

UNIVERSIDADE METODISTA DE PIRACICABA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOTERAPIA

Estudo comparativo de dois procedimentos de estimulação elétrica em  
gastrocnêmio desnervado de rato: estudo morfométrico

Quélen Milani Caierão

2006

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

QUÉLEN MILANI CAIERÃO

ESTUDO COMPARATIVO DE DOIS  
PROCEDIMENTOS DE ESTIMULAÇÃO  
ELÉTRICA EM GASTROCNÊMIO  
DESNERVADO DE RATO: ESTUDO  
MORFOMÉTRICO.

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>. Dra. Viviane Balisardo Minamoto

PIRACICABA

2006

### **Ficha Catalográfica**

Caierão, Quélen M.

Estudo comparativo de dois procedimentos de estimulação elétrica em gastrocnêmio desnervado de rato: estudo morfométrico.

75p.

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

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

1.Desnervação. 2. Estimulação elétrica. 3. Músculo esquelético.

I. Minamoto, Viviane Balisardo II. Universidade Metodista de Piracicaba,  
Programa de Pós- Graduação em Fisioterapia. III Título.

Dedico esse trabalho a todas as pessoas que de certa forma me ajudaram e incentivaram, mas principalmente aos meus pais Vilmar e Eda e ao meu irmão Gustavo pelo amor e apoio incondicional prestados mesmo estando tão longe, mas sempre presentes no coração. Obrigada!

Quélen Milani Caierão

## **AGRADECIMENTOS**

Minha profunda gratidão a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho e particularmente:

À minha orientadora Profa. Dra. Viviane pela proposta e realização desse trabalho, pela paciência, amizade, confiança, credibilidade, mas acima de tudo por compartilhar seus conhecimentos para que eu realizasse esse grande sonho. Muito Obrigada!

À minha amiga e companheira Viviane Jacintha Bolfe pela amizade, compreensão e incentivo em todos os momentos, mas também por dividir comigo a bolsa de estudos. Valeu amiga, conseguimos!

Aos alunos do curso de Fisioterapia da UNIMEP que com dedicação colaboraram com a parte experimental do trabalho e especialmente a Joice Betini pela ajuda no processamento dos dados. Todos foram importantes na realização deste trabalho. Obrigada!

À minha família pela confiança, carinho e amparo nos momentos mais difíceis, mas principalmente aos meus pais que com muita dificuldade custearam meus estudos acreditando no meu potencial e na minha realização profissional. Amo vocês.

As novas amigas que surgiram, tenho certeza não acabaram ao final desse curso e aos bons momentos que passamos juntos.

Aos meus amigos do meu querido Rio Grande do Sul obrigada pelo incentivo e pela amizade mantida.

A todos os professores que contribuíram tornando nosso trabalho mais fácil de ser realizado, mas, especialmente a Profa. Dra. Rosana M. Teodori pelos conselhos, amizade e preciosa dedicação, a Profa. Dra. Imaculada por ajudar com a parte

estatística e o Prof. Dr. Rinaldo Guirro que contribuiu imensamente com a parte da estimulação elétrica. Obrigada!

Aos membros da banca, Prof. Dr. Rúben Faria de Negrão Filho, Profa. Dra. Elaine Guirro e a Profa. Dra. Maria Luiza Polacow pelas contribuições e sugestões para melhora do trabalho. Obrigada!

Aos funcionários da secretaria de Pós-Graduação e a secretária Miriam Castro pela disponibilidade e constante dedicação.

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

Posso ter defeitos, viver ansioso e ficar irritado algumas vezes, mas não esqueço de que minha vida é a maior empresa do mundo...É que posso evitar que ela vá a falência. Ser feliz é reconhecer que vale a pena viver, apesar de todos os desafios, incompreensões e períodos de crise...É agradecer a Deus a cada manhã pelo milagre da vida...Ser feliz é não ter medo dos próprios sentimentos...É saber falar de si mesmo. É ter coragem para ouvir um "não". É ter segurança para receber uma crítica mesmo que injusta...Pedras no caminho? Guardo todas, um dia vou construir um castelo...

Fernando Pessoa

## RESUMO

Após lesão nervosa periférica ocorrem diversas alterações no músculo, entre elas proliferação do tecido conjuntivo (TC) e diminuição da área de secção transversa (AST) das fibras, o que interfere na função muscular em caso de reinervação. A estimulação elétrica (EE) é amplamente utilizada em casos de desnervação para preservação da capacidade contrátil do músculo desnervado. O objetivo deste trabalho foi comparar 2 procedimentos de EE fásica de baixa frequência: aplicação diária e em dias alternados no remodelamento de TC e AST das fibras do músculo gastrocnêmio em diferentes períodos de desnervação (10, 20 e 30 dias). Foram utilizados 55 ratos, da linhagem *Wistar*, com peso entre 180 e 250g, divididos em 5 grupos (n=5): controle (C), desnervado e analisado após 6 dias (D6); desnervado e analisado após 10, 20 e 30 dias (D10, D20 e D30), desnervado e eletroestimulado diariamente durante 10, 20 e 30 dias (EED10, EED20 e EED30), desnervado e eletroestimulado em dias alternados durante 10, 20 e 30 dias (EEA10, EEA20 e EEA30). A lesão nervosa foi realizada por esmagamento do nervo isquiático. A EE iniciou-se 24 horas após o esmagamento ( $f=10\text{Hz}$ ,  $i=5\text{mA}$ ,  $T=3\text{ms}$ ,  $t=30$  minutos). Foram realizados cortes transversais ( $12\mu\text{m}$ ) corados com H&E. As mensurações da AST e da densidade de área de TC foram realizadas por meio de analisador de imagens (Motic Advanced 3.2) e por meio de sistema de planimetria por contagem de pontos, respectivamente. Análise estatística: teste Shapiro Wilk, seguido pela ANOVA – F (One-way) e teste de Tukey (5%). Nos grupos analisados após 10 e 20 dias não houve diferença na AST entre os grupos submetidos à EE e os grupos EE com o D (10 dias: EED:  $1048 \pm 134 \mu\text{m}^2$ ; EEA:  $988 \pm 89 \mu\text{m}^2$ ; D:  $1038 \pm 197 \mu\text{m}^2$ ; 20 dias: EED:  $1579 \pm 207\mu\text{m}^2$ ; EEA:  $1394 \pm 179 \mu\text{m}^2$ ; D:  $1246 \pm 368 \mu\text{m}^2$ ). Após 30 dias, a AST de todos os grupos desnervados alcançaram valores correspondente ao grupo controle (C:  $2337 \pm 323 \mu\text{m}^2$ ; D:  $2052 \pm 430 \mu\text{m}^2$ ; EED:  $2078 \pm 203 \mu\text{m}^2$ ; EEA:  $1999 \pm 34 \mu\text{m}^2$ ). Na análise da densidade de área do TC do grupo analisado após 10 dias, observou-se que o grupo EED foi significativamente diferente do D e semelhante ao C (C:  $12 \pm 1.37\%$ ; D:  $21 \pm 5.08\%$ ; EED:  $11 \pm 2.45\%$ ). No grupo 20 dias não houve diferença quando comparado o grupo D aos grupos E, entretanto o grupo EED apresentou valor similar ao C (D:  $18 \pm 3.50\%$ ; EED:  $15 \pm 2.47\%$ ; EEA:  $17 \pm 2.70\%$ ). Após 30 dias, o grupo D apresentou diferença quando comparado ao C e ao EED (C:  $12 \pm 1.37\%$ ; D:  $15 \pm 2.83\%$ ; EED:  $11 \pm 1.59\%$ ,  $p<0.05$ ). Conclui-se que a EE não foi eficiente para minimizar a atrofia das fibras musculares. Entretanto, para o remodelamento do TC, a aplicação diária de EE trouxe mais benefícios ao músculo do que a aplicação em dias alternados, sugerindo que a quantidade de estímulo é importante para a diminuição da proliferação de TC.

**Palavras Chaves:** Desnervação, Estimulação Elétrica, Tecido Conjuntivo, Área de Secção Transversa.



## ABSTRACT

After peripheral nerve injury several changes occur in muscle, including connective tissue (CT) proliferation and decrease of fiber cross sectional area (CSA), which might impair muscle function in case of reinnervation. Electrical stimulation (ES) has been used after denervation to preserve contractile capacity in denervated muscle. The aim of this study was to compare 2 protocols of low frequency phasic ES: daily and alternate application, in different time (10, 20 and 30 days), on CT remodeling and fibers CSA of rat gastrocnemius muscle previously denervated. Fifty-five *Wistar* rats were used, weight ranging from 180 to 250g, divided into 5 groups of 5 animals each: control (C), denervated and analyzed after 6 days (D6); denervated and analyzed after 10, 20 and 30 days (D10, D20 and D30), denervated and daily electrical stimulation during 10, 20 and 30 days (DES10, DES20 and DES30), denervated and alternate electrical stimulation during 10, 20 and 30 days (AES10, AES20 and AES30). Twenty-four hours after nerve crushing, the animals were submitted to ES protocols ( $f=10\text{Hz}$ ,  $i=5\text{mA}$ ,  $T=3\text{ms}$ ,  $t=30$  minutes). Frozen cross-sections were obtained (12  $\mu\text{m}$  in thickness) and stained with H&E. Fiber CSA and CT area density were measured using the Motic Advanced 3.2 software and a planar point counting analysis system, respectively. Statistical analysis: Shapiro Wilk test, followed by ANOVA - F (One-way) and Tukey test (5%). After 10 and 20 days there was no difference in CSA between the groups submitted to ES and the ES groups when compared to the D (10 days: DES:  $1048 \pm 134 \mu\text{m}^2$ ; AES:  $988 \pm 89 \mu\text{m}^2$ ; D:  $1038 \pm 197 \mu\text{m}^2$ ; 20 days: DES:  $1579 \pm 207 \mu\text{m}^2$ ; AES:  $1394 \pm 179 \mu\text{m}^2$ ; D:  $1246 \pm 368 \mu\text{m}^2$ ). After 30 days, the AST of all denervated groups reached control values (C:  $2337 \pm 323 \mu\text{m}^2$ ; D:  $2052 \pm 430 \mu\text{m}^2$ ; DES:  $2078 \pm 203 \mu\text{m}^2$ ; AES:  $1999 \pm 34 \mu\text{m}^2$ ). Related to analysis of CT density area, it was observed that the 10-day DES group showed significantly difference when compared to D group and similar value when compared to C (C:  $12 \pm 1.37\%$ ; D:  $21 \pm 5.08\%$ ; DES:  $11 \pm 2.45\%$ ). In 20-day group there was no difference when compared D to EE groups, however, DES group showed similar value to C (D:  $18 \pm 3.50\%$ ; DES:  $15 \pm 2.47\%$ ; AES:  $17 \pm 2.70\%$ ). After 30 days, D group presented difference when compared to C and DES (C:  $12 \pm 1.37\%$ ; D:  $15 \pm 2.83\%$ ; DES:  $11 \pm 1.59\%$ ,  $p < 0.05$ ). It may be concluded that ES was not efficient to minimize the atrophy of the muscle fibers. However, related to CT remodeling, daily ES application was more efficient to muscle than application in alternated days, suggesting that the amount of stimulus is important for decreasing CT proliferation.

**Key Words:** Denervation, Electrical Stimulation, Connective Tissue, Cross Sectional Area.

## SUMÁRIO

|   |    |
|---|----|
| 1. INTRODUÇÃO.....  | 11 |
| 2. REVISÃO DA LITERATURA.....   | 14 |
| 2.1 Lesões nervosas periféricas.....                                    | 14 |
| 2.2 Características de músculo desnervado.....                          | 17 |
| 2.3 Tecido conjuntivo intramuscular.....                                | 19 |
| 2.4 A estimulação elétrica nas lesões nervosas periféricas.....         | 23 |
| 3. OBJETIVO.....  | 28 |
| 4. MATERIAL E MÉTODOS.....  | 29 |
| 4.1 Grupos experimentais.....   | 29 |
| 4.2 Procedimento para lesão nervosa.....                                | 29 |
| 4.3 Procedimento para estimulação elétrica.....                         | 32 |
| 4.4 Coleta e processamento do músculo gastrocnêmio medial.....          | 33 |
| 4.5 Coleta e processamento do nervo ciático.....                        | 33 |
| 4.6 Análise da densidade de área de tecido conjuntivo.....              | 34 |
| 4.7 Análise da área de secção transversa das fibras musculares.....     | 35 |
| 4.8 Análise dos dados.....  | 36 |
| 5. RESULTADOS.....  | 37 |
| 5.1 Esmagamento do nervo isquiático.....                                | 37 |
| 5.2 Densidade de tecido conjuntivo.....                                 | 38 |
| 5.3 Área de secção transversa das fibras musculares.....                | 42 |
| 5.4 Distribuição do número de fibras por área de secção transversa..... | 43 |
| 6. DISCUSSÃO.....   | 47 |
| 7. CONCLUSÃO.....   | 60 |
| 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....                                      | 61 |

## 1. INTRODUÇÃO

A lesão nervosa periférica é problema freqüente na prática clínica. Esse tipo de lesão tem como conseqüências alterações de sensibilidade e das habilidades motoras, condições que precisam ser recuperadas precocemente. Sendo assim, o objetivo da reabilitação é preservar as características musculares normais, evitando a degeneração da fibra muscular e mantendo a amplitude de movimento articular, assim como recuperar a função motora e a sensibilidade. O processo de regeneração nervosa é lento, o que dificulta a recuperação funcional, resultando na inatividade muscular e o estabelecimento da atrofia (Bishop, 1982; Welch, 1996; Robinson e Mackler, 2001). É conhecido que quanto menor o tempo para ocorrer a reinervação, melhor é o prognóstico funcional (Eberstein e Eberstein, 1996).

As alterações morfológicas decorrentes da desnervação envolvem diminuição da massa muscular (Jakubiec-Puka et al., 1999; Zernicka et al., 2002; Decherchi et al., 2003), diminuição da área de secção transversa das fibras (Soic-Vranic et al., 2005; Fernandes et al., 2005) e aumento do tecido conjuntivo (Salonen et al., 1985; Lu, Huang e Carlson, 1997; Purslow, 2002; Polacow et al., 2003), entre outras. Essas modificações ocorrem imediatamente após a desnervação e persistem enquanto o músculo estiver desprovido de suprimento nervoso. Caso a reinervação não ocorra em um determinado tempo, o tecido conjuntivo fibroso terá substituído os elementos contráteis do músculo, e a recuperação da função muscular torna-se impossível (Gersch, 1992).

Em lesões nervosas periféricas onde o reparo do nervo e o restabelecimento das condições funcionais do músculo são possíveis, a estimulação elétrica é usada com o objetivo de minimizar a degeneração da fibra

muscular e a fraqueza muscular durante o período em que o nervo está se regenerando (Lomo, Westgaard e Dahl, 1974; Decherchi et al., 2003).

Apesar da estimulação elétrica ser muito utilizada na reabilitação após desnervação muscular, a maioria dos estudos encontrados restringem-se à análise da estimulação elétrica crônica (caracterizada por estimulação durante longos períodos, de 8 a 24 horas, utilizando, na maioria das vezes, eletrodos implantados). Este tipo de estimulação elétrica, embora não utilizado como forma de tratamento, pode causar benefícios musculares morfológicos, histoquímicos e bioquímicos (Pette e Vrbová, 1999; Al-Majed, Brushart e Gordon, 2000; Pette et al., 2002; Marqueste et al., 2004). Por outro lado, há também relatos de que a estimulação elétrica crônica não é benéfica para a regeneração nervosa, uma vez que a mesma interfere na reinervação, retardando o retorno funcional do músculo (Lieber, 2002).

Devido a carência de estudos utilizando-se da estimulação elétrica como usada na reabilitação, torna-se importante o estudo deste recurso utilizando-se eletrodos de superfície e aplicação de estímulo durante poucos minutos por dia, em torno de de 20 a 60 minutos. Além disso, algumas questões, a respeito do uso da estimulação elétrica utilizada no processo de reabilitação, devem ser destacadas. Uma delas está relacionada com a quantidade de estímulo a qual o músculo deve ser submetido. Estudo realizado por Dow et al. (2004) mostra que número pequeno de contrações diárias não é suficiente para minimizar a atrofia. Por outro lado, número de contrações em excesso pode aumentar o dano ao tecido pelo excesso de energia aplicada ao tecido durante a estimulação elétrica. Deste modo, seria a estimulação elétrica aplicada em dias

alternados, como é comumente utilizada nas clínicas de fisioterapia, a mais adequada?

Outro aspecto que deve ser considerado é se os benefícios da estimulação elétrica são dependentes do tempo da lesão nervosa, tornando-se importante conhecer os efeitos da estimulação elétrica em diferentes fases, isto é, quando o músculo está desprovido de inervação, com início do processo de inervação e quando o mesmo músculo encontra-se parcialmente reinervado.

Assim, com o intuito de responder essas questões, este trabalho propõe-se a comparar dois procedimentos de estimulação elétrica: aplicação diária *versus* alternada, em músculo previamente desnervado. Além disso, será feita a análise dos efeitos da estimulação elétrica em diferentes tempos de desnervação.

Dessa maneira, os resultados obtidos deste estudo serão importantes para mostrar qual a melhor frequência de tratamento para recuperação do músculo, assim como qual a fase de lesão nervosa que o paciente obtém mais benefícios com o uso da estimulação elétrica.

## **2. REVISÃO DA LITERATURA**

### **2.1 Lesões nervosas periféricas**

Os nervos periféricos são extensões do Sistema Nervoso Central, responsáveis pela integração das atividades sensitivas e motoras das extremidades. Segundo Seddon (1943), citado por Burnett e Zager (2004), histopatologicamente, as lesões traumáticas dos nervos periféricos são baseadas no grau de ruptura das estruturas internas do nervo periférico e são divididas em neuropraxia, axoniotmese e neurotmese, sendo o prognóstico de recuperação dependente do grau de lesão.

A neuropraxia é a forma mais branda de lesão nervosa. Caracteriza-se pela presença de bloqueio de condução ou diminuição significativa da velocidade de condução através do segmento lesado. Entretanto, a velocidade de condução acima e abaixo da lesão permanece normal. O axônio não perde sua continuidade, sendo a recuperação rápida, completa e em poucas semanas.

A axoniotmese é uma lesão grave, caracterizada por lesão axonal e da bainha de mielina, porém, com preservação das células de Schwann e dos tubos endoneurais. Pode-se esperar a regeneração espontânea com a boa recuperação funcional.

A neurotmese é o tipo mais grave de lesão, caracterizada pela transsecção total do nervo. O prognóstico não é favorável, a menos que a continuidade do nervo seja reconstruída.

Ambas, axoniotmese e neurotmese, sofrem degeneração Walleriana distal e a severidade dos danos para o nervo pode ser averiguada por meio do exame físico e do eletrodiagnóstico (Welch, 1996). Quando a regeneração começa a ocorrer na axoniotmese, observa-se melhora da amplitude dos

potenciais motores e o surgimento dos potenciais de reinervação. Na neurotme, esses eventos não ocorrem, pois a reinervação não é possível, uma vez que não há continuidade das fibras lesadas (Robinson, 2004).

Uma outra classificação da lesão nervosa periférica foi proposta por Sunderland (1978), citado por Burnett e Zager (2004): onde cinco categorias da lesão foram apresentadas, baseadas na severidade da mesma. A lesão de primeiro e segundo graus são equivalentes a classificação de Seddon, neuropraxia e axoniotme, respectivamente. Já a lesão de grau III é caracterizada entre a axoniotme e a neurotme, ou seja, a continuidade do axônio é rompida por perda dos tubos endoneurais, mas o perineuro é preservado. Para lesões do tipo neurotme, Sunderland dividiu – as em graus IV e V, tendo por base o grau de dano às estruturas de sustentação axonal.

Nas lesões grau IV, todas as porções do nervo são interrompidas, exceto o epineuro. A recuperação só é possível com intervenção cirúrgica. Em lesões grau V, o endoneuro, o perineuro e o epineuro são completamente divididos.

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 (Evans, 2001).

As lesões nervosas periféricas podem ser realizadas experimentalmente através de diversos procedimentos, como esmagamento (compressão), transecção, estiramento e congelamento. As lesões por esmagamento são muito utilizadas, pois, permitem avaliar tanto a lesão quanto a regeneração e recuperação funcional (Mira, 1979; Dellon e Mackinnon, 1989; Bridge et al., 1994; Oliveira et al., 2001). É importante destacar que o ritmo de

regeneração do axônio após lesão por esmagamento atinge, em humanos, cerca de 1 mm por dia (Lundy-Ekman, 2000) e em ratos cerca de 4,4 mm por dia (Gutmann e Young, 1944).

A lesão por esmagamento é utilizada para o estudo da regeneração dos nervos periféricos, pois trata-se de lesão do tipo axoniotmese, onde ocorre rompimento do axônio, levando à degeneração Wallerina distal. Porém, o prognóstico é bom uma vez que há preservação das estruturas de sustentação (Robinson, 2004). Autores demonstraram que a recuperação funcional, após esmagamento do nervo isquiático de ratos, inicia-se no 4º dia após a lesão e que em torno do 20º dia já existe retorno da sensibilidade em determinados territórios (Devor et al., 1979). Entretanto, estudo de Lai et al., (1992) mostrou que, nesse tipo de lesão no nervo isquiático, a perda da condução nervosa dos músculos gastrocnêmio e sóleo de ratos persistem por mais de 2 semanas após a lesão.

Dahlin et al. (1986) analisaram os efeitos da compressão exercida sobre o nervo tibial de coelhos a fim de verificar a importância do nível de pressão e duração da compressão suficiente para provocar deterioração funcional. Os autores concluíram que a duração da compressão é importante para o grau da lesão nervosa.

Posteriormente, em 1991, Dahlin e Rydevik observaram que quando o nervo é submetido a um determinado nível de compressão ocorrem alterações no fluxo sanguíneo, na permeabilidade vascular e na ultra-estrutura das fibras nervosas, o que resulta na degeneração nervosa. O grau de lesão varia de acordo com as dimensões das fibras, sendo as maiores mais susceptíveis à compressão. Os efeitos danosos sobre as estruturas nervosas dependem, ainda, da intensidade da força aplicada e da área sobre a qual a força foi exercida.



Por fim Lunn, Brown e Perry (1990), acreditam que, com o esmagamento, tanto a microcirculação local como perineuro permanecem relativamente íntegros, o que favorece o processo de reparação.

## **2.2 Características de músculo desnervado**

Dentre os componentes do músculo esquelético, a unidade motora é o componente funcional do músculo, composta por um neurônio motor e fibras musculares por ele inervadas. Todas as fibras de uma unidade motora têm as mesmas propriedades metabólicas e de contratibilidade, implicando na existência de uma interação entre o tipo de fibra muscular e seu nervo motor. Existem diferentes tipos de unidades motoras, com diferentes características fisiológicas, estruturais e histoquímicas (Guyton e Hall, 1997). Sob condições de desnervação, as unidades motoras perdem seu controle voluntário o que impede a resposta voluntária e reflexa do órgão efetor, causando a degeneração muscular (Musacchia, Steffen e Fell, 1988; Nelson, Hayes e Currier, 2003)

Sabe-se que a desnervação resulta em paralisia flácida e atrofia severa dos músculos afetados (Salmons et al., 2005) fazendo com que as junções mioneurais degenerem-se, e as propriedades elétricas do sarcolema se alterem (Gersch, 1992). Além disso, a degeneração do axônio cessa a condução de estímulos elétricos, ficando alterada a excitabilidade elétrica dos músculos paralisados. Caso a degeneração seja prolongada, surge substituição gradual de músculo por tecido conjuntivo (TC) (Ashley et al., 2005).

Nesse sentido, o músculo esquelético sofre modificações fisiológicas, bioquímicas e morfológicas progressivas que levam a um decréscimo no diâmetro das fibras, transição do tipo de fibras, diminuição do peso muscular, diminuição da

quantidade de tensão que pode ser gerada pelo músculo e aumento no tempo requerido para sua contração (Bishop, 1982; Gersch, 1992; Kanaya e Tajima, 1992; Clemente e Barron, 1996; Deschenes, Maresh e Kraemer, 1997; Dow et al., 2006) dificultando-o de realizar suas funções de maneira normal

A atrofia muscular é muito evidente após desnervação e é resultado da diminuição da taxa de síntese e aumento da taxa de degradação das proteínas miofibrilares (Mitchell e Pavlath, 2001). Além da alteração da função muscular, a atrofia reduz a habilidade da insulina em estimular a formação de glicogênio e a atividade intrínseca dos transportadores GLUT 4, alterando o transporte e metabolismo da glicose (Silva, Guirro e Polacow, 1998).

O processo de atrofia pode variar consideravelmente entre espécies, entre indivíduos da mesma espécie, entre músculos do mesmo indivíduo e entre fibras do mesmo músculo. Assim, o peso muscular do membro do rato pode reduzir aproximadamente 50% após 2 semanas de desnervação. Já no homem, ocorre uma perda mínima do peso muscular, com conseqüente diminuição do tamanho das fibras musculares após 2 semanas (Ohira, 1989). Em lesões do tipo neuropraxia, poucas mudanças ocorrem no músculo pelo fato delas não serem graves. Porém nas lesões do tipo axoniotmese ou neurotmese essas modificações são mais acentuadas (Robinson e Mackler, 2001).

Além das alterações citadas anteriormente, a desnervação também pode provocar alteração do metabolismo do TC. Deste modo, pode ocorrer aumento do colágeno, principalmente, no endomísio e perimísio (Gulati, 1988; Polacow et al., 2003), o que pode interferir na funcionalidade do músculo após reinervação (Carter et al., 1998).

Ainda, a desnervação ocasiona redução dos capilares por fibra muscular (Borisov, Huang e Carlson, 2000). Isso pode ser evidenciado no trabalho de Wagatsuma, Tamaki e Ogita (2005) que observaram redução de 70% no número de capilares do músculo gastrocnêmio de ratos desnervados por 4 meses, quando comparado ao músculo controle.

Com relação à atividade elétrica, músculos desnervados apresentam alteração na excitabilidade da membrana. Assim, existe diminuição do potencial de repouso o que caracteriza sinal precoce de desnervação. Além disso, as fibras musculares desnervadas tornam-se hipersensíveis à acetilcolina, neurotransmissor responsável pela despolarização inicial em músculos normais (Lomo e Westgaard, 1974; Bishop, 1982; Ashley et al., 2005). Isso ocorre porque os receptores para acetilcolina, que no músculo innervado localizam-se predominantemente na região da placa motora do sarcolema, passam a ser expressos em toda a extensão da membrana das fibras desnervadas (Spielholz, 2003).

### **2.3 Tecido Conjuntivo Intramuscular**

A matriz extracelular é um substrato para adesão, crescimento e diferenciação celular, além de fornecer suporte mecânico para os tecidos. Além disso, a matriz extracelular também é responsável pela força de tensão gerada pela fibra muscular, devido a íntima relação do miofilamento contrátil com esta matriz (Chiquet, 1999).

A matriz extracelular é uma estrutura constituída por várias proteínas e polissacarídeos distribuída de forma diferente entre os vários tecidos do organismo. A constituição básica da matriz é de proteínas fibrosas como o

colágeno e elastina, e de glicoproteínas como a fibronectina e laminina, além de glicosaminoglicanas e proteoglicanas que formam um leito constituído por um gel, onde se encontram imersos todos os constituintes da matriz (Welleman, 1999; Mueller e Maluf, 2002; Kovanen, 2002).

A laminina e a fibronectina são componentes da membrana basal responsáveis por promover a adesão e proliferação do mioblasto. Enquanto a laminina promove a formação do miotubo (Podleski et al., 1979; Foster, Thompson e Kaufman, 1987; Kroll et al., 1994), a fibronectina aparece inibindo sua formação (Podleski et al., 1979).

Segundo Buck e Horowitz (1987) e Sanes, Engel e Franzini-Armstrong, (1994) as proteínas da matriz extracelular fazem parte do mecanismo de sinalização que envolve a miogênese, pois fornecem substâncias que conectam e constroem as ligações necessárias para este processo. Os principais complexos de proteínas envolvidos nesse processo são as integrinas e as glicoproteínas distrofinas.

A matriz extracelular também faz parte da composição do TC. Esse tecido desempenha papel importante na estrutura muscular, pois têm como função manter as fibras musculares unidas, contribuindo para a transmissão de força durante a contração muscular (Järvinen et al., 2002). Além disso, este tecido é responsável pela estrutura de tendões, ligamentos, ossos e músculos, constituindo o arcabouço de sustentação de quase todos os órgãos do corpo (Ahtikoski et al., 2003; Kjaer, 2004; Kjaer et al., 2005).

O tecido muscular esquelético constitui-se basicamente de elementos contráteis, sendo que existe íntima associação entre estes elementos e o TC intramuscular. Deste modo, o comportamento elástico do músculo esquelético é

determinado não só pelos componentes contráteis, mas também pelo TC intramuscular (Józsa et al., 1988).

O músculo esquelético é formado por fibras musculares alongadas e de forma cilíndrica. Cada uma dessas fibras encontra-se envolta por uma membrana de TC, denominada endomísio. Outra membrana deste tecido, o perimísio, envolve feixes de fibras musculares, sendo o músculo envolvido pelo epimísio (Purslow, 2002; Okita et al., 2004). O perimísio, devido à sua organização, é considerado a camada que mais contribui para a resistência passiva extracelular no músculo esquelético (Purslow, 2002). Além disso, está presente em maior quantidade em músculos tônicos (Borg e Caufield, 1980). A quantidade de endomísio aumenta com a idade, mas a do perimísio, e provavelmente a do epimísio, permanecem constantes ao longo da vida (Józsa et al., 1990).

Os fibroblastos são os elementos mais comuns do TC, responsáveis pela formação das fibras colágenas e outros elementos da matriz extracelular (Hinz e Gabbiani, 2003).

Atualmente são conhecidos 19 tipos de colágenos, predominando nos músculos os dos tipos I, III, IV e V (Takala e Virtanen, 2000). O colágeno tipo I é encontrado principalmente no epimísio e em menor quantidade no perimísio, sendo também localizado na pele, ossos, ligamentos e tendões (Zschabitz, 2005). Em ligamentos e tendões, o colágeno tipo I, além de transmitir força para ossos e músculos, é o principal elemento da matriz extracelular (Takala e Virtanen, 2000). As fibras do colágeno tipo I são as mais tolerantes ao estresse e apresentam alta força tênsil e limitada elasticidade, sendo, portanto, as mais adaptadas para a transmissão de força (Han et al., 1999). O colágeno tipo III predomina no perimísio e endomísio (Salonen et al., 1985) e apresenta estrutura e organização

semelhante ao do colágeno tipo I, porém suas fibras são mais elásticas e de menor espessura (Han et al., 1999) formando uma malha de fibras mais soltas e complacentes ao tecido (Lehto, Duance e Restall, 1985). As fibras de colágeno tipo IV localizam-se na membrana basal, formando um suporte para a mesma (Listrat, Picard e Geay, 1999). No endomísio encontra-se os dos tipos I, III e V (Kovanen, 2002) sendo este último encontrado em menor quantidade, representando 5% do colágeno total (Borg e Caufield, 1980).

A flexibilidade muscular é, em parte, fornecida pelo colágeno, devido à organização de suas fibras, que por sua capacidade de desenvolver força de tensão estão adaptadas à transmissão de força produzida durante a contração muscular ativa. Assim, o colágeno transmite força mecânica ao músculo fazendo parte de um sistema de tolerância ao estresse e também auxiliando na absorção de choques (Kjaer, 2004).

Nesse sentido, a arquitetura anatômica do TC depende do estresse a ele imposto (Hardy e Woodall, 1998). Dessa maneira, é preciso manter a densidade adequada desse tecido no músculo, uma vez que tanto o excesso quanto a diminuição acarretam prejuízos na função muscular. Sendo assim, estímulos como desnervação alteram a densidade desse tecido. Em músculos desnervados, as fibras colágenas podem agir como uma barreira fisiológica para o crescimento nervoso, ou seja, o acúmulo de TC interfere na troca de materiais entre o sistema vascular e as fibras musculares, além de afetar o crescimento axonal durante a reinervação (Lu, Huang e Carlson, 1997).

## **2.4 A estimulação elétrica nas lesões nervosas periféricas**

Muitas técnicas têm sido testadas e utilizadas no intuito de minimizar os eventos desencadeados pela desnervação, com destaque para a estimulação elétrica (EE).

A EE pode atuar como coadjuvante durante o processo de reabilitação, minimizando a atrofia progressiva e a fraqueza muscular (Decherchi et al., 2003; Al Amood, Lewis e Schmalbruch, 1991; Fernandes et al., 2005), o que auxilia na recuperação muscular observada tanto no período de desnervação quanto de reinervação (Carter et al., 1998).

Eberstein e Eberstein (1996) relatam que a eficácia da EE depende dos parâmetros utilizados, os quais incluem: amplitude, duração e frequência do estímulo, duração dos trens de pulso e o intervalo entre eles. Além desses parâmetros, outros fatores, tais como: nível de desnervação, diferenças nos tipos de lesão nervosa, período de desnervação e tipos de equipamentos usados também influenciam nos resultados obtidos. Assim, torna-se difícil a comparação dos efeitos da EE entre os vários estudos realizados, uma vez que não existe padronização das variáveis utilizadas entre os estudos.

Estudos encontrados na literatura, para tratamento de músculos desnervados, utilizam dois tipos de EE, crônica e fásica. A EE crônica é utilizada com frequência e envolve a utilização de eletrodos implantados no músculo, com liberação diária de pulsos de baixa frequência que variam de 8 a 24 horas (Windisch et al., 1998). Quando utilizado este tipo de EE, observa-se transição nos tipos de fibras, redução da atrofia e da densidade de área do TC. Contudo, há relatos que a EE crônica afeta o ritmo da regeneração nervosa, o que compromete a regeneração muscular. Para Lieber (2002), a EE diminui a

expressão do IGF (Fator de Crescimento Semelhante à Insulina) e de N-CAM, molécula de adesão celular que favorece o brotamento regenerativo. Durante o desenvolvimento embrionário, a expressão dessas moléculas é alta, diminuindo após esse período. Sob condição de desnervação, elas voltam a aumentar, o que sugere que a ausência da atividade elétrica é estímulo para a expressão dessas moléculas. Assim, se a EE for aplicada por tempo prolongado após a desnervação, ela poderá retardar a reinervação muscular.

Outros trabalhos utilizando diferentes espécies animais mostram que a EE crônica não tem efeito algum sobre a reinervação muscular (Girlanda et al., 1982; Herbison, Jaweed e Ditunno, 1983; Eberstein e Eberstein, 1996).

Entretanto, existem estudos de reinervação bem sucedida de músculos desnervados e eletricamente estimulados, que argumentam contra a possibilidade de que a EE crônica inibe ou não interfere na reinervação (Jansen et al., 1973; Nix, 1982; Nix e Hopf, 1983; Cole e Gardiner, 1984; Eberstein e Pachter, 1986; Valencic et al., 1986; Decherchi et al., 2003), embora os benefícios da EE são melhor observados se um padrão apropriado de estímulo for aplicado, ou seja, um padrão semelhante ao do motoneurônio normal (Eberstein e Eberstein, 1996).

Dow et al. (2004) analisaram a influência da EE crônica por 5 semanas no músculo extensor longo dos dedos (EDL) de ratos desnervados. Os autores avaliaram variados números de contrações tetânicas por dia (entre 25 e 5000). Concluíram que a frequência de 200 a 800 contrações por dia pareceu ser a mais eficaz, pois manteve a força e a massa dos músculos desnervados.

Em 2005 Dow et al., investigaram novamente o efeito da EE crônica no músculo EDL de rato desnervado por 5 semanas. Entretanto, compararam os efeitos entre 100 e 800 contrações diárias com intervalos de descanso diferentes



entre as contrações. Concluíram que 100 contrações diárias com período de 14,4 minutos de repouso entre elas foi mais efetivo para manter massa e força muscular do que quando comparado a 100 contrações distribuídas em sessões diárias de quatro horas de tratamento com duas horas de repouso entre elas.

Marqueste et al. (2006) analisaram a recuperação do tamanho das fibras e das propriedades mecânicas e histoquímicas do músculo tibial anterior após 10 semanas de desnervação. O estudo foi dividido em grupos controle, desnervado e eletroestimulados, utilizando correntes elétricas diferentes (monofásica retangular e bifásica modulada). Concluíram que ambas as correntes aplicadas mostraram melhores resultados quando comparado ao grupo não eletroestimulado.

Enquanto a maioria dos estudos experimentais utiliza a EE crônica, na prática clínica é muito usada a estimulação fásica. Esse tipo de EE geralmente utiliza eletrodos de superfície e requer tempos menores de aplicação (Hämäläinen e Pette, 1996).

Kanaya e Tajima (1992) investigaram os efeitos da EE fásica aplicada diariamente por 12 semanas ( $f= 2\text{Hz}$ ,  $T= 100\text{ms}$ ,  $t= 30\text{minutos}$  por dia) no músculo tibial anterior de ratos desnervados. Concluíram que a mesma pode reduzir a atrofia e oferecer uma melhor recuperação muscular depois da reinervação.

Silva et al. (1999) mostram que a EE recupera as condições metabólicas do músculo e, conseqüentemente, preserva as condições tróficas das fibras musculares. Isso acontece uma vez que a estimulação eleva a captação de glicose pelo músculo por meio da atividade contrátil, que promove a translocação de GLUT4, um transportador de glicose responsável pela homeostasia glicêmica da fibra muscular.

Polacow et al. (2003), estudaram os efeitos da EE fásica ( $f=10\text{Hz}$ ,  $T=3\text{ms}$ ,  $i=5\text{mA}$ , pulsos quadráticos bifásicos, ON/OFF de 2:2, 20 minutos por dia) associada a metformina sobre a morfologia e reserva de glicogênio do músculo sóleo de ratos desnervados por período de 15 dias. O estudo mostrou redução da densidade de área de tecido conjuntivo e aumento da quantidade de grânulos de glicogênio, sugerindo melhora nas condições metabólicas das fibras.

Fernandes et al. (2005) utilizando a mesma frequência, duração do pulso, intensidade e forma de onda citada por Polacow et al. (2003), analisaram os efeitos de 30 minutos de estimulação elétrica, aplicada durante 20 dias consecutivos, na morfometria do músculo sóleo de rato submetido a desnervação por esmagamento do nervo isquiático. Os autores concluíram que a estimulação aplicada minimizou tanto a atrofia das fibras musculares quanto a proliferação do tecido conjuntivo no músculo desnervado.

Em 2004 Russo et al. avaliaram, em ratos, a alteração da cronaxia, reobase e acomodação no músculo tibial anterior desnervado por neurotmesa e posteriormente submetidos a EE. Após quatro semanas, notou-se, em todos os músculos desnervados, diminuição na reobase, caracterizando hiperexcitabilidade muscular. Por fim, os autores concluíram que a EE é eficaz no tratamento de lesões nervosas periféricas.

Recentemente, Russo et al. (2006) realizaram um estudo no qual a EE fásica também foi aplicada por meio de eletrodos de superfície no músculo tibial anterior de ratos desnervados por 28 dias. Os autores verificaram mudanças com relação a expressão gênica, ou seja, no grupo que recebeu a EE os níveis de mRNA da atrogina-1, gene relacionado à degradação protéica, reduziram significativamente.

Em virtude da freqüência com que a EE é utilizada na prática clínica, considera-se importante o desenvolvimento de trabalhos que determinem sua possível influência na recuperação dos efeitos deletérios decorrentes da desnervação.

### **3. OBJETIVO**

O objetivo do presente estudo foi comparar dois procedimentos de estimulação elétrica fásica de baixa frequência, aplicação diária e em dias alternados, na morfometria do músculo gastrocnêmio em diferentes períodos de desnervação (10, 20 e 30 dias).

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Grupos experimentais

Para a realização do experimento foram utilizados 55 ratos albinos da linhagem *Wistar* (idade de 3 a 4 meses), com peso entre 180 e 250 gramas, mantidos no Biotério Central da Universidade Metodista de Piracicaba. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em grupos conforme apresentado na tabela 1. O trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de São Carlos, procedimento número 008-06.

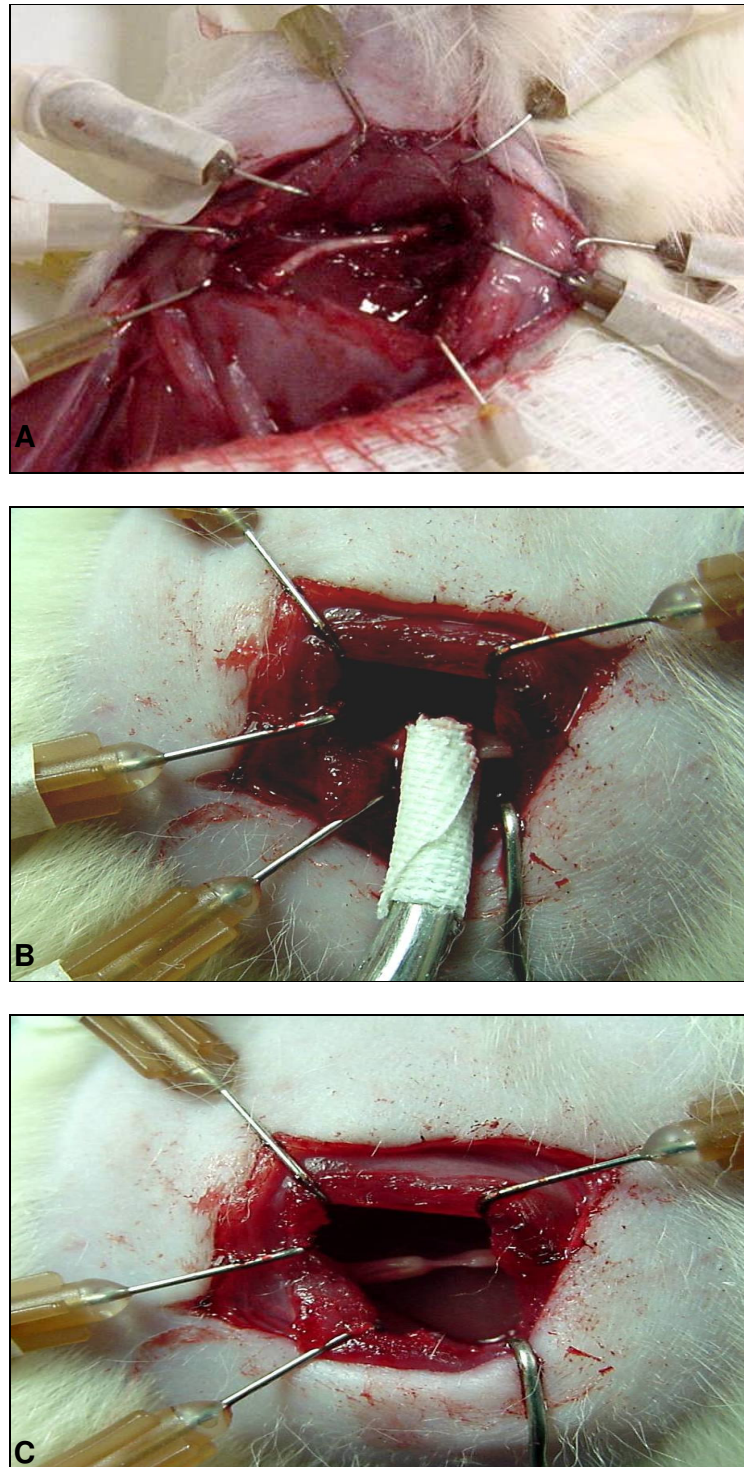
Tabela 1: Distribuição dos animais em grupos experimentais.

|     | GRUPOS   | N  |
|-----|--|----|
| I   | Controle (C)   | 5  |
| II  | Desnervado 6 dias (D6)   | 5  |
| III | Desnervado 10, 20 e 30 dias (D10, D20 e D30)   | 15 |
| IV  | Desnervado + eletroestimulado diariamente 10, 20 e 30 dias (EED10, EED20 e EED30)        | 15 |
| V   | Desnervado + eletroestimulado em dias alternados 10, 20 e 30 dias (EEA10, EEA20 e EEA30) | 15 |

### 4.2 Procedimento para lesão nervosa

Para o procedimento de esmagamento do nervo, os animais foram anestesiados com injeção intramuscular com uma mistura de Ketalar<sup>R</sup> (Cloridrato de Ketamina) 50mg/ml e Rompun<sup>R</sup> (Cloridrato de Tiazina) 2g/100ml, na proporção de 1:1, em dose de 0.3 ml/100 g de peso corporal. Foi realizada tricotomia manual e em seguida os animais foram posicionados em decúbito ventral para realização de incisão (15mm), acompanhando o trajeto do nervo isquiático. Os planos musculares foram afastados para visualização e exposição do nervo (Figura 1A),

que foi esmagado com uma pinça hemostática adaptada (Figura 1B), realizando-se quatro pinçamentos com duração de 20 segundos e intervalo de um segundo entre eles (Marques, 1992 e Fernandes et al., 2005). O pinçamento foi realizado 5mm proximal ao ponto de ramificação do nervo isquiático. Este procedimento provoca esmagamento nervoso, como pode ser observada na Figura 1C. Após esse procedimento, os planos muscular e cutâneo foram suturados com fio de algodão 6-0 (ETHICON). Cessado o efeito da anestesia, os animais foram mantidos em gaiolas plásticas individuais, em ciclo claro/escuro de 12 horas e livre acesso à ração e água. A cada 12 horas, os animais receberam uma gota de Dipirona Sódica (500mg/mL) por via oral, durante dois dias.

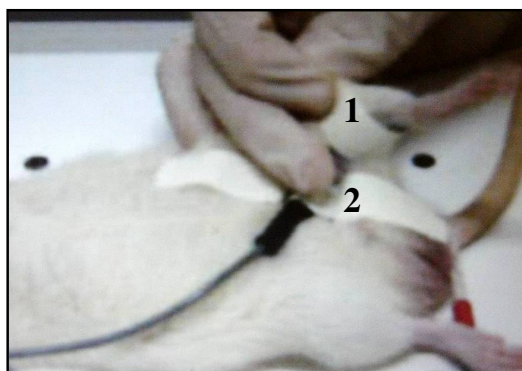


**Figura 1** - Planos musculares afastados e visualização do nervo (A); compressão do nervo isquiático com pinça hemostática (B) e aspecto macroscópico do nervo logo após esmagamento (C).

### 4.3 Procedimento para estimulação elétrica

Os animais, previamente anestesiados conforme relatado anteriormente, foram submetidos a procedimento de EE no músculo gastrocnêmio esquerdo, 24 horas após o esmagamento do nervo isquiático.

Para isso, utilizou-se dois eletrodos percutâneos auto-adesivos, com 1 cm<sup>2</sup> de área, sendo um posicionado na região inguinal e o outro sobre o músculo gastrocnêmio (Figura 2). Embora tenha sido utilizado o eletrodo auto-adesivo, em todas as sessões de estimulação elétrica foi aplicado gel na superfície do mesmo, com o objetivo de favorecer melhor acoplamento entre eletrodo e pele. A corrente elétrica foi gerada pelo equipamento DUALPEX 961 – QUARK com os seguintes parâmetros: forma de pulso quadrada bifásica simétrica, 3 ms de duração da fase, frequência de 10 Hz e amplitude de 5 mA, padronizada a partir da visualização de contração vigorosa do músculo (flexão plantar). Para evitar acomodação do músculo ao estímulo e garantir o mesmo nível de estimulação em todos os animais, foi acrescido 1 mA a cada cinco minutos, totalizando 10 mA ao final dos 30 minutos de EE.



**Figura 2** - Posicionamento dos eletrodos sobre o músculo gastrocnêmio (1) e na região inguinal (2).



Os animais eletroestimulados foram subdivididos em dois grupos:

**a) Estimulação elétrica diária:** animais foram eletroestimulados diariamente (de segunda à sexta-feira), com intervalo de 24 horas a cada estimulação, por um período de 10, 20 e 30 dias, sendo eutanasiados no período correspondente.

**b) Estimulação elétrica alternada:** animais foram eletroestimulados as segundas, quartas e sextas-feiras, por um período de 10, 20 e 30 dias, sendo eutanasiados ao final de cada período correspondente.

#### **4.4 Coleta e processamento do músculo gastrocnêmio medial**

Os ratos previamente anestesiados, conforme já relatado tiveram o músculo gastrocnêmio medial esquerdo retirado, pesado e o ventre muscular da porção medial do músculo foi preso com alfinetes em um pedaço de cortiça, sendo imediatamente resfriado em isopentano e armazenado em nitrogênio líquido para subsequente análise. Após a coleta, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical.

Para obtenção dos cortes histológicos, os músculos foram colados com "*tragacanth gum*" sobre uma placa de madeira. Todos os músculos foram seccionados em cortes transversais de 12 $\mu$ m de espessura obtidos por meio de micrótomo criostato (Ancap, Mod. 300) mantido em temperatura de  $-18^{\circ}\text{C}$ . Os cortes foram colhidos em lâminas histológicas e corados com Hematoxilina e Eosina (H&E).

#### **4.5 Coleta e processamento do nervo isquiático**

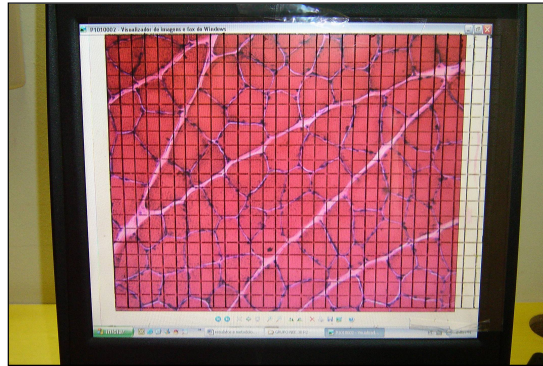
Para comprovar a efetividade do procedimento de lesão nervosa, foi realizado um grupo experimental onde o nervo esmagado foi analisado após 6

dias. Para coleta e processamento do nervo, os animais anestesiados conforme já descrito tiveram o nervo isquiático esquerdo exposto 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). Foram obtidos cortes transversais de 1µm com navalha de vidro, em Ultramicrotomo LKB, que foram corados com Azul de Toluidina a 1%, em solução aquosa de Bórax a 1%.

#### **4.6 Análise da densidade de área de tecido conjuntivo**

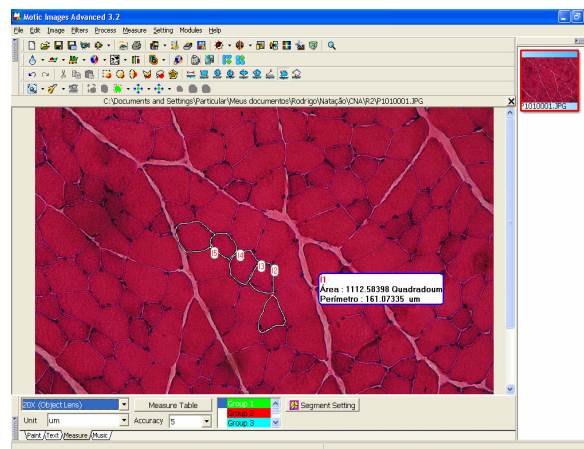
Esta análise foi realizada utilizando-se imagens obtidas através de um sistema de vídeo-impressão (microscópio óptico Olympus acoplado à Câmera digital Olympus, Mod C5050). Foram realizados cinco cortes da porção média do gastrocnêmio medial de cada músculo sendo escolhido o melhor corte, livre de artefatos e vasos sangüíneos, o qual foi fotografado e analisado em toda sua extensão na objetiva de 20x. Em seguida foi mensurada a densidade de área de TC utilizando um sistema de planimetria por contagem de pontos (Mathieu et al., 1981) o qual constava de 513 intersecções (Figura 3).



**Figura 3 - Planimetria por contagem de pontos**

#### 4.7 Análise da área de secção transversa das fibras musculares

Para análise da AST das fibras foi utilizado o mesmo corte da análise da densidade de área de TC. A escolha das fibras foi assim determinada: de cada campo fotografado foi escolhido um feixe muscular, e deste, todas as fibras foram mensuradas. Uma média de 20 feixes musculares tiveram suas fibras mensuradas, totalizando 200 fibras por músculo, conforme proposto por Chen et al (2002). A área das fibras musculares foi obtida através do software Motic Advanced 3.2, circundando-se com o *mouse* todo contorno de cada fibra. (Figura 4).



**Figura 4 - Mensuração da área do músculo gastrocnêmio**

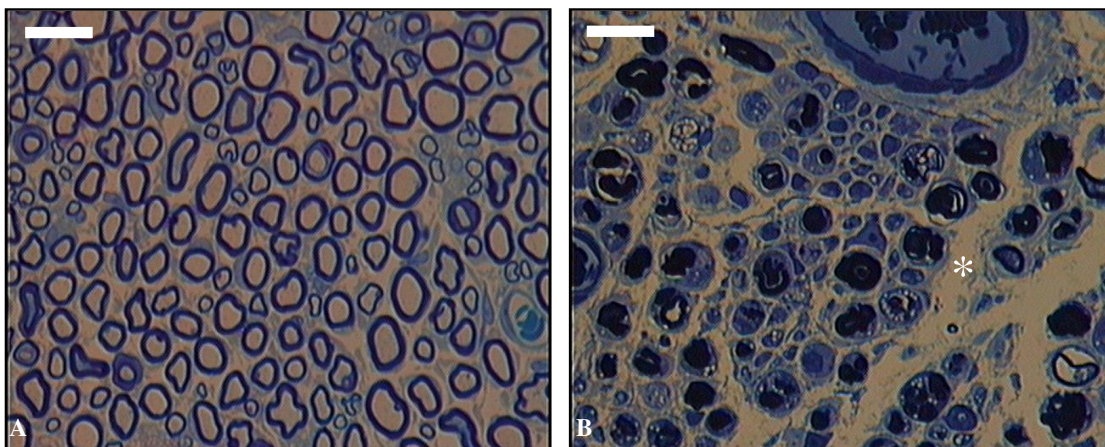
#### **4.8 Análise dos dados**

Inicialmente foi aplicado o teste Shapiro-Wilk para testar a normalidade entre os grupos. Em seguida aplicou-se o teste de Levene para verificar a homocedasticidade entre os grupos. Como todas variáveis apresentaram distribuição normal e homocedasticidade, foi aplicado o ANOVA-F (One - Way), seguido pelo teste de Tukey HSD. Em todos os cálculos foi estabelecido um nível de significância de 5%. O software utilizado para os testes estatísticos foi Statistical Package for Social Sciences for Personal Computer Windows (SPSS/PC Versão 11.0). Os valores foram expressos em média e desvio padrão.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Esmagamento do nervo isquiático

O aspecto morfológico do nervo normal é visualizado na figura 5A, onde pode ser observado a integridade dos axônios e suas respectivas bainhas de mielina. A figura 5B mostra intensa degeneração axonal e aumento da densidade de área de TC após período de 6 dias da desnervação, o que ratifica a eficácia do método de lesão nervosa utilizado neste estudo.



**Figura 5** - Fotomicrografia de corte transversal do nervo isquiático (A) nervo normal; (B) após 6 dias da lesão por esmagamento, evidenciando intenso processo de degeneração axonal e aumento da densidade de área de tecido conjuntivo (asterisco). Coloração Azul de Toluidina; Aumento: 40x, Bar=50 $\mu$ m.

## 5.2. Densidade de área de tecido conjuntivo

Após 10 dias, quando comparado o grupo D com os EE, houve diminuição de densidade de área de TC somente no grupo EED (D:  $21 \pm 5.08\%$ ; EED:  $11 \pm 2.45\%$ , EEA:  $19 \pm 2.80$ ,  $p < 0.05$ ). Além disso, não houve diferença na porcentagem de TC quando comparado o grupo EED com o C (Tabela 2; Figura 6).

Em relação aos animais analisados após 20 dias, não houve diferença quando comparado o grupo D aos grupos EE. Entretanto, os grupos D e EEA apresentaram maior densidade de área de TC quando comparado ao grupo C (D:  $18 \pm 3.50\%$ ; EEA:  $17 \pm 2.70\%$ ; C:  $12 \pm 1.37\%$ ,  $p < 0.05$ ), sendo que o grupo EED apresentou valor similar ao grupo C (Tabela 2; Figura 7).

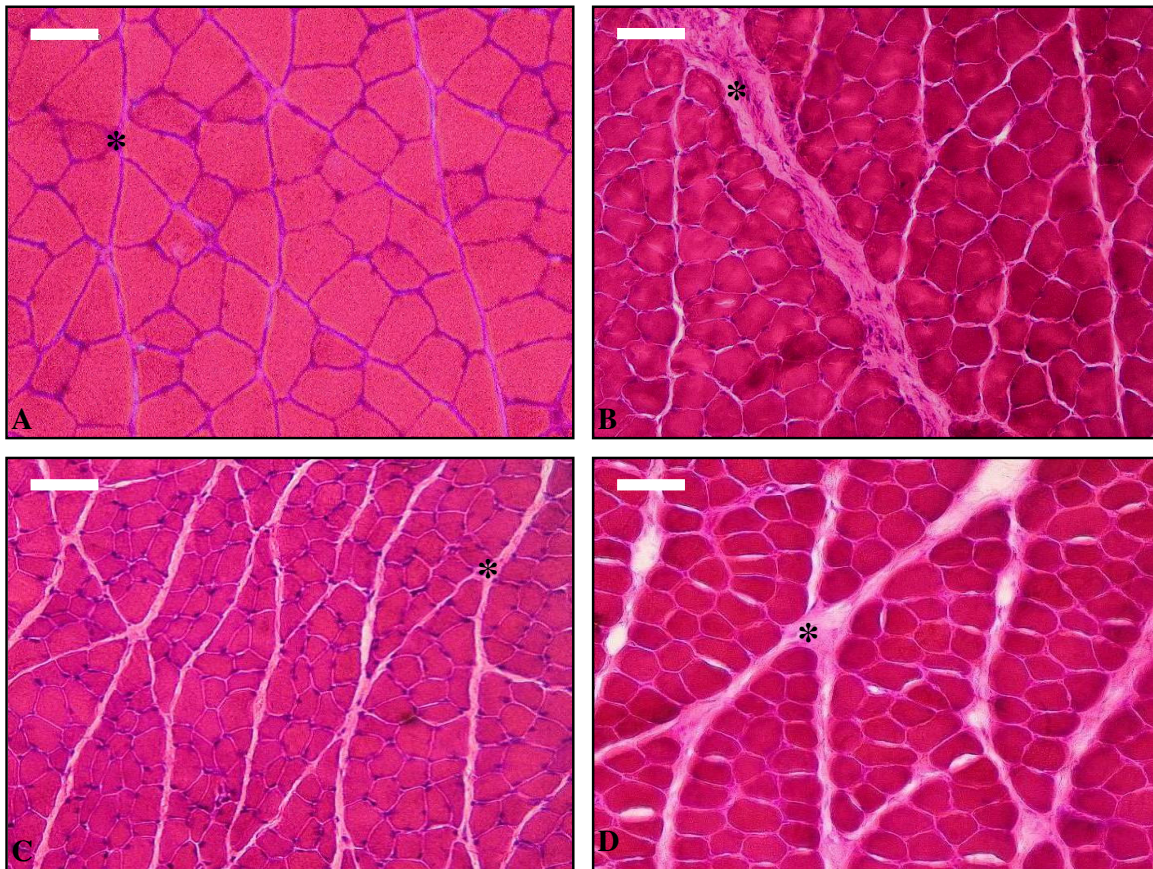
Nos animais analisados após 30 dias, foi observado que o grupo D apresentou maior densidade de área de TC quando comparado aos grupos C e ao EED (C:  $12 \pm 1.37\%$ ; D:  $15 \pm 2.83\%$ ; EED:  $11 \pm 1.59\%$ ,  $p < 0.05$ ). Além disso, não houve diferença dos grupos submetidos à EE quando comparado ao C (Tabela 2; Figura 8).

**Tabela 2:** Porcentagem de tecido conjuntivo das fibras dos grupos Controle (C), Desnervado (D), Eletroestimulado diariamente (EED) e Eletroestimulado em dias alternados (EEA) analisados após 10, 20 e 30 dias.

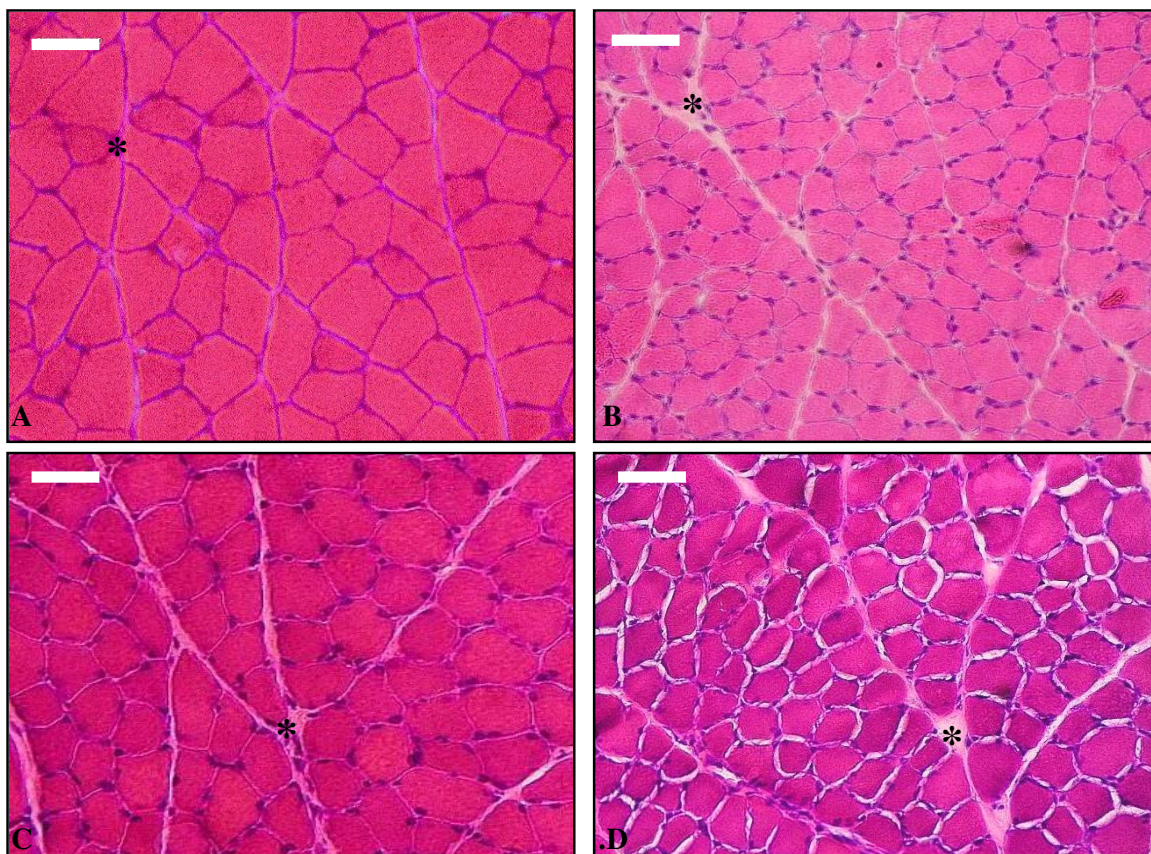
| Grupos | 10 dias             | 20 dias           | 30 dias             |
|--------|---------------------|-------------------|---------------------|
| C      | $12 \pm 1.37$       | $12 \pm 1.37$     | $12 \pm 1.37$       |
| D      | $21 \pm 5.08^{*}\#$ | $18 \pm 3.50^{*}$ | $15 \pm 2.83^{*}\#$ |
| EED    | $11 \pm 2.45$       | $15 \pm 2.47$     | $11 \pm 1.59$       |
| EEA    | $19 \pm 2.80^{*}\#$ | $17 \pm 2.70^{*}$ | $13 \pm 2.46$       |

\* quando comparado ao C; # quando comparado ao EED;  $p < 0.05$



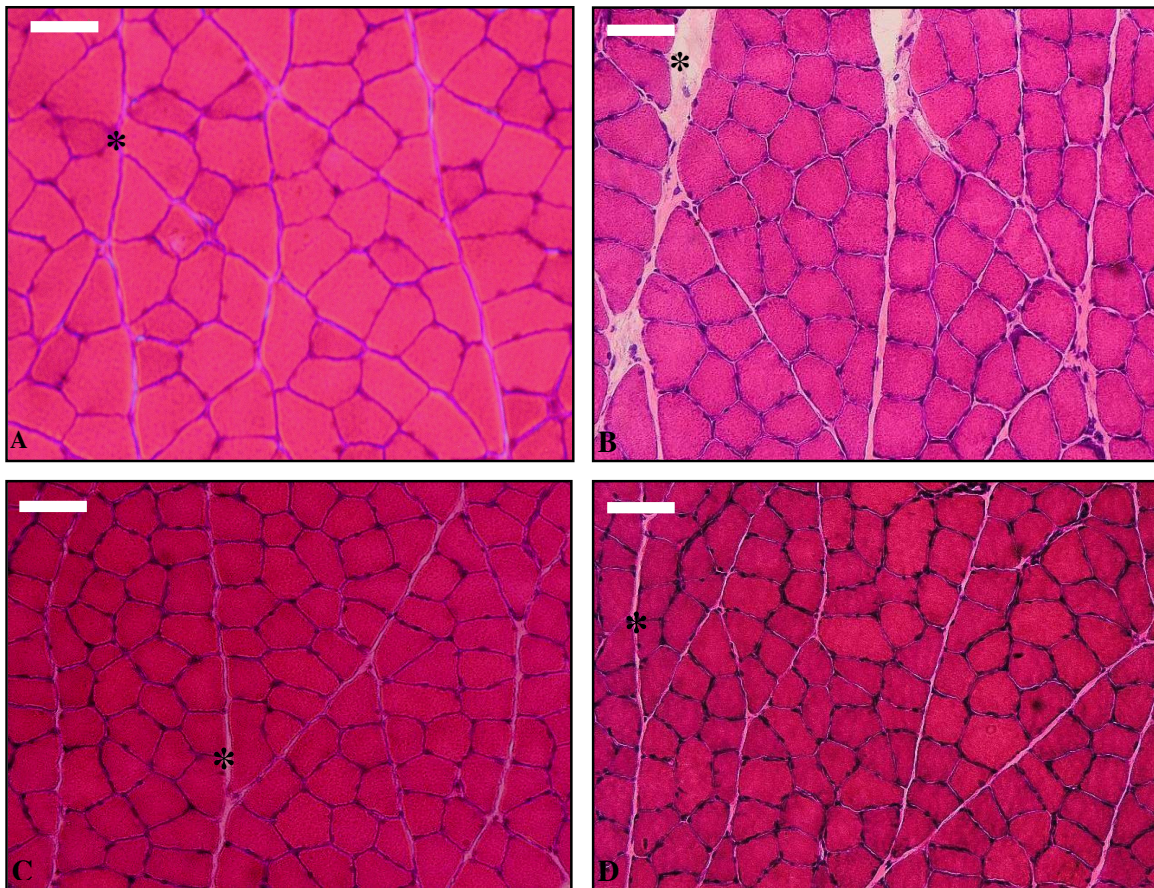


**Figura 6** - Corte transversal da porção média do gastrocnêmio medial analisado após 10 dias dos grupos Controle (A), Desnervado (B), Eletroestimulado diariamente (C) e Eletroestimulado em dias alternados (D). Observar diferença da densidade de área de tecido conjuntivo (asterisco) entre os grupos. Coloração H&E; Aumento: 20x; Bar= 50 $\mu$ m.



**Figura 7** - Corte transversal da porção média do gastrocnêmio medial analisado após 20 dias dos grupos Controle (A), Desnervado (B), Eletroestimulado diariamente (C) e Eletroestimulado em dias alternados (D). Observar diferença da densidade de área de tecido conjuntivo (asterisco) entre os grupos. Coloração H&E; Aumento: 20x; Bar= 50 $\mu$ m.





**Figura 8** - Corte transversal da porção média do gastrocnêmio medial analisado após 30 dias dos grupos Controle (A), Desnervado (B), Eletroestimulado diariamente (C) e Eletroestimulado em dias alternados (D). Observar diferença da densidade de área de tecido conjuntivo (asterisco) entre os grupos. Coloração H&E; Aumento: 20x; Bar= 50 $\mu$ m.

### 5.3 Área de secção transversa das fibras musculares

Os músculos dos grupos desnervado e desnervados + eletroestimulados durante 10 e 20 dias apresentaram diminuição da AST das fibras quando comparados ao grupo C. Tanto a EED quanto a EEA não foram eficazes para evitar a atrofia muscular, uma vez que não houve diferença entre os grupos eletroestimulados e o D (10 dias: EED:  $1048 \pm 134\mu\text{m}^2$ ; EEA:  $988 \pm 89\mu\text{m}^2$ ; D:  $1038 \pm 197\mu\text{m}^2$ ; 20 dias: EED:  $1579 \pm 207\mu\text{m}^2$ ; EEA:  $1394 \pm 179\mu\text{m}^2$ ; D:  $1246 \pm 368\mu\text{m}^2$ ; Tabela 3).

Com relação ao período de 30 dias, tanto o grupo D quanto os grupos submetidos à EE tiveram valores similares ao grupo C (C:  $2337 \pm 323\mu\text{m}^2$ ; D:  $2052 \pm 430\mu\text{m}^2$ ; EED:  $2078 \pm 203\mu\text{m}^2$ ; EEA:  $1999 \pm 34\mu\text{m}^2$ ; Tabela 3).

**Tabela 3** - Área de secção transversa ( $\mu\text{m}^2$ ) das fibras dos grupos Controle (C), Desnervado (D), Eletroestimulado diariamente (EED) e Eletroestimulado em dias alternados (EEA) analisados após 10, 20 e 30 dias.

| Grupos | 10 dias          | 20 dias          | 30 dias        |
|--------|------------------|------------------|----------------|
| C      | $2337 \pm 323$   | $2337 \pm 323$   | $2337 \pm 323$ |
| D      | $1038 \pm 197^*$ | $1246 \pm 368^*$ | $2052 \pm 430$ |
| EED    | $1048 \pm 134^*$ | $1579 \pm 207^*$ | $2078 \pm 203$ |
| EEA    | $988 \pm 89^*$   | $1394 \pm 179^*$ | $1999 \pm 347$ |

\*quando comparado ao C;  $p < 0.05$

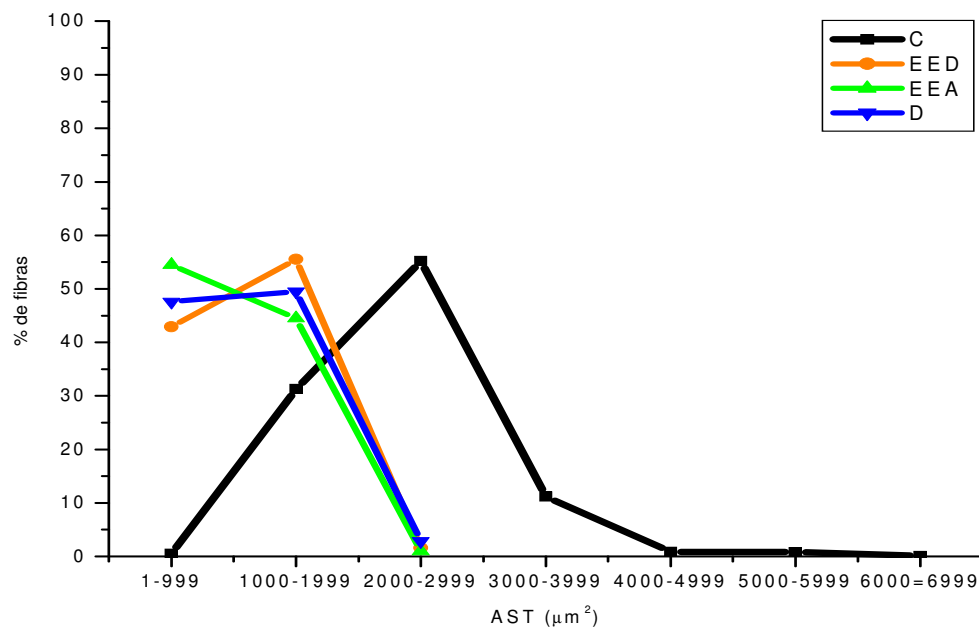
#### 5.4 Distribuição do número de fibras por AST

A maior concentração do número de fibras do grupo C encontra-se entre fibras de AST na razão de 1000 - 2999  $\mu\text{m}^2$  (86%). Por outro lado, os grupos D, EEA e EED analisados após 10 e 20 dias apresentaram maior concentração de fibras com AST na razão de 1-1999  $\mu\text{m}^2$  (84 - 99%), mostrando maior atrofia muscular nos músculos desnervados, independente da aplicação da EE (Tabela 4, Figuras 9 e 10).

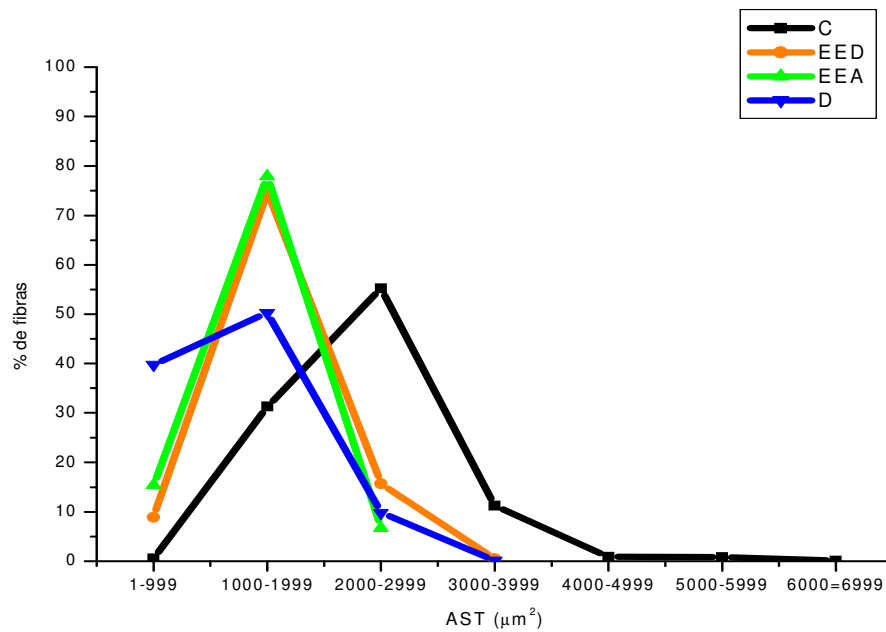
Por outro lado, os grupos D, EEA e EED analisados após 30 dias apresentaram distribuição do número de fibras por AST mais próxima à observada no grupo C, com a maior concentração entre 1000 - 2999  $\mu\text{m}^2$ , mostrando o restabelecimento da área de secção transversa das fibras (87- 92%) com o processo mais avançado de reinervação muscular (Tabela 4; Figura 11).

**Tabela 4** - Porcentagem de distribuição das fibras musculares por AST dos grupos Controle (C), Desnervado (D), Eletroestimulado diariamente (EED) e Eletroestimulado em dias alternados (EEA) analisados após 10, 20 e 30 dias.

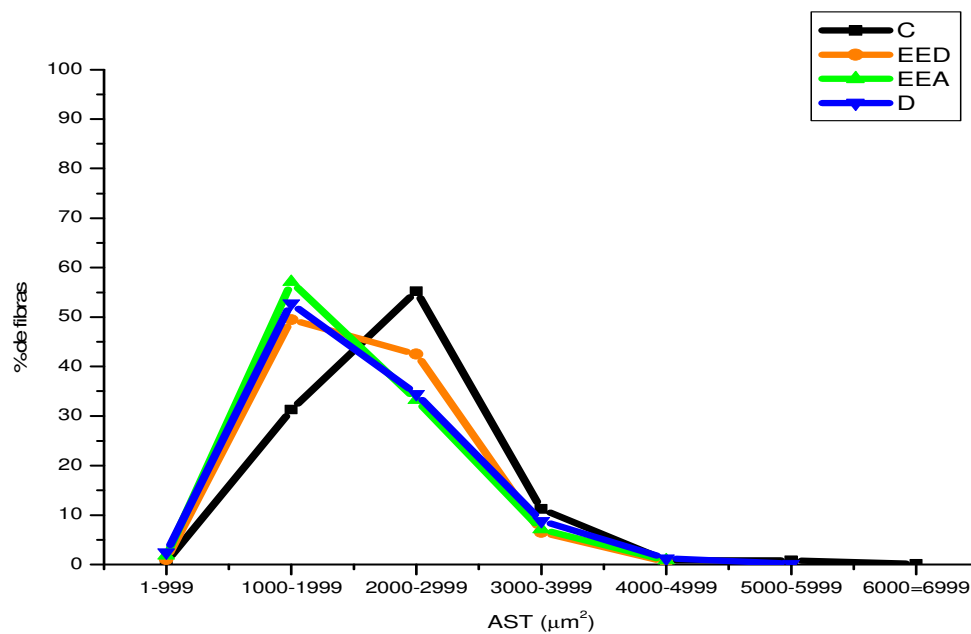
| Grupos | AST( $\mu\text{m}^2$ ) |           |           |           |           |           |           |
|--------|------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
|        | 1-999                  | 1000-1999 | 2000-2999 | 3000-3999 | 4000-4999 | 5000-5999 | 6000-6999 |
| C      | 0.5                    | 31.3      | 55.2      | 11.2      | 1         | 0.8       | 0.1       |
| D10    | 48                     | 49        | 3         | -         | -         | -         | -         |
| EED10  | 42.9                   | 55.5      | 1.6       | -         | -         | -         | -         |
| EEA10  | 54.5                   | 44.5      | 1         | -         | -         | -         | -         |
| D20    | 39.8                   | 50.3      | 9.8       | 0.1       | -         | -         | -         |
| EED20  | 8.9                    | 74.9      | 15.7      | 0.5       | -         | -         | -         |
| EEA20  | 15.4                   | 77.9      | 6.7       | -         | -         | -         | -         |
| D30    | 2.5                    | 52.8      | 34.5      | 8.8       | 1.2       | 0.2       | -         |
| EED30  | 1.0                    | 49.5      | 42.5      | 6.5       | 0.5       | -         | -         |
| EEA30  | 1.8                    | 57.1      | 33.2      | 7.1       | 0.8       | -         | -         |



**Figura 9** - Porcentagem da distribuição do número de fibras musculares por AST dos grupos Controle (C), Desnervado (D), Eletroestimulado diariamente (EED) e Eletroestimulado em dias alternados (EEA) analisadas após 10 dias.



**Figura 10** - Porcentagem da distribuição do número de fibras musculares por AST dos grupos Controle (C), Desnervado (D), Eletroestimulado diariamente (EED) e Eletroestimulado em dias alternados (EEA) analisadas após 20 dias.



**Figura 11** - Porcentagem da distribuição do número de fibras musculares por AST dos grupos Controle (C), Desnervado (D), Eletroestimulado diariamente (EED) e Eletroestimulado em dias alternados (EEA) analisadas após 30 dias.

## 6. DISCUSSÃO

### Modelo Experimental

Em relação ao modelo experimental, alguns aspectos devem ser discutidos, dentre eles: a espécie animal utilizada, o modelo de lesão nervosa, o procedimento de EE e os tempos de análise.

Diferentes espécies animais, como coelhos, camundongos, entre outros são empregados nos estudos experimentais, porém, na literatura o mais encontrado é o rato, por ser um animal de baixo custo, fácil manuseio, resistente à anestesia geral, com estrutura músculo – esquelética semelhante à de humanos. Além disso, possui um sistema nervoso indistinguível ao dos seres humanos (Bridge et al., 1994). Ainda, o nervo isquiático de ratos, por possuir fácil acesso cirúrgico (Varejão et al., 2004), é muito utilizado para o estudo da desnervação (Somazz, 1994; Crisci e Ferreira, 2002; Fernandes et al., 2005).

Nesse estudo, foi utilizado modelo de lesão nervosa do tipo axoniotmese, por ser comum indivíduos serem encaminhados à clínica de fisioterapia com este tipo de lesão. Nessas lesões as alterações musculares são acentuadas, resultando em perda da função e, conseqüentemente, atrofia muscular. Bridge et al., (1994) examinaram seis técnicas diferentes de esmagamento nervoso, procedimento freqüentemente usado para induzir lesões nervosas. Para isso utilizaram tanto a pinça cirúrgica quanto a de relojoeiro e observaram que, independente do tipo de pinça utilizada, todos os grupos apresentavam lesão do tipo axoniotmese. Como não houve diferença significativa entre as técnicas, o método de esmagamento foi considerado confiável e reproduzível como modelo de lesão nervosa.

A atividade muscular é fundamental na regulação das propriedades fisiológicas, morfológicas e bioquímicas das fibras musculares. Nesse sentido, a EE é um recurso clínico importante para o tratamento de lesões nervosas periféricas. Entretanto existe escassez de estudos utilizando procedimento clínico desse recurso após lesão nervosa.

Desse modo, o objetivo do presente trabalho foi analisar a resposta do músculo desnervado após EE, comparando dois procedimentos de EE utilizados na reabilitação. Além disso, o efeito da EE em diferentes tempos de desnervação muscular também foi analisado. Optou-se pelo modelo de EE utilizando-se eletrodos de superfície e estímulo de 30 minutos de duração, procedimento usado com freqüência na prática clínica.

A escolha dos parâmetros para a EE utilizados nesse estudo justificam-se em trabalhos previamente realizados por grupo de pesquisa da instituição, os quais foram eficazes em reduzir os efeitos deletérios no músculo esquelético desnervado (Silva et al., 1999; Polacow et al., 2003; Forti et al., 2004; Guirro et al., 2004; Fernandes et al., 2005).

A duração da fase está relacionada com os achados de Silva et al. (1999) que aplicaram a mesma duração de fase do presente estudo em lesões mais agressivas, do tipo neurotmesa, sendo que a mesma foi eficiente para desencadear contração muscular visível. Guirro e Guirro (2002) e Ashley et al., (2005) relatam que as fibras musculares desnervadas não respondem à correntes com pequenas larguras de fase, as quais seriam adequadas para músculos inervados.

A freqüência proposta, 10Hz, foi eficaz para promover contração muscular não tetânica do músculo, caracterizada pelo movimento de flexão



plantar. Reforçando a escolha da frequência, é pertinente citar o trabalho de Pachter, Eberstein e Goodgold (1982) que aplicaram em rato desnervado a mesma frequência do presente estudo no músculo EDL, que também possui características de contração rápida. Os animais receberam estímulo durante uma hora por 24 dias e os autores relatam resultados positivos com relação a AST das fibras musculares.

O tempo de 30 minutos foi escolhido pela rotina de tratamento que geralmente utiliza-se na clínica de fisioterapia. Além disso, cabe ressaltar que estudo anterior mostra que a captação de glicose corporal em ratos é agudamente aumentada em resposta a 20 minutos de EE, sendo que este aumento permanece por pelo menos 90 minutos após a finalização da estimulação (Hamada et al., 2003). Este é um dado importante, uma vez que sabe-se que a dinâmica contrátil depende não só da integridade das placas motoras mas também dos processos de captação de substratos energéticos.

Complementando os resultados obtidos em relação ao efeito da EE na captação de substrato energético, existe estudo sobre o GLUT 4 no músculo plantar de ratos após EE crônica (Etgen, Farrar e Ivy, 1993). Esses autores verificaram aumento de 82% nesses transportadores de glicose. Estudo de Silva et al., (1999) também relatam aumento expressivo das reservas de glicogênio no músculo sóleo de ratos desnervados e eletroestimulados por 15 minutos. Esses dados sinalizam a manutenção da homeostasia glicêmica das fibras musculares, o que impede a instalação da fadiga muscular.

Vale destacar que apesar da grande quantidade de estímulo que o músculo recebeu, 18.000 pulsos durante 30 minutos de EE, não foi observado sinais de lesão muscular (Figuras 6, 7 e 8), uma vez que a análise morfológica do

tecido muscular mostrou fibras com formato poliédrico e núcleos periféricos, o que caracteriza aspecto normal de fibra muscular. Assim, sugere-se que o tratamento utilizado não tenha provocado fadiga muscular devido ao aumento da captação de glicose por meio da EE.

O uso de correntes vêm sendo empregadas em músculos desnervados por apresentarem benefícios terapêuticos, como aumento do fluxo sanguíneo, normalização da temperatura, redução de edema, além de possivelmente acelerar a recuperação funcional através da manutenção das propriedades musculares (Woodcock, Taylor e Ewins, 1999). Importante destacar que a corrente bifásica, como utilizada nesse estudo, apresenta ausência de polarização, não provocando, conseqüentemente, os efeitos desencadeados por esse tipo de estímulo.

Lieber (2002), aponta diferenças importantes nos procedimentos de EE aplicado nos seres humanos quando comparado com animais, sendo que estas diferenças certamente influenciam nos resultados apresentados na literatura. Primeiramente, os estudos em animais geralmente são realizados com eletrodos implantados e nos seres humanos com eletrodos de superfície. Outro fator importante é que, em animais, alguns parâmetros, como a amplitude, geralmente são maiores do que os utilizados em humanos. Finalmente, o tipo de contração obtido pela EE é distinto entre humanos e animais: enquanto que em humanos geralmente são contrações isométricas, em animais as contrações são isotônicas.

Os tempos de análise (10, 20 e 30 dias após a desnervação) foram escolhidos pelo interesse em conhecer os efeitos da EE no músculo durante um período em que o mesmo estava sem inervação, ou seja, verificar se a EE seria eficiente para substituir a falta dessa inervação. Além disso, teve-se também o

interesse em analisar as respostas musculares no período em que a inervação inicia-se e quando o músculo já encontrava-se innervado.

Nesse sentido, os tempos de análise basearam-se nos achados de Carmignoto et al. (1983) e Gorio et al. (1983). Esses autores observaram que a em nervos submetidos à compressão, a degeneração axonal ocorre rapidamente e, 10 dias após a lesão nervosa, nenhum axônio é evidenciado no músculo. A reinervação muscular tem início após duas semanas da lesão, quando 25% das fibras musculares estão poli-inervadas, sendo que, entre 21 e 25 dias o número de terminações poli-inervadas atinge seu pico, podendo o estímulo nervoso ser liberado ao músculo. Com relação ao grupo 30 dias, o interesse foi verificar a influência da estimulação elétrica em uma fase onde a poli-inervação começa a ser substituída pela mono-inervação, o que caracteriza maturação da fibra muscular. Assim, foi possível avaliar o efeito da estimulação elétrica associada com a atividade muscular voluntária.

Estudo prévio realizado por Nix e Hopf (1983) reforça os tempos de análise escolhidos neste estudo. Os autores avaliaram algumas variáveis da regeneração nervosa (força de contração, tensão tetânica e amplitude de potencial de ação) em coelhos desnervados por quatro semanas. Os autores evidenciaram na primeira semana um decréscimo significativo nas variáveis citadas, sendo que em 30 dias, os valores estavam semelhantes ao grupo normal, mostrando que o neurônio motor voltou a restabelecer o controle da musculatura.

### **Tecido Conjuntivo**

O tecido muscular esquelético consiste predominantemente de fibras musculares que apresentam íntima relação com o TC que as envolve. Esta

relação é muito importante para a manutenção da integridade e das propriedades do músculo esquelético, dentre estas a produção de movimento e força (Jozsa, et al., 1988; Huijing, 1999; Lieber, 2002; Järvinen, et al., 2002).

A porcentagem de TC é bastante variável entre músculos, podendo variar de 1–10% dependendo do músculo avaliado (Foidart, Foidart e Engel, 1981; Lawson e Purslow, 2001). Nesse estudo, o músculo gastrocnêmio controle apresentou  $12 \pm 1.37\%$  de densidade de área de TC, o que está dentro dos valores citados na literatura.

O aumento da densidade de área do TC pode ser observado em algumas situações, tais como inatividade, desnervação e imobilização (Qin et al., 1997; Kannus et al., 1998; Järvinen, et al., 2002; Polacow et al. 2003; Fernandes et al., 2005). Deste modo, a função muscular pode ser prejudicada, pois o aumento deste tecido funciona como barreira mecânica que dificulta o suprimento sangüíneo para as fibras musculares, o que pode contribuir para a instalação da atrofia (Lu, Huang e Carlson, 1997) e prejudica o processo de reinervação muscular (Carter et al., 1998). Além disso, a densidade de área aumentada de TC faz com que as fibras colágenas tenham contato mais íntimo umas com as outras, podendo estimular a formação de ligação cruzada anormal, o que resulta em perda da extensibilidade e aumento na rigidez tecidual (Borisov, Huang e Carlson, 2000).

Sawai (1982) relata aumento de colágeno no músculo gastrocnêmio de coelho após desnervação, sendo observado fibrose decorrente do aumento na formação de fibras de colágeno imaturo, ao invés de diminuição na quantidade de proteínas musculares. O aumento expressivo de TC também foi observado 30 dias após desnervação por neurotome no músculo gastrocnêmio (Possebon et

al., 2001) e Mokrush (2002) cita que a desnervação progressiva pode levar à substituição de tecido muscular por TC e/ou tecido adiposo, comprometendo a realização das funções musculares.

Järvinen et al. (2002) citam que a quantidade de TC aumenta dramaticamente após desnervação, podendo variar de 50 – 700%. Dessa maneira, é fundamental destacar a importância da atividade contrátil para evitar a proliferação desse tecido, conforme relatado previamente por Williams et al., (1988).

Os resultados do presente estudo mostram a relação da atividade contrátil com o aumento do TC. Os animais analisados após 10 dias, quando o músculo encontra-se desprovido de inervação, apresentaram aumento de 75% de TC quando comparado ao grupo C. Após 20 e 30 dias, quando o músculo já encontra-se parcialmente inervado, este aumento é de somente 50% e 25%, respectivamente, mostrando a importância da inervação na diminuição da densidade de área de TC.

Estudos prévios mostram que este aumento de colágeno intramuscular ocorre principalmente no endomísio e perimísio, enquanto que o epimísio permanece normalmente inalterado (Salonen et al., 1985; Józsa et al., 1990). Salonen et al. (1985) observaram, após desnervação do músculo gastrocnêmio, aumento do colágeno tipos I e III no endomísio e perimísio, sendo esse aumento mais expressivo do colágeno tipo I no perimísio. Sendo assim, como o colágeno tipo I é mais “rígido” e se organiza em feixes, e o tipo III tende a formar uma rede reticular frouxa, esse aumento das fibras colágenas poderia levar à perda da elasticidade muscular, prejudicando a função em caso de reinervação. Assim, ao analisarmos as figuras 6, 7 e 8 do presente estudo, nota-se aumento da

densidade de área de TC tanto do perimísio quanto do endomísio, porém mais expressivo no perimísio.

Outro estudo que investigou as mudanças nos tipos de colágeno da matriz extracelular em músculos desnervados foi realizado por Arruda et al. (2006). Os autores perceberam grande aumento na concentração de colágeno tipos I e III após cinco semanas de desnervação.

Segundo Miller et al. (2001) o aumento da densidade de TC é consequência da atrofia das fibras musculares. A desnervação é um estado de hipofunção, assim como a imobilização. Nesse sentido Andrews et al. (2005) resumem os efeitos da inatividade sobre o TC como redução no conteúdo de água e de GAG (glicosaminoglicanas), diminuição da matriz extracelular, associada com diminuição na lubrificação entre as ligações cruzadas das fibras colágenas, redução da massa do colágeno, e aumento do ritmo de degradação e síntese do colágeno.

Diante do exposto, é importante o uso da EE com o objetivo de minimizar a proliferação do TC. Eberstein e Eberstein (1996) sugerem que o início da EE deve ser o mais breve possível, sob a justificativa de que as alterações no músculo instalam-se de forma rápida. Hooker (2004) afirma que ela deve iniciar-se imediatamente após a desnervação.

Como a falta de atividade contrátil pode alterar as propriedades musculares (Polacow et al., 2003), o presente estudo teve o interesse de analisar se a quantidade de estímulo aplicada influencia no remodelamento do TC. Os valores apresentados, na comparação entre os grupos eletroestimulados, sugere que a quantidade de estímulo é importante. Esta afirmação justifica-se, pois quando comparado ao grupo D, o grupo EED apresentou diminuição de

densidade de área de TC em 48, 17, 27%, enquanto que esses valores foram menos expressivos no grupo EEA (10, 6 e 13%), nos tempos de análise 10, 20 e 30 dias, respectivamente. Importante enfatizar que o grupo EED recebeu 50, 43 e 41% a mais de estímulo, respectivamente, para os grupos 10, 20 e 30 dias, quando comparado ao grupo EEA.

Dessa maneira, mostrou-se que, embora o estímulo elétrico aplicado 24 horas após o esmagamento foi efetivo em diminuir a quantidade de TC, esta resposta foi eficaz apenas para o grupo EED, fato observado nos 3 períodos analisados. Alguns trabalhos também obtiveram bons resultados com a EED (Spielholz, 2003; Polacow et al., 2003; Fernandes et al., 2005; Kostrominova et al. 2005), ratificando nossos achados.

A desnervação promove alterações na estrutura que fornece sustentação ao material protéico e aos sarcômeros, ou seja, os envoltórios conjuntivos (Lieber, 2002). Além disso, músculos desprovidos de inervação ficam impossibilitados de contrair. Nesse sentido, considerando que as proteínas da matriz extracelular estão relacionadas com atividade contrátil (Williams et al., 1988), quando o músculo foi solicitado à atividade induzida pela EE, possivelmente tenha ocorrido um remodelamento dessas proteínas com conseqüente diminuição da área ocupada pelo TC.

Outra hipótese para a efetividade da EE é que a mesma auxilia na organização do TC, que por sua vez auxilia na união das fibras musculares, conservando suas propriedades físicas durante a contração e permitindo que a força gerada por cada fibra individualmente atuasse sobre o músculo inteiro. Essa organização do TC tem grande significado funcional porque, na maioria das vezes, as fibras não se estendem de uma extremidade a outra do músculo, sendo

a organização do tecido indispensável para transmissão de força (Jarvinen et al., 2002).

Por fim, é relevante ressaltar que o aumento da proliferação de TC é motivo de preocupação durante o processo de reabilitação e que nesse caso, a EED aplicada nesse estudo demonstrou ser efetiva. Ainda é interessante que mais estudos envolvendo o uso de eletrodos de superfície sejam desenvolvidos para o melhor entendimento das respostas musculares frente à desnervação.

### **Área de Secção Transversa**

No início dos anos 60 o uso da estimulação elétrica direcionou-se, principalmente, para o tratamento da atrofia induzida pela desnervação (Delitto e Snyder-Mackler, 1990; Robinson e Mackler, 2001), sendo atualmente uma técnica terapêutica muito utilizada.

A atividade contrátil é importante para manter a AST dos músculos esqueléticos (Guth et al., 1981). Em relação ao músculo gastrocnêmio os valores de AST encontrados na literatura variam de 1859 a 2942 $\mu\text{m}^2$  (Rivero, Talmadge e Edgerton, 1998; Norenberg e Fitts, 2004). No presente estudo foi encontrado valor médio de 2337 $\pm$ 323 $\mu\text{m}^2$ , estando de acordo com valores de referência apresentados pela literatura. Estudos têm demonstrado que a atividade contrátil insuficiente envolve a perda de massa, força e tamanho da fibra muscular (Westgaard e Lomo, 1988; Gundersen e Eken, 1992).

A rápida perda das proteínas musculares após desnervação, ocorre, principalmente nos componentes miofibrilares, que representam 60% das proteínas do músculo (Furuno, Goodman e Goldberg, 1990). Assim, a atrofia miofibrilar é proporcional à atrofia da fibra (Engel e Stonnington, 1974). Uma das



possíveis causas da atrofia ocorre pela modificação no balanço da síntese e degradação protéica (Goldspink, 1976), supostamente já evidenciada nos primeiros dias de desnervação. Já em 1969, Goldberg pesquisou a relação síntese e degradação de proteínas após a desnervação. O autor observou que após 10 dias, o músculo sóleo sofreu intensa atrofia, com perda de 29% de suas proteínas quando comparado ao grupo C. Nesse sentido, Finol, Lewis e Owens (1981) citam que as principais mudanças ocorrem de 2 a 6 dias pós desnervação.

Tentando entender o desenvolvimento da atrofia muscular Silva, Guirro e Polacow (1998) e Silva et al., (1999) citam que a mesma está relacionada não só com alterações nas vias metabólicas, mas também com redução da ação dos fatores neurogênicos presentes na interface neuromuscular. Os autores sugerem ainda que o restabelecimento das reservas de glicogênio melhora o padrão energético das fibras, contribuindo para impedir o desenvolvimento da atrofia muscular.

A relação desnervação e atrofia muscular também pode ser observada nos resultados apresentados. No grupo D10, quando o processo de reinervação ainda não se iniciou (Gorio et al., 1983; Carmignoto et al., 1983), foi observada atrofia mais intensa, com 56% de redução da AST quando comparado ao grupo C. Com o início da reinervação na segunda semana após compressão nervosa, as fibras responderam ao início desta atividade contrátil, sendo que após 20 dias a AST apresentou valor menor do que a do grupo 10 dias, com diminuição de 47% em relação ao grupo C. Aos 30 dias, esta redução foi de 12%, não sendo este valor significativo em relação ao grupo C. Do mesmo modo, ao analisar a distribuição do número de fibras por AST, percebe-se que este grupo teve padrão de distribuição das fibras mais próximo ao C.

Resultados semelhantes foram observados por Stonnington e Engel (1973), Bobinac et al. (2000) e Zernicka et al. (2002) que avaliaram os músculos sóleo, gastrocnêmio e EDL em diferentes períodos de desnervação, e relataram intensa atrofia das fibras musculares, a qual reduziu com o passar do tempo, em decorrência do restabelecimento da inervação.

Quando aplicado os procedimentos de EE, observa-se que a atividade elétrica induzida pela EE, não contribuiu para a preservação do trofismo das fibras musculares, visto que não houve diferença na comparação dos grupos EE com os D.

Apesar dos resultados do presente estudo não mostrarem alteração da AST com o uso da EE, Fernandes et al. (2005) evidenciaram aumento significativo da AST das fibras do músculo sóleo desnervado e eletroestimulado diariamente por 20 dias. Os parâmetros de EE utilizados por Fernandes et al., (2005) foi igual ao do utilizado neste estudo, com a exceção de que naquele estudo a EE também foi aplicada durante os finais de semana, enquanto que no presente trabalho a EE foi realizada somente durante a semana. A aplicação de EE nos finais de semana significa aproximadamente 30% a mais de estímulo no músculo, fortalecendo a hipótese de que a quantidade de estímulo é importante para a hipertrofia muscular.

Outra hipótese para a divergência entre esses estudos é que os músculos analisados apresentam características distintas. O sóleo, analisado no estudo de Fernandes et al. (2005) é predominantemente lento, e o gastrocnêmio, utilizado nesse estudo, é músculo misto (Delp e Duan, 1996). Assim, músculos com características distintas podem responder de forma diferente a estímulo semelhante.

Em 1982, Pachter, Eberstein e Goodgold estudaram o efeito da estimulação elétrica por 24 dias em músculo EDL de ratos Wistar desnervado. Embora os autores tenham utilizado eletrodos implantados, a EE foi de apenas 1 hora por dia, tendo frequência de 10Hz e intensidade de 4mA. Os resultados contribuíram efetivamente para retardar a atrofia das fibras musculares, talvez porque a quantidade de estímulo foi maior naquele estudo (60 minutos/sessão) quando comparado com o presente estudo (30 minutos/sessão).

É pertinente enfatizar que mesmo que a EE não tenha sido eficiente para minimizar a perda da AST das fibras musculares, sabe-se que ela melhora o metabolismo das fibras musculares (Silva et al., 1999; Forti et al., 2004), o que contribui para manutenção do padrão energético das mesmas e favorece a contração muscular. Além disso, Williams et al. (1987) citam que quando um músculo é submetido à exercício por 30 minutos ou mais por dia existe aumento no volume de mitocôndrias, capacidade enzimática e melhor resistência à fadiga.

Em relação ao período de 30 dias, percebe-se que todos os grupos apresentaram valores de AST próximo ao C, resultado semelhante ao observado por Herbison, Jaweed e Ditunno (1981) e Rafuse e Gordon (1996). Este dado sugere que a associação da EE com a atividade muscular voluntária não causa hipertrofia das fibras musculares. Esta hipótese também é proposta por Noronha et al. (1997), Polacow et al. (2003) e Brasileiro e Salvini (2004) que afirmam que em músculos normais existe pouca evidência de que a EE proporcione benefícios para o desenvolvimento de hipertrofia muscular.

## 7. CONCLUSÃO

Com base no procedimento experimental utilizado, conclui-se que:

- A quantidade de estímulo é fundamental para o remodelamento adequado de TC, sugerindo, portanto, a aplicação diária da EE ao invés da alternada. Além disso, o efeito da estimulação elétrica neste remodelamento foi observado nas 3 fases da lesão nervosa estudada (10, 20 e 30 dias).

- A atividade contrátil voluntária é importante para o restabelecimento da AST, sendo que a EE no músculo já inervado não proporcionou efeito adicional ao aumento da área da fibra.

- Os valores de densidade de área de TC aproximam-se dos valores normais a medida que a inervação se instala. Entretanto, a EED contribui para o restabelecimento da normalização da densidade de área deste tecido.

- Sendo a desnervação uma condição freqüente para o fisioterapeuta, os resultados apresentados nesse trabalho, embora em condição experimental, fornecem subsídios para eleição de melhor tratamento fisioterapêutico.

- Futuros estudos são necessários para melhor entendimento da utilização da estimulação elétrica nas respostas musculares após lesões nervosas periféricas.

## 8. REFERÊNCIAS\*

Ahtikoski AM, Koskinen SO, Virtanem P, Kovanen V, Risteli J, Takala TES. Synthesis and degradation of type IV collagen in rat skeletal muscle during immobilization in shortened and lengthened positions. *Acta Physiol Scand*. 2003; 177(4): 473–81.

Al-Majed AA, Brushart TM, Gordon T. Brief electrical stimulation promotes the speed and accuracy of motor axonal regeneration. *Eur J Neurosci*. 2000; 20(7): 2602–8.

Al-Amood WS, Lewis DM, Schmalbruch H. Effects of chronic electrical stimulation on contractile properties of long-term denervated rat skeletal muscle [abstract]. *J Physiol*. 1991; 441: 243-56.

Andrews JR, Harrelson GL, Wilk KE. *Reabilitação física do Atleta*. 3.ed. Rio de Janeiro: Elsevie; 2005. 504p.

Arruda EM, Mundy K, Calve S, Baar K. Denervation does not change the ratio of collagen I and collagen III mRNA in the extracellular matrix of muscle *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2006; [Epub ahead of print].

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.

Bishop B. Neural Plasticity Part 3: Responses to lesions in the peripheral nervous system. *Phys Ther*. 1982; 12(9): 1275–82.

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.

Bridge PM, Ball DJ, Jackinon SE, Nakao Y, Brandt K, Hunter DA et al. Nerve crush injuries – a model for axonotmesis. *Exp Neurol*. 1994; 127(2): 284-90.

---

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

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.

Borg TK, Caufield JB. Morphology of connective tissue in skeletal muscle. *Tissue Cell.* 1980; 12(1): 197-207.

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.

Buck C, Horowitz A. Cell surface receptors for extracellular matrix molecules. *Ann. Rev. Cell Biol.* 1987; 3: 179-205.

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.

Chen CM, Stott NS, Smith HK. Effects of botulinum toxin. A injection and exercise on the growth of juvenile rat gastrocnemius muscle. *J Appl Physiol.* 2002; 3(4): 1437-47.

Chiquet M. Regulation of extracellular matrix gene expression by mechanical stress. *Matrix Biol.* 1999; 18(5): 417-26.

Clemente FR, Barron KW. Transcutaneous neuromuscular electrical stimulation effect on the degree of microvascular perfusion in autonomically denervated rat skeletal muscle. *Arch Phys Med Rehabil.* 1996; 77(2):155-60.

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.

Crisci AR, Ferreira AL. Low-intensity pulsed ultrasound accelerates the regeneration of the sciatic nerve after neurotomy in rats. *Ultrasound Med Biol.* [abstract]. 2002; 28(10):1335-41.

Dahlin LB, Danielsen N, Ehira T, Lundborg G, Rydevik B. Mechanical effects of compression of peripheral nerves [abstract]. *J Biomech Eng.* 1986; 108(2):120-2.

Dahlin LB, Rydevik B. Pathophysiology of nerve compression. In Gelberman RH. *Operative nerve repair and reconstruction.* Philadelphia: JB. Lippincott Company; 1991. p. 847-62.

Decherchi P, Dousset E, Marqueste T, Berthelin F, Hug F, Jammes Y, Grélot L. Électromyostimulation et recuperation fonctionnelle d'un muscle dénervé [abstract]. *Science & Sports.* 2003; 18(5): 253–63.

Delitto A, Snyder-Mackler L. Two theories of muscle strength augmentation using percutaneous electrical stimulation. *Phys Ther.* 1990; 70(3):158-64.

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.

Delp MD, Duan C. Composition and size of type I, IIA, IID/X, and IIB fibers and citrate synthase activity of rat muscle. *J Appl Physiol.* 1996; 80(1): 261-70.

Deschenes MR, Maresh CM, Kraemer WJ. Exercise training of moderate intensity does not abate the effects of denervation on muscle morphology [abstract] *Int J Sports Med.* 1997; 18(6): 426-30.

Devor M, Schonfeld D, Seltzer Z, Wall PD. Two modes of cutaneous reinnervation following peripheral nerve injury. *J Comp Neurol.* 1979; 185(1):211-20.

Dow DE, Carlson BM, Hassett CA, Dennis RG, Faulkner JA. Electrical stimulation of denervated muscles of rats maintains mass and force, but not recovery following grafting [abstract]. *Restor Neurol Neurosci.* 2006; 24(1): 41-54.

Dow DE, Cederna PS, Hassett CA, Kostrominova TY, Faulkner JA, Dennis RG. 39- Number of contractions to maintain mass and force of a denervated rat muscle. *Muscle Nerve.* 2004; 30(1): 77-86.

Dow DE, Faulkner JA, Dennis RG. Distribution of rest periods between electrically generated contractions in denervated muscles of rats. *Artif Organs.* 2005; 29(6): 432-5.

Eberstein A, Eberstein S. Electrical stimulation of denervated muscle: is it worthwhile? *Med Sci in Sports Exerc.* 1996; 28(12): 1463–9.

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, Stonnington HH. Trophic functions of the neuron. II. Denervation and regulation of muscle. Morphological effects of denervation of muscle. A quantitative ultrastructural study. *Ann N Y Acad Sci.* 1974; 228: 68-88.

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

Etgen GJ, Farrar RP, Ivy JL. Effect of chronic electrical stimulation on GLUT 4 protein content in fast-twitch muscle. *Am J Physiol.* 1993; 264: 816-9.

Fernandes KCBG, Polacow MLO, Guirro RRJ, Campos GER, Somazz MC, Pinto VF, et al. Análise morfométrica dos tecidos muscular e conjuntivo após desnervação e estimulação elétrica de baixa frequência. *Rev Bras Fisiot.* 2005; 9 (2): 235–41.

Finol HJ, Lewis DM, Owens R. The effects of denervation on contractile properties of rat skeletal muscle. *J Physiol.* 1981; 319: 81-92.

Foidart M, Foidart JM, Engel WK. Collagen localization in normal and fibrotic human skeletal muscle. *Arch Neurol.* 1981; 38(3): 152–7.

Forti F, Cancelliero KM, Guirro RRJ, Silva CA. Efeitos da glutamina e da estimulação elétrica sobre o perfil metabólico de músculos desnervados. *Rev. Bras. Educ. Fís. Esp.* 2004; 18(3): 273-81.

Foster RF, Thompson JM, Kaufman SJ. A laminin substrate promotes myogenesis in rat skeletal - muscle cultures- analysis of replication and development using antidesmin and anti- brdurd monoclonal antibodies. *Dev Biol.* 1987; 122: 11-20.

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.



Gersch M R. Electrotherapy in rehabilitation. Philadelphia : F A Davis company ; 1992. 413 p.

Girlanda P, Dattola R, Vita G, Oteri G, Lo Presti F, Messina C. Effect of electrotherapy on denervated muscles in rabbit: An electrophysiological and morphological study. *Exp Neurol*. 1982; 77: 483-91.

Goldberg AL. Protein Turnover in Skeletal Muscle II. Effects of denervation and cortisone on Protein catabolism in skeletal muscle. *J Biol Chem*. 1969; 244(12):3223-9.

Goldspink DF. The Effects of denervation on protein turnover of rat skeletal muscle. *Biochem J*. 1976; 156: 71-80.

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 dermatofuncional: 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 [abstract]. *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.

Gutmann E, Young JZ. The re-innervation of muscle after various periods of atrophy. *J Anatomy*. 1944; 78: 15-43.

Guth L, Kemerer VF, Samaras TA, Warnick JE, Albuquerque EX. The roles of disuse and loss of neurotrophic function in denervation atrophy of skeletal muscle. *Exp Neurol*. 1981; 73: 20-36.

Guyton AC, Hall JE. Tratado de fisiologia médica. 9.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1997. 1014p.

Hamada T, Sasaki H, Hayashi T, Moritani T, Nakao K. Enhancement of whole body glucose uptake during and after human skeletal muscle low frequency electrical stimulation. *J Appl Physiol.* 2003; 94: 2107-12.

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

Han XY, Wang W, Komulainen J, Koskinen SO, Konaven V, Vihko V et al. Increased mRNAs procollagens and key regulating enzymes in rat skeletal muscle following downhill running. *Pflugers Arch.* 1999; 437(6):857-64.

Hardy M, Woodall W. Therapeutic effects of heat, cold, and stretch on connective tissue [abstract]. *J Hand Ther.* 1998; 11(2): 148-56.

Herbison GJ, Jaweed M, Ditunno JF. Acetylcholine sensitivity and fibrillation potentials in electrically stimulated crush-denervated rat skeletal muscle [abstract]. *Arch Phys Med Rehab.* 1983; 64(5): 217-20.

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

Hinz B, Gabbiani G. Cell-matrix and cell-cell contacts of myofibroblasts: role in connective tissue remodeling. *Thromb Haemost.* 2003; 90(6): 993-1002.

Hooker DN. Correntes elétricas estimulantes. In: Prentice WE. Modalidades terapêuticas em medicina esportiva. São Paulo: Manole; 2004. p.72-117.

Huijing PA. Muscle as a collagen fiber reinforced composite: a review of force transmission in muscle and whole limb. *J. Biomech.* 1999; 32 (4): 329-45.

Jakubiec-Puka A, Ciechomska I, Morga J, Matusiak A. Contents of myosin heavy chains in denervated slow and fast rat leg muscles. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol - Part B.* 1999; 122(3): 355-62.

Jansen JKS, Lomo T, Nicolaysen K, Westgaard RH. Hyperinnervation of skeletal muscle fibers: dependence of muscle activity. *Science.* 1973; 181(99): 559-61.

Järvinen TA, Józsa L, Kannus P, Järvinen TL, Järvinen M. Organization and distribution of intramuscular connective tissue in normal and immobilized skeletal muscles. *J Muscle Res Cell Motil.* 2002; 23(3): 245–54.

Józsa L, Thöring J, Järvinen M, Kannus P, Lehto M, Kvist M. Quantitative alterations in intramuscular connective tissue following immobilization: An experimental study in the rat calf muscles. *Exp Mol Pathol.* 1988; 49(2): 267–78.

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; (283): 296-301.

Kannus P, Józsa L, Kvist M, Järvinen T, Järvinen M. Effects of immobilization and subsequent low- and high-intensity exercise on morphology of rat calf muscles. *Scand J Méd Sci Sports.* 1998; 8(3): 160–71.

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

Kjaer M. Role of extracellular matrix in adaptation of tendon and skeletal muscle to mechanical loading. *Physiol Rev.* 2004; 84: 649-98.

Kjaer M, Langberg H, Miller Bf, Boushel B, Crameri R, Koskinen S et al. Metabolic activity and collagen turnover in human tendon in response to physical activity. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2005; 5(1): 41-52

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.

Kroll TG, Peters BP, Hustad CM, Jones PA, Killen PD, Ruddon RW. Expression of laminin chains during myogenic differentiation. *J Biol. Chem.* 1994; 269: 9270-77.

Lai KS, Jaweed MM, Seestead R, Herbison GJ, Ditunno JF Jr, McCully K et al. Changes in nerve conduction and Pi/Pcr ratio during denervation-reinnervation of the gastrocnemius muscles of rat. *Arch. Phys. Med. Rehabil.* 1992; 73(12): 1155-9.

Lawson MA, Purslow PP. Development of components of the extracellular matrix, basal lamina and sarcomere in chick quadriceps and pectoralis muscle. *Br Poultry Sci.* 2001; 42: 315-20.

Lehto M, Duance VC, Restall D. Collagen and fibronectin in a healing skeletal muscle injury: an immunohistochemical study of the effects of physical activity on the repair of injured gastrocnemius muscle in the rat. *J Bone Joint Surg.* 1985; 67(5): 820-8.

Lieber RL. *Skeletal muscle structure, function, & plasticity: the physiological basis of rehabilitation.* 2. ed. Philadelphia Lippincott, USA; 2002. 448p.

Listrat A, Picard B, Geay Y. Age-related changes and location of type I, II, IV, V and VI collagens during development of four foetal skeletal muscles of double-muscled and normal bovine animals. *Tissue Cell.* 1999; 31(1): 17-27.

Lomo T, Westgaard RH, Dahl HA. Contractile properties of muscle: control by pattern of muscle activity in the rat. *Proc. R. Soc. Lond B Biol Sci.* 1974; 187(1086): 99–103.

Lomo T, Westgaard RH. Further studies on the control of ACh sensitivity by muscle activity in the rat. *J Physiol.* 1975; 252(3):603-26.

Lu DX, Huang SK, Carlson BM. Electron microscopic study of long-term denervated rat skeletal muscle. *Anat Rec.* 1997; 248(3): 355–65.

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

Lunn ER, Brown MC, Perry VH. The pattern of axonal degeneration in the peripheral nervous system varies with different types of lesion. *Neurosci.* 1990; 35: 157-65.

Marques MJ. *Estudo ultra-estrutural da junção neuromuscular após regeneração nervosa no interior de próteses tubulares.* São Paulo, 1992. 139p [Tese]. São Paulo – USP; 1992.

Marqueste T, Alliez JR, Alluin O, Jammes Y, Decherchi P. Neuromuscular rehabilitation by treadmill or electrical stimulation after peripheral nerve injury and repair [abstract]. *J Appl Physiol*. 2004; 96(5): 1988-95.

Marqueste T, Decherchi P, Desplanches D, Favier R, Grelot L, Jmmes Y. Chronic electrostimulation after nerve repair by self-anastomosis: effects on the size, the mechanical, histochemical and biochemical muscle properties [abstract]. *Acta Neuropathol*. 2006; 111(6): 589-600.

Mathieu O, Cruz-Orive LM, Hoppeler H, Weibel ER. Measuring error and sampling variation in stereology: comparison of the efficiency of various methods for planar image analysis. *J Microsc*. 1981; 121(1): 75–88.

Miller TA, Lesniewski LA, Muller-Delp JM, Majors AK, Scalise D, Delp MD. Hindlimb unloading induces a collagen isoform shift in the soleus muscle of the rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2001; 281(5):1710-7.

Mira JC. Quantitative studies of the regeneration of rat myelinated nerve fibres: variations in the number and size of regenerating fibers after repeated localized freezings [abstract]. *J Anat*. 1979; 129 (Pt1):77-93.

Mitchell PO, Pavlath GK. A muscle precursor cell-dependent pathway contributes to muscle growth after atrophy. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2001; 281(5): 1706-15.

Mokrusch T. MRI-changes of skeletal muscle after denervation and LIB electrical stimulation. *Basic Appl Myol*. 2002; 12(6): 273-6.

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.

Musacchia XJ, Steffen JM, Fell RD. Disuse atrophy of skeletal muscle animal models. *Exerc Sport Sci Rev*. 1988; 16: 61–87.

Nelson RM, Hayes kW, Currier DP. *Eletroterapia clínica*. 3. ed. São Paulo: Manole; 2003. 578 p.

Nix WA. The effect of low-frequency electrical stimulation on the denervated extensor digitorum longus muscle of the rabbit. *Acta Neurol Scand*. 1982; 66(5): 521-8.

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

Norenberg KM, Fitts RH. Contractile responses of the rat gastrocnemius and soleus muscles to isotonic resistance exercise. *J Appl Physiol.* 2004; 97: 2322–32.

Noronha MA, Camargo LC, Minamoto VB, Castro CES, Salvini TF O efeito da estimulação elétrica neuromuscular (NMES) no músculo tibial anterior do rato. *Rev. Bras. Fisiot.* 1997; 2(2): 71-6.

Ohira Y. Effects of denervation and deafferentation on mass and enzyme activity in rat skeletal muscles. *Jpn J Physiol.* 1989; 39(1): 21-31.

Okita M, Yoshimura T, Nakamo J, Motomura M, Eguchi K. Effects of reduced joint mobility on sarcomere length, collagen fibril arrangement in the endomysium, and hyaluronan in rat soleus muscle. *J Muscle Res Cell Motil.* 2004; 25(2):159-66.

Oliveira EF, Mazzer N, Barbieri CH, Selli M. Correlation between functional index and morphometry to evaluate recovery of the rat sciatic nerve following crush injury: experimental study. *J Reconstr Microsurg.* 2001; 17(1): 69-75.

Pachter BR, Eberstein A, Goodgold J. Electrical stimulation effect on denervated skeletal myofibers in rats: a light and electron microscopic study. *Arch Phys Med Rehabil.* 1982; 63: 427-30.

Pette D, Sketelj J, Skorjanc D, Leisner E, Traub I, Bajrovic, F. Partial fast-to-slow conversion of regenerating rat fast-twitch muscle by chronic low-frequency stimulation [abstract]. *J Muscle Res Cell Motil.* 2002; 23(3): 215-21.

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

Podleski TR, Greenberg I, Schlessinger J, Yamada KM. Fibronectin delays the fusion of L6 myoblasts. *Exp. Cell Res.* 1979; 122(2): 317- 26.

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

Possebon S, Iorczeski R, Giacomini AC, Giacomini FL, Haas VR. Efeitos do treinamento físico e da creatina magnésio em músculos desnervados de ratos. *Rev Med HSVP*. 2001; 13(29): 16-21.

Purslow PP. The structure and functional significance of variations in the connective tissue within muscle. *Comp Biochem Physiol*. 2002; 133(4): 947-66.

Qin L, Appell HJ, Chan KM, Maffulli N. Electrical stimulation prevents immobilization atrophy in skeletal muscle of rabbits. *Arch Phys Med Rehabil*. 1997; 78(5): 512-7.

Rafuse VF, Gordon T. Self-reinnervated cat medial gastrocnemius muscles. II. analysis of the mechanisms and significance of fiber type grouping in reinnervated muscles [abstract]. *J Neurophysiol*. 1996; 75(1): 282-97.

Rivero JLL, Talmadge RJ, Edgerton VR. Fibre size and metabolic properties of myosin heavy chain-based fibre types in rat skeletal muscle. *J Muscle Res Cell Motil*. 1998; 19: 733-42.

Robinson LR. Traumatic injury to peripheral nerves. *Suppl Clin Neurophysiol Muscle Nerve*. 2004; 57: 173-86.

Robinson AJ, Mackler LS. *Eletrofisiologia clínica – Eletroterapia e testes eletrofisiológicos*. 2.ed. Porto Alegre: Artmed; 2001. 426p.

Russo TL, Franca CN, Castro CES, Salvini T F. Alterações da cronaxia, da reobase e da acomodação no músculo esquelético desnervado submetido a estimulação elétrica. *Rev. Bras. Fisioter*. 2004; 8(2):169-75.

Russo TL, Peviani SM, Freria CM, Gigo-Benato D, Geuna S, Salvini TF. Electrical stimulation based on chronaxie reduces atrogen-1 and myoD gene expressions in denervated rat muscle. *Muscle Nerve*. 2007; 35: 87-97.

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.

Sanes JR, Engel AG, Franzini-Armstrong, C. The extracellular matrix. In: Engel L, AG. Myology - Basic and Clinical, 2. ed. New York: McGraw-Hill; 1994. 958p.

Sawai H. Collagen metabolism of skeletal muscles following injuries of the peripheral nerves [abstract]. Nippon Seikeigeka Gakkai Zasshi. 1982; 56(8):753-64.

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.

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 meftormina e estimulação elétrica sobre as reservas de glicogênio do músculo sóleo normal e denervado. Rev Bras Fisiot. 1999; 3(2): 55-60.

Soic-Vranic T, Bobinac D, Bajek S, Jerkovic R, Malnar-Dragojevic D, Nikolic M. Effect of salbutamol on innervated and denervated rat soleus muscle. Braz J Med Biol Res. 2005; 38(12):1799-805.

Somazz MC. Reparo da lesão de nervo isquiático através de autotransplante de músculo esquelético em ratos: retalho obtido com injeções intramusculares de anestésicos locais [tese]. Piracicaba: UNICAMP; 1994.

Spielholz NI. Estimulação elétrica de músculo desnervado. In: Nelson RM, Hayes KW, Currier DP. Eletroterapia clínica. 3. ed. São Paulo: Manole; 2003. p. 411-46.

Stonnington HH, Engel AG. Normal and denervated muscle. A morphometric study of fine structure. Neurology. 1973; 23(7): 714-24.

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): 321-5.



Valencic V, Vodovnik L, Stefancic M, Jelnicar T. Improved motor response due to chronic electrical stimulation of denervated tibialis anterior muscle in humans. *Muscle Nerve*. 1986; 9(7): 612-7.

Varejão ASP, Cabrita AM, Meek MF, Bulas-Cruz J, Melo-Pinto P, Raimondo S et al. Functional and morphological assessment of a standardized rat sciatic nerve crush injury with a non-serrated clamp. *J Neurotrauma*. 2004; 21(11):1652-70.

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

Welch JA. Peripheral nerve injury. *Seminars in Veterinary Medicine and Surgery (Small Animal)*. 1996; 11(4): 273–84.

Welleman SG. The role of the extracellular matrix in skeletal muscle development. *Poult Sci*. 1999; 78(5):778-84.

Westgaard RH, Lomo T. Control of contractile properties within adaptive ranges by patterns of impulse activity in the rat. *J Neurosci*. 1988; 8(12): 4415-26.

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: 109–14.

Williams RS, Molt MG, Mellor J, Salmons S, Harlan W. Adaptation of skeletal muscle to increased contractile activity. Expression of nuclear genes encoding mitochondrial proteins. *J Biol Chem*. 1987; 262(6): 2764-7.

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(2): 623-32.

Woodcock AH, Taylor PN, Ewins DJ. Long pulse biphasic electrical stimulation of denervated muscle. *Artif Organs*. 1999; 23(5): 457-9.

Zernicka E, Smol E, Langfort J, Gorecka M. Time course of changes in lipoprotein lipase activity in rat skeletal muscles during denervation-reinnervation. *J Appl Physiol*. 2002; 92(2): 535-40.

Zschabitz A. Structure and behavior of tendons and ligaments [abstract].  
Orthopade. 2005; 34(6): 516-25.

