle, and dependency of late differentiation on innervation. *Anat Rec*. 1988; 220(4): 429-34.

Gundersen K, Eken T. The importance of frequency and amount of electrical stimulation for contractile properties of denervated rat muscles [abstract]. *Acta Physiol Scand*. 1992; 145(1): 49-57.

Hämäläinen N, Pette D. Slow-to-fast transitions in myosin expression of rat soleus muscle by phasic high-frequency stimulation. *FEBS Lett*. 1996 16; 399(3): 220-2.

Hennig R. Late reinnervation of the rat soleus muscle is differentially suppressed by chronic stimulation and by ectopic innervation. *Acta Physiol Scand*. 1987; 130(1): 156-160.

Herbison GJ, Jaweed MM, Ditunno JF. Contractile properties of reinnervating skeletal muscle in the rat. *Arch Phys Med Rehabil*. 1981; 62: 35-38.

Ijkema-Paassen J, Jansen K, Gramsbergen A, Meek MF. Reinnervation of muscles after transection of the sciatic nerve in adult rats. *Muscle Nerve*. 2002;25(6):891-7.

Ijkema-Paassen J, Jansen K, Gramsbergen A, Meek MF. Transection of peripheral nerves, bridging strategies and effect evaluation. *Biomaterials*. 2004; 25(9): 1583-92.

Józsa L, Kannus P, Thöring J, Reffy A, Järvinen M, Kvist M. The effect of tenotomy and immobilization on intramuscular connective tissue. A morphometric and microscopy study in rat calf muscles. *J Bone Joint Surg Br*. 1990; 72b(2): 293-7.

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

Karnovsky MJ. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. *J Cell Biol*. 1965; 27: 137a.

Keilhoff G, Fansa H. Successful intramuscular neurotization is dependent on the denervation period. A histomorphological study of the gracilis muscle in rats. *Muscle Nerve*. 2005; 31(2): 221-8.

Kern H, Hofer C, Modlin M, Forstner C, Raschka-Hogler D, Mayr W, Stohr H. Denervated muscles in humans: limitations and problems of currently used functional electrical stimulation training protocols. *Artif Organs*. 2002; 26(3): 216-218.

Kostrominova TY, Dow DE, Dennis RG, Miller RA, Faulkner JA. Comparison of Gene Expression of Two-Month Denervated, Two-Month Stimulated-Denervated and Control Rat Skeletal Muscles. *Physiol Genomics*. 2005; 22(2): 227-43.

Kovanen V. Intramuscular extracellular matrix: complex environment of muscle cells. *Exerc Sport Sci Rev*. 2002; 30(1): 20-5.

Kujawa M, Baran W, Jankowska-Steifer E. Morphometric ultrastructural analysis of satellite cells in denervated rat soleus muscle. *Exp Mol Pathol*. 2004; 76(2):166-72.

Kujawa M, Baran W, Jankowska-Steifer E. Quantitative ultrastructural changes in satellite cells of rats immobilized after soleus muscle denervation. *Exp Mol Pathol*. 2005; 78(1): 78-85.

Kwong WH, Vrbova G. Effects of low-frequency electrical stimulation on fast and slow muscles of the rat. *Pflugers Arch*. 1981; 391(3):200-7.

Letho M, Duance VC, Restall D. Collagen and fibronectin in a healing skeletal muscle injury. *J Bone Joint Surg Br*. 1985; 67B(5): 820-828.

Lieber RL, Friden JO, Hargens AR, Feringa ER. Long-term effects of spinal cord transection on fast and slow rat skeletal muscle. II. Morphometric properties. *Exp Neurol*. 1986; 91(3):435-48.

Lieber RL. *Skeletal muscle structure, function & plasticity: the physiological basis of rehabilitation*, 2. ed. San Diego: Lippincott Williams & Wilkins; 2002. 369p.

Light N, Champion AE. Characterization of muscle epimysium, perimysium and endomysium collagens. *Biochem J*. 1984; 219(3): 1017-26.

Lömo T, Westgaard RH, Dahl HA. Contractile properties of muscle: control by pattern of muscle activity in rat. *Proc R Soc London B*. 1974; 187: 99-103.

Lundborg G. Nerve regeneration and repair. A review. *Acta Orthop Scand*. 1987 Apr;58(2):145-69.

Lundy-Ekman L. *Neurociência: Fundamentos para a reabilitação*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000. 347p.

Mackey AL, Donnelly AE, Roper HP. Muscle connective tissue content of endurance-trained and inactive individuals. *Scand J Med Sci Sports*. 2005; 15(6): 402-8.

Michel RN, Gardiner PF. Influence of overload on recovery of rat plantaris from partial denervation. *News Physiol Sci.* 1989; 66(2): 732-40.

Mödlin M, Forstner C, Hofer C, Mayr W, Richter W, Carraro U, et al. Electrical Stimulation of Denervated Muscles: First Results of a Clinical Study. *Artif Organs.* 2005; 29(3): 203-206.

Morgan JE, Partridge TA. Muscle satellite cells. *J Biochem & Biol* 2003; 35(8): 1151-1156.

Mueller MJ, Maluf KS. Tissue adaptation to physical stress: a proposed "Physical Stress Theory" to guide physical therapist practice, education, and research. *Phys Ther.* 2002; 82(4): 383-403.

Muscatello U, Margreth A, Aloisi M. On the differential response of sarcoplasm and myoplasm to denervation in frog muscle. *J Cell Biol.* 1965; 27(1): 1-24.

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

Nix WA, Hopf HC. Electrical stimulation of regenerating nerve and its effect on motor recovery. *Brain Res.* 1983; 272(1): 21-5.

Ohira Y, Yoshinaga T, Nomura T, Kawano F, Ishihara A, Nonaka I, et al. Gravitational unloading effects on muscle fiber size, phenotype and myonuclear number. *Adv Space Res.* 2002; 30(4): 777-781.

Parry DJ, Wilkinson RS. The effect of reinnervation on the distribution of muscle fibre types in the tibialis anterior muscle of the mouse. *Can J Physiol Pharmacol.* 1990 May;68(5):596-602.

Pette D, Staron RS. Transitions of muscle fiber phenotypic profiles. *Histochem Cell Biol.* 2001; 115(5): 359-372.

Pette D, Vrbová G. What does chronic electrical stimulation teach us about muscle plasticity? *Muscle Nerve.* 1999; 22(6):666-77.

Polacow MLO, Silva CA, Guirro RRJ, Campos MR, Borges JP. Estudo morfométrico do músculo sóleo denervado de ratos tratados pela associação de metformina e estimulação elétrica. *Rev Bras Fisiot.* 2003; 7(1): 77-84.

Robinson LR. Traumatic injury to peripheral nerves. *Muscle Nerve.* 2000; 23(6): 863-73.

Robinson AJ. Instrumentação para eletroterapia. In: Robinson AJ, Snyder-Mackler L. *Eletrofisiologia clínica: eletroterapia e teste eletrofisiológico.* 2 ed. Porto Alegre: Artmed; 2001a. p. 43- 83.

Salmons S, Ashley Z, Sutherland H, Russold MF, Li F, Jarvis JC. Functional electrical stimulation of denervated muscles: basic issues. *Artif Organs*. 2005; 29(3): 199-202.

Salonen V, Lehto M, Kalimo M, Penttinen R, Aro H. Changes in intramuscular collagen and fibronectin in denervation atrophy. *Muscle Nerve*. 1985; 8(2):125-31.

Schiaffino S, Murgia M, Serrano AI, Calabria E, Pallafacchina G. How is muscle phenotype controlled by nerve activity? *Ital J Neurol Sci*. 1999; 20(6): 409-412.

Silva CA; Guirro RRJ; Polacow MLO. Efeito do fenobarbital sobre as reservas de glicogênio do músculo sóleo desnervado. *Rev Bras Fisiot*. 1998; 3(1): 35-40.

Silva CA, Guirro RRJ, Polacow MLO; Silva HC; Tanno AP; Rodrigues D. Efeito da metformina e estimulação elétrica sobre as reservas de glicogênio do músculo sóleo normal e desnervado. *Rev Bras Fisiot*. 1999; 3(2): 55-60.

Seddon HJ. Three types of nerve injury. *Brain*. 1943; 66:237-88. Apud Burnett MG, Zager EL. Pathophysiology of peripheral nerve injury: a brief review. *Neurosurg Focus*. 2004; 16(5): E1.

Skorjanc D, Traub I, Pette D. Identical responses of fast muscle to sustained activity by low-frequency stimulation in young and aging rats. *J Appl Physiol*. 1998; 85(2):437-41.

Stauber WT, Fritz VK, Dahlmann B. Extracellular matrix changes following blunt trauma to rat skeletal muscles. *Exp Mol Pathol*. 1990; 52(1):69-86.

Sunderland S. Nerve and nerve injuries. 2.ed. London: Churehill Livingston; 1978. Apud Burnett MG, Zager EL. Pathophysiology of peripheral nerve injury: a brief review. *Neurosurg Focus*. 2004; 16(5): E1.

Takala TE, Virtanen P. Biochemical composition of muscle extracellular matrix: the effect of loading. *Scand J Med Sci Sports*. 2000; 10(6): 321-325.

Tomanek RJ, Lund DD. Degeneration of different types of skeletal muscle fibres: I denervation. *J Anat*. 1973; 116(3): 395-407.

Xu JG, Tu YQ, Gu YD. Effect of electric stimulation on denervated skeletal muscle atrophy. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi*. 2003; 17(5):396-9.

Wagatsuma A, Tamaki H, Ogita F. Capillary supply and gene expression of angiogenesis-related factors in murine skeletal muscle following denervation. *Exp Physiol*. 2005; 90(3): 403-9.

Welch JA. Peripheral nerve injury. *Semin Vet Med Surg (Small Anim)*. 1996; 11(4): 273-284.

Williams PE, Catanese T, Lucey EG, Goldspink G. The importance of stretch and contractile activity in the prevention of connective tissue accumulation in muscle. *J Anat.* 1988; 158: 109-114.

Windisch A, Gundersen K, Szabolcs MJ, Gruber H, Lomo T. Fast to slow transformation of denervated and electrically stimulated rat muscle. *J Physiol.* 1998; 510 (Pt 2): 623-32.

**ANEXOS**

Comissão de Ética em Experimentação Animal  
Via Washington Luís, km. 235 - Caixa Postal 676  
Fones: (016) 3351.8109 / 3351.8110  
Fax: (016) 3361.3176  
CEP 13560-970 - São Carlos - SP - Brasil  
[propp@power.ufscar.br](mailto:propp@power.ufscar.br) - [www.propp.ufscar.br](http://www.propp.ufscar.br)

**Parecer da Comissão de Ética em Experimentação Animal nº 012/2006**

A Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de São Carlos – CEEA/UFSCar – na sua 7ª. Reunião, ocorrida em 20/06//2006, **APROVOU** o trabalho intitulado Influência da estimulação elétrica de baixa frequência sobre a reinervação muscular, elaborado por Rosana Macher Teodori, Viviane Balisardo Minamoto e Roberto de J. Guirro, procedente da Universidade Metodista de Piracicaba/FACIS. Protocolo CEEA nº 008/2006.

São Carlos, 3 de agosto de 2006.

**Prof. Dr. Nivaldo Antonio Parizotto**

Presidente da Comissão de Ética em Experimentação Animal



