ELIZABETH SABATER ALVES

**Efeito do uso da estimulação elétrica muscular durante o
processo de reparação tecidual graus distintos
de axonotmese experimental do nervo ciático de ratos**

**Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências**

**Programa: Fisiopatologia Experimental
Orientadora: Profa. Dra. Elia Garcia Caldini**

SÃO PAULO

2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Sabater-Alves, Elizabeth

Efeito do uso da estimulação elétrica muscular durante o processo de reparação
tecidual de graus distintos de axonotmese experimental do nervo ciático de ratos /
Elizabeth Sabater Alves. -- São Paulo, 2012.

**Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.**

Programa de Fisiopatologia Experimental.
Orientadora: Elia Garcia Caldini.

Descritores: 1.Traumatismos dos nervos periféricos 2.Denervação muscular
3.Estimulação elétrica 4.Biomecânica 5.Ratos

USP/FM/DBD-109/12

*Aos meus pais, Laneluci e Edmon,
que sempre me apoiaram com todo
carinho e amor;*

*Ao meu irmão, Vinicius, por toda
paciência e sabedoria;*

*Aos meus avós, Geni e Luiz, por todo
o apoio;*

*Ao meu noivo, Eberton, por toda
paciência e compreensão.*

AGRADECIMENTOS

À Profa. Elia Caldini, chefe do Laboratório de Biologia Celular, minha orientadora que com toda paciência e compreensão me ensinou, pela sua disponibilidade de tempo e por todo o seu carinho.

À Profa. Maria Cristina Balejo Piedade, que me acompanha com todo carinho e compreensão desde a graduação e que me auxiliou em todos os momentos para a realização deste trabalho. Sem você não teria conseguido realizar esse grande projeto, assim como tenho certeza que não teria tanto amor pela nossa profissão; muito obrigada por seu exemplo, amor, carinho; muito obrigada por estar sempre ao meu lado.

À Dra. Mariana Matera Veras, pesquisadora do Laboratório de Poluição Atmosférica Experimental da FMUSP, pelos ensinamentos, estímulo, compreensão, sabedoria e muita paciência em todas as etapas desse trabalho.

Ao Dr. Marcelo Alves Ferreira, pesquisador do Laboratório de Biologia Celular da FMUSP, pelo apoio e assistência na parte estatística do trabalho.

Ao Mestre Cesar Augusto Martins Pereira, do Laboratório de Biomecânica da FMUSP, por todo ensinamento e pelo tempo despendido nos experimentos.

À Iris Amorim, técnica do Laboratório de Biologia Celular da FMUSP, pelo grande auxílio na parte prática do projeto.

À Daiane Barbosa, aluna de graduação da Universidade São Judas, pelo auxílio e disponibilidade para me ajudar com os animais e com os testes.

A todos os colegas que frequentavam o Laboratório de Biologia Celular no período dos experimentos; muito obrigada pela compreensão e auxílio.

A todos da Secretaria do Laboratório de Biologia Celular, por todo apoio técnico, teórico e emocional.

À Tânia Regina Souza, secretária do Programa de Pós-graduação Fisiopatologia Experimental, que em todos os momentos esteve disponível e me auxiliou com carinho, compreensão, sempre com um lindo sorriso. Você não é capaz de imaginar o quanto foi importante sua presença durante este trabalho.

A minha família por todo carinho, apoio, amor, sabedoria em todos os momentos.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS, SIMBOLOS E SIGLAS	i
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE TABELAS	iv
LISTA DE GRÁFICOS	v
RESUMO	vi
ABSTRACT	viii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Aspectos gerais da contração voluntária e eletricamente eliciada do músculo esquelético	1
1.2. Bases morfológicas e funcionais das lesões nervosas periféricas	3
1.3. Biomecânica	9
1.3.1 Propriedades de materiais baseadas em diagramas de testes de tração .	9
1.3.2 Propriedades biomecânicas do tecido muscular esquelético	10
1.4. Tratamento das lesões nervosas periféricas	11
1.5. Papel da estimulação elétrica nas lesões nervosas periféricas	14
1.6. Estereologia	17
2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS GERAIS E ESPECÍFICOS	20
3. MATERIAIS E MÉTODOS	22
3.1. Animais	22
3.2. Grupos	22
3.3. Procedimento cirúrgico para lesão do nervo ciático	24
3.4. Exame Eletrodiagnóstico e Protocolo de Tratamento	26
3.5. Eutanásia	29
3.6. Estudo histológico	30
3.6.1 Coleta e Fixação do Material	32
3.6.2 Amostragem estereológica	32
3.6.3 Processamento do material para histologia e método de identificação	33
3.6.4 Análise estereológica grau de degeneração-regerenação das fibras musculares	35
3.6.5 Análise estereológica grau de atrofia muscular	37
3.6.5.1 Grau de atrofia muscular como um todo	37
3.6.5.2 Grau de atrofia das fibras tipo I e tipo II	38
3.7. Estudo biomecânico	38
3.8. Análise da marcha	42
3.9. Análise estatística	44
4. RESULTADOS	45
4.1. Complicações cirúrgicas e avaliação do material obtido	45
4.2. Estudo biomecânico	
4.2.1. Tensão máxima	
4.2.2. Rigidez	
4.2.4. Deformação Relativa Percentual	
4.3. Estudo da marcha	
5. DISCUSSÃO.....	
6. CONCLUSÕES.....	
7. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	

LISTA DE ABREVIATURAS, SIMBOLOS E SIGLAS

Lista de abreviaturas, símbolos e siglas

UM - Unidade motora

Ach - Acetilcolina

LNP - Lesão nervosa periférica

DW - Degeneração Walleriana

IGF-I - Fator de crescimento

l_f - Comprimento final

l_i - Comprimento inicial

N - Newton

mm - Milímetro

EE - Estimulação elétrica

Vv – Densidade de volume

Lv- Densidade de comprimento

Sv – Densidade de superfície

Nv- Densidade numérica

A_A – Densidade de área

N_A – Densidade numérica por área

8 L – Grupo 8 dias após lesão leve sem tratamento

8 LT_ Grupo 8 dias após lesão leve tratado com estimulação elétrica

8 S – Grupo 8 dias após lesão severa sem tratamento

8 ST- Grupo 8 dias após lesão severa tratado com estimulação elétrica lesão

30 L – Grupo 30 dias após lesão leve sem tratamento

30 LT – Grupo 30 dias após lesão leve tratado com estimulação elétrica

30 S - Grupo 30 dias após lesão severa sem tratamento

30 ST – Grupo 30 dias após lesão severa tratado com estimulação elétrica

TON - Tempo *On*

TOFF – Tempo *OFF*

HE – Hematoxilina-eosina

PSH – Picrosírius-hematoxilina

Vm – Volume absoluto do Músculo tibial anterior

g/cm³ - Gramas por centímetro cúbico

Vv Tecido muscular - Células musculares – Fração de volume ocupado pelas células musculares.

$\Sigma P_{\text{tecido muscular}}$ – Somatória de pontos incidentes nas células musculares

ΣP_M - Somatória de pontos incidente em toda imagem histológica

$V_{\text{absoluto células musculares}}$ – Volume absoluto de fibras musculares

$V_{\text{médio célula muscular}}$ – Volume médio das células musculares

Tmax – Tensão máxima

KPa – KiloPascal

Rig – Rigidez

N/mm – Newton por milímetro

Drp – Deformidade relativa percentual

CP – Comprimento da pata

ATD – Abertura total dos dedos

ADI – Abertura dos dedos intermediários

IFC = Índice Funcional do Nervo Ciático

FCP – Fator de comprimento da pata

FATD - Fator de abertura total dos dedos

FADI - Fator de abertura dos dedos intermediários

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Ilustração do diagrama de força X deformação absoluta.
- Figura 2** - Ilustração do diagrama de intensidade x tempo ilustrando os conceitos reobase e cronaxia.
- Figura 3** - Ilustração do gráfico intensidade x tempo com uma corrente de pulso retangular.
- Figura 4** - Ilustração do gráfico intensidade x tempo com uma corrente de tempo de pulso triangular.
- Figura 5** - Fotografia mostrando o nervo ciático após exposição através da incisão longitudinal na face lateral da coxa.
- Figura 6** - Fotografias mostrando o animal no posicionamento na plataforma de madeira do equipamento de lesão e o posicionamento do nervo ciático na haste metálica do equipamento.
- Figura 7** - Fotografias mostrando a tricotomia realizada na região lateral da pata do animal e mostrando o posicionamento dos eletrodos sobre a pele para e estimulação elétrica.
- Figura 8** - Ilustração do esquema dos cortes transversais do músculo tibial anterior
- Figura 9** - Fotomicrografia tecido muscular coradas por Picrossirius na qual se observa os perfis das células musculares pálidas cortadas transversalmente e o colágeno fibrilar corado de vermelho e tratada no programa de análise de imagem para quantificação do colágeno.
- Figura 10** - Foto do dispositivo capaz de medir a altura do músculo utilizado para o cálculo da área transversal do músculo.
- Figura 11** - Foto da pata preparada para o ensaio de tração com a tíbia fixada ao cilindro.
- Figura 12** - Fotografia da máquina universal de ensaio biomecânico com o músculo posicionado pronto para o teste de tração.
- Figura 13** - Fotografia da passarela utilizada para o teste de marcha.
- Figura 14** - Fotografia mostrando o instante do teste para avaliação da marcha.
- Figura 15** - Ilustração da representação esquemática dos parâmetros medidos para calcular o índice funcional do ciático.
- Figura 16** - Fotomicrografias da análise qualitativa de cortes transversais do músculo tibial anterior corados com Picrossirius.
- Figura 17** - Fotomicrografia de um corte histológico mostrando uma região do nervo ciático lesado.
- Figura 18** - Ilustração do diagrama força x deslocamento gerado durante o ensaio biomecânico de músculos tibial anterior.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 -** Valores obtidos para os parâmetros do eletrodiagnóstico de músculo tibial anterior normal, de animais com lesão leve ou severa do nervo ciático tratados ou não com estimulação elétrica.
- Tabela 2 -** Valores obtidos no estudo estereológico de músculo tibial anterior normal, de animais com lesão leve ou severa do nervo ciático tratados ou não com estimulação elétrica.
- Tabela 3 -** Valores obtidos para os parâmetros do teste biomecânico de músculo tibial anterior normal, de animais com lesão leve ou severa do nervo ciático tratados ou não com estimulação elétrica.
- Tabela 4 -** Valores obtidos para o Índice funcional do ciático de animais com lesão leve ou severa do nervo ciático tratados ou não com estimulação elétrica.

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1- Resultados obtidos para reobase no eletrodiagnóstico de músculo tibial anterior normal, de animais com lesão leve ou severa do nervo ciático tratado ou não com estimulação elétrica.

Gráfico 2- Resultados obtidos para cronaxia no eletrodiagnóstico de músculo tibial anterior normal, de animais com lesão leve ou severa do nervo ciático tratado ou não com estimulação elétrica.

Gráfico 3- Resultados obtidos para acomodação no eletrodiagnóstico de músculo tibial anterior normal, de animais com lesão leve ou severa do nervo ciático tratado ou não com estimulação elétrica

Gráfico 4 - Resultados obtidos para coeficiente de acomodação no eletrodiagnóstico de músculo tibial anterior normal, de animais com lesão leve ou severa do nervo ciático tratado ou não com estimulação elétrica.

Gráfico 5- Resultados obtidos para volume absoluto do músculo tibial anterior da análise estereológica de músculo tibial anterior normal, de animais com lesão leve ou severa do nervo ciático tratado ou não com estimulação elétrica.

Gráfico 6- Resultados obtidos para volume absoluto de tecido muscular na análise estereológica de músculo tibial anterior normal, de animais com lesão leve ou severa do nervo ciático tratado ou não com estimulação elétrica

Gráfico 7- Resultados obtidos para volume médio de células musculares na análise estereológica de músculo tibial anterior normal, de animais com lesão leve ou severa do nervo ciático tratados ou não com estimulação elétrica.

Gráfico 8- Resultados obtidos para volume absoluto do colágeno fibrilar na análise estereológica de músculo tibial anterior normal, de animais com lesão leve ou severa do nervo ciático tratado ou não com estimulação elétrica.

Gráfico 9- Resultados obtidos para tensão máxima obtido no teste biomecânica de músculo tibial anterior normal, de animais com lesão leve ou severa do nervo ciático tratado ou não com estimulação elétrica

Gráfico 10- Resultados obtidos para rigidez obtida no teste biomecânica de músculo tibial anterior normal, de animais com lesão leve ou severa do nervo ciático tratado ou não com estimulação elétrica.

Gráfico 11- Resultados obtidos para deformidade relativa percentual obtido no teste biomecânica de músculo tibial anterior normal, de animais com lesão leve ou severa do nervo ciático tratados ou não com estimulação elétrica.

Gráfico 12- Resultados obtidos para o índice funcional do ciático no teste de marcha músculo tibial anterior normal, de animais com lesão leve ou severa do nervo ciático tratado ou não com estimulação elétrica.

RESUMO

Sabater, E. *Efeito do uso da estimulação elétrica muscular durante o processo de reparação tecidual graus distintos de axonotmese experimental do nervo ciático de ratos* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2012.

A lesão nervosa periférica acarreta atrofia do músculo esquelético por ele inervado, levando a perda de função. E estimulação elétrica tem sido usada na prática clínica como recurso terapêutico complementar, embora existam controvérsias na literatura a respeito da sua eficácia na manutenção do trofismo muscular e dos seus efeitos no tecido conjuntivo associado ao tecido muscular. Assim sendo, este trabalho avaliou os efeitos da estimulação elétrica do músculo tibial anterior em um modelo experimental de axonotmese leve ou severa do nervo ciático de ratos. Após a lesão, um grupo de animais foi tratado com estimulação elétrica (3 vezes por semana) com parâmetros obtidos por eletrodiagnóstico, enquanto que outro grupo de animais lesados constituíram o grupo controle. Foram analisados parâmetros biomecânicos (tensão, rigidez e deformação relativa), parâmetros do eletrodiagnóstico e parâmetros histológicos (volume absoluto do músculo, volume absoluto de tecido muscular propriamente dito, volume absoluto do colágeno fibrilar e volume médio do miócito). Os resultados mostram que a estimulação elétrica promove um aumento da tensão e da rigidez nos dois tempos experimentais; em relação ao eletrodiagnóstico, os animais que receberam estimulação elétrica apresentaram valores de reobase, cronaxia, acomodação e coeficiente de acomodação significativamente diferentes dos animais não tratados, com valores que tendem à normalidade. Os parâmetros histológicos mostram que: 1) há uma diminuição do volume absoluto muscular e

do tecido muscular nos animais lesados tanto nos animais controles como nos tratados, em relação aos não-lesados; 2) há um aumento progressivo do colágeno fibrilar ao longo do tempo tanto nos tratados como nos controles; nos animais tratados a quantidade de fibras de colágeno aos 8 dias é maior quando comparada aos controles, porém aos 30 dias a quantidade de colágeno tecidual é menor nos animais tratados se aproximando mais aos valores encontrados no grupo não-lesado; 3) para lesões severas a estimulação elétrica é capaz de prevenir parcialmente a atrofia da célula, uma vez nestes animais os valores de diâmetro do miócito foi maior nos animais tratados que nos controles. Assim sendo, os dados obtidos sugerem que a estimulação elétrica tem um efeito modulador na deposição do colágeno fibrilar e no trofismo muscular, principalmente nas lesões severas. Os resultados dos testes biomecânicos refletem os achados estruturais. Além disso, os resultados obtidos sugerem que a estimulação elétrica pode atuar positivamente na regeneração neural, pois os parâmetros do eletrodiagnóstico são próximos aqueles de músculos com inervação íntegra.

Descritores: traumatismo dos nervos periféricos; desnervação muscular; estimulação elétrica; biomecânica.

ABSTRACT

Sabater, E. *Effect of muscular electrical stimulation during the repair process of distinct levels of experimental axonotmesis of the sciatic nerve in rats.* [Thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2012.

Peripheral nerve injury results in atrophy of skeletal muscles innervated by it, leading to loss of function. Electrical stimulation has been used in clinical practice as a therapeutic supplement, although there is controversy in the literature regarding its effectiveness in maintaining muscle mass and its effects on the connective tissue associated with the muscle. Therefore, this study evaluated the effects of electrical stimulation of the tibialis anterior muscle in an experimental model of mild or severe axonotmesis of the sciatic nerve of rats for 8 or 30 days. After injury, a group of animals was treated with electrical stimulation (3 times per week) and parameters being obtained by electrodiagnostic, while another group of injured animals was used as controls. We analyzed the biomechanical parameters (tension, stiffness and relative deformation), electrodiagnostic parameters and histological parameters (absolute volume of muscle, the absolute volume of muscle tissue proper, the absolute volume of the fibrillar collagen and average volume of myocytes). The results show that electrical stimulation promotes an increase in tension and stiffness in both experimental times. In relation to electrodiagnostic, animals receiving electrical stimulation showed values of rheobase, chronaxie, accommodation and accommodation coefficient significantly different from untreated animals, with values that tend to normality. The histological parameters show that: 1) there is a decrease in the absolute volume of

muscle tissue and muscle proper in the injured animals both in controls and in treated animals, compared to non-injured, 2) there is a progressive increase in fibrillar collagen over time in both treated and controls, in treated animals collagen deposition at 8 days is higher compared to controls, but at 30 days the amount of collagen tissue is lower and more similar to the values found in the non-injured; 3) for severe injuries electrical stimulation is able to partially prevent the atrophy of cells, since higher values of diameter of myocytes was found in treated animals in comparison to controls. Therefore, the data suggest that electrical stimulation has a modulating effect on deposition of fibrillar collagen which can regulate the muscle mass, especially in severe injuries, as evidenced by the results of the biomechanical tests. Moreover, the results suggest that electrical stimulation can play a positive role in neural regeneration, because the electrodiagnostic parameters are similar to those of muscles with intact innervation.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos gerais da contração voluntária e eletricamente eliciada do músculo esquelético

O músculo esquelético é formado basicamente por dois componentes principais, as células musculares (também chamadas fibras musculares ou miofibras) que ao receberem o estímulo dos motoneurônios α promovem o encurtamento contrátil do músculo e o tecido conjuntivo (incluindo também os vasos e nervos), que é responsável pela união das células musculares individuais entre si e aos ossos, o que permite a geração de trabalho (DOW et al., 2007).

Dessa forma, para realizar movimento o tecido muscular depende da inervação motora íntegra (motoneurônio α), da mobilidade articular e da transferência de carga adequada ao sistema esquelético (CRISCO et al., 1994).

O mecanismo de contração da musculatura esquelética pode ocorrer graças a um comando voluntário controlado e coordenado pelo cérebro ou ainda involuntário induzido por um estímulo elétrico externo. De uma maneira ou de outra, estando a inervação periférica íntegra, a contração muscular se inicia com uma despolarização dos motoneurônios α (fibras nervosas eferentes) dando origem a um potencial de ação ao longo desta fibra nervosa até a região denominada placa motora ou junção neuromuscular. Nesta região há a liberação de acetilcolina na fenda sináptica e esta se liga aos receptores de acetilcolina localizados na membrana das fibras musculares desencadeando por sua vez uma

despolarização e alteração do fluxo iônico na própria fibra musculares, levando à contração (GUYTON; HALL, 2002).

O conjunto das fibras musculares inervado por uma única fibra nervosa motora constitui a unidade motora (UM). No músculo esquelético existe uma região do ventre muscular em que há uma maior concentração de unidades motoras, esta região é altamente excitável e é denominada ponto motor (GUYTON; HALL, 2002). Nas contrações eletricamente eliciadas é importante a colocação dos eletrodos nos pontos motores dos músculos, pois a estimulação deste local promove uma melhor contração com uma menor intensidade, o que pode tornar a estimulação elétrica menos desconfortável.

É possível ocorrer uma contração muscular eletricamente eliciada em músculos desnervados, desencadeando potenciais de ação diretamente nas fibras musculares, porém esta contração está na dependência de parâmetros de estimulação adequados, que são conseguidos a partir de um eletrodiagnóstico de estímulos, e também da gravidade e do tempo da lesão, uma vez que o músculo desnervado sofre várias alterações fisiológicas e bioquímicas.

A desnervação promove uma interrupção do suprimento de substâncias tróficas enviadas do motoneurônio às fibras musculares, uma degeneração das junções neuromusculares, uma alteração nas propriedades elétricas do sarcolema, uma perda da atividade da acetilcolinesterase, e portanto, maior disponibilidade momentânea da acetilcolina (ACh) não somente na junção neuromuscular, mas em toda a extensão do sarcolema, descaracterizando o ponto motor e, por fim, um aumento no tempo de contração, enquanto que a quantidade de tensão gerada diminui (TAKEKURA et al., 2003; ASHLEY et al., 2007 a,b; TOMORI et al., 2010).

Além disso, o músculo desnervado sofre uma perda progressiva de seu trofismo caracterizada por uma diminuição do diâmetro das fibras musculares e por uma diminuição do peso muscular; ocorre também uma transição de fibras do tipo I para fibras do tipo II, além de um processo de degeneração muscular com substituição das fibras musculares por tecido conjuntivo fibroso (RILEY et al., 1990; SCHMALBRUSCH et al., 1991; TAKEKURA et al., 1996; TOMORI et al., 2010).

Clinicamente, além de ser possível observar a atrofia progressiva do músculo desnervado, a interrupção total ou parcial da comunicação entre o neurônio e o músculo esquelético promove uma perda do controle voluntário e reflexo da contração muscular (MARQUESTE et al., 2004), podendo se desenvolver desde uma paresia até uma plegia muscular dependendo do grau da desnervação (FINOL et al., 1981; TOMORI et al., 2010).

1.2 Bases morfológicas e funcionais das lesões nervosas periféricas

O processo de desnervação ocorre quando as raízes nervosas, plexos e os nervos periféricos são lesados como, por exemplo, nos casos de traumas aos próprios nervos, ao plexo braquial ou ainda à medula espinhal com concomitante lesão das raízes nervosas (SALMONS; JARVIS, 2008). A paralisia flácida que resulta das lesões no neurônio motor inferior normalmente traz consequências mais sérias que as paralisias espásticas causadas pelas lesões do neurônio motor superior (KERN et al., 2007).

São diversas as causas das lesões nervosas periféricas (LNP), porém elas estão frequentemente associadas a neoplasias, secções ou esmagamentos

promovendo neuropatia inflamatória que pode resultar em uma diminuição ou perda da sensibilidade e/ou da motricidade no território inervado pelo nervo acometido (SALMONS; JARVIS, 2008). As consequências desse tipo de lesão irão depender da sua natureza, local e gravidade, e apesar da existência de técnicas modernas e sofisticadas para o tratamento, a recuperação morfológica e funcional raramente é completa (VAREJÃO et al., 2001; DANEYEMEZ et al., 2005; GASPARINI et al., 2007; ROMÃO et al., 2007; RIBEIRO et al., 2008).

Nas LNP há dois principais alvos: o axônio e as células de Schwann com suas bainhas de mielina. Na neuropatia inflamatória frequentemente ocorrem agressões às bainhas de mielina ou às células de Schwann levando a uma desmielinização focal com preservação relativa do axônio. Mecanismos de reparo podem restaurar a condução nervosa através da remielinização. Nas lesões nervosas periféricas provocadas por esmagamento a integridade axonal pode estar comprometida, ocorrendo uma degeneração das fibras nervosas distalmente ao local do trauma, processo denominado Degeneração Walleriana (DW) (STOLL; MULLER, 1999; MACHADO, 2003; YANG et al., 2008).

A DW no coto axonal distal se inicia já nas primeiras 48h após o trauma e se desenvolve ao longo de um a dois meses subsequentes e é caracterizada tanto por um processo de degeneração como também pela chegada de células de defesa no local da lesão e pela proliferação de células de Schwann que irão contribuir para o processo de regeneração neural.

Imediatamente após a axonotomia os cotos nervosos proximais e distais retraem, há perda de axoplasma e colapso da membrana. Durante a DW ocorre uma degeneração axonal, fragmentação e degradação da bainha de mielina, bem como degradação do axoplasma e do axolema induzida pela ativação de

proteases axonais e influxo de cálcio (SCHLAEPFER; BUNGE, 1973; BRUCK, 1997; STOLL; MULLER, 1999). Já na primeira semana após a lesão, os macrófagos são recrutados (PERRY et al., 1987, STOLL; MULLER, 1999, YANG et al., 2008) e contribuem para a lise e fagocitose da mielina em degradação e subsequente proliferação das células de Schwann. Tanto os macrófagos como as células de Schwann secretam fatores mitóticos e de crescimento, os quais desempenham um papel na regeneração axonal e na remielinização (STOLL; MULLER, 1999, TERENCEHI 1999, YANG et al., 2008).

A lâmina basal da célula de Schwann irá guiar o brotamento axonal até o coto distal, promovendo assim a reinervação e a recuperação funcional do músculo. A proliferação das células de Schwann no interior dos tubos de lâmina basal (constituindo as chamadas bandas de Bungner) dá origem a um arranjo cilíndrico em forma de cone. (SON; THOMPSON, 1995; TERENCEHI 1999; SCHERER; SALZER, 2003; RUSSO et al., 2007; YANG et al., 2008). O crescimento axonal se dá a uma velocidade de 3 a 4 mm/dia após uma lesão por esmagamento (WISHART et al., 2008; YANG et al., 2008).

Fatores neurotróficos, como o fator de crescimento I (IGF-I) que irá estimular o processo de crescimento das fibras nervosas, são secretados tanto pelas células de Schwann (SENDTNER et al., 1992; STOLL; MULLER, 1999; VRBOVA et al., 2009) como pelos macrófagos localizados no coto distal (CHENG et al., 1996; TERENCEHI 1999; STOLL; MULLER, 1999).

Os fatores neurotróficos se difundem do endoneuro do coto distal atravessando a área da lesão para exercer influência trófica sobre os axônios em regeneração do coto proximal (TERENCEHI, 1999; VRBOVA et al., 2009), estimulando uma segunda fase da proliferação das células de Schwann, a qual é

mediada por um fator neural trófico específico para células da glia. Contudo, se o processo de regeneração não tiver continuidade, as células de Schwann diminuem progressivamente em número e tornam-se menos responsivas aos estímulos de regeneração axonal (TERENGHI 1999).

Após a lesão nervosa periférica ocorre uma dispersão da acetilcolina na membrana muscular e uma redução da acetilcolinesterase presente, o que aumenta a concentração local de acetilcolina, estimulando assim o brotamento axonal, auxiliando a formação de novas junções neuromusculares. A dispersão da acetilcolina associada com a presença de fibrilações locais são respostas adaptativas do músculo para promover a vitalidade das fibras musculares desnervadas até que ocorra a reinervação (EBERTEIN; EBERSTEIN, 1996; LIEBER 2002).

Para restaurar a função, deve haver um crescimento das fibras nervosas a partir do local onde houve a lesão. Tanto o esmagamento como a lesão cortante induzem à DW, porém há diferenças importantes na probabilidade de sucesso da regeneração. Após uma lesão cortante a separação dos cotos proximal e distal pode impedir a reinervação e frequentemente levar à formação de neuroma; por outro lado, após um esmagamento, a lâmina basal é preservada e serve como um guia para a regeneração axonal do coto nervoso proximal para o coto distal (STOLL; MULLER, 1999; RUSSO et al., 2007).

Além do comprometimento neural, as LNP(s) terão consequências diretas sobre o músculo esquelético. Dessa forma, o músculo desnervado tem sido objeto de muitos estudos sobre as alterações no seu trofismo, nas suas propriedades mecânicas e funcionais, bem como as alterações genéticas e moleculares (MIDRIO, 2006).

Após a desnervação haverá uma redução parcial ou total no número de unidades motoras recrutadas durante o movimento voluntário, dependendo da gravidade da lesão resultando em uma paresia ou uma paralisia flácida que poderá perdurar por um longo período (BENDSZUS et al., 2002). O músculo apresentará deficiências funcionais, tais como diminuição da força, da extensibilidade e da excitabilidade neural, associadas a alterações morfológicas, tais como, a atrofia, a degeneração e a necrose das fibras musculares, além da substituição do tecido muscular por um tecido conjuntivo fibroso (WISHART et al., 2008; YANG et al., 2008). Os experimentos em músculos desnervados têm demonstrado que o sistema nervoso pode controlar os tecidos periféricos através de dois mecanismos: um que depende dos impulsos dos neurônios motores, que é definido como mecanismo neuromotor; e outro independente dos impulsos nervosos, chamado de neurotrófico, que consiste na liberação de substâncias químicas pelas fibras nervosas sobre os tecidos periféricos (MIDRIO, 2006).

Com variações temporais em relação à espécie e à idade animal, o processo de denervação muscular é descrito em três fases a seguir: a) atrofia, b) degeneração aguda e c) diferenciação fibrótica (MIDRIO, 2006).

A observação em microscopia de luz revela que a atrofia precede a degeneração muscular. Entretanto, estudos com microscopia eletrônica demonstram alterações degenerativas precoces logo após a desnervação (MIDRIO, 2006).

Em ratos, dentro de 12 a 15 meses após a desnervação ainda ocorre uma diminuição no número de fibras musculares, a qual é mais acentuada nos músculos com predominância de fibras lentas como, por exemplo, o sóleo, em relação aos músculos de contração rápida, como o extensor longo dos dedos. É

observada uma degeneração vacuolar, seguida por degeneração hialina e desintegração progressiva das fibras (MIDRIO, 2006).

Nos músculos de contração lenta, poucas semanas após a desnervação, a atrofia é mais evidente nas fibras do tipo I com respectivo aumento das fibras do tipo II, enquanto que nos músculos de contração rápida, ocorre uma perda mais acentuada das fibras do tipo II com um aumento no número de fibras do tipo I (RANTANEN et al., 1995; MIDRIO, 2006).

Muitas alterações ultra-estruturais têm sido descritas após a desnervação, incluindo a desorganização sarcomérica, a ruptura miofibrilar, alterações no número de ribossomos e também no número e tamanho das mitocôndrias, além de mudanças na morfologia do retículo sarcoplasmático (MARGRETH et al., 1972). O sistema esquelético também pode ser prejudicado com o desenvolvimento de osteoporose nos casos de lesões mais graves (DOW, et al., 2006; MIDRIO 2006; STICKLER et al., 2008; SALMONS e JARVIS 2008).

Desta forma percebe-se que, o sistema neural está intimamente relacionado ao sistema músculo-esquelético e que a conduta terapêutica em uma LNP deve contemplar não somente os cuidados com o nervo, mas também com o músculo e com as estruturas peri-articulares. Dessa forma, para que haja a recuperação funcional de todo membro acometido pela lesão neural, a manutenção de um tecido muscular saudável é tão importante quanto a regeneração das células nervosas propriamente ditas. **Esta observação motiva o estudo do trofismo e da degeneração de músculo tibial anterior desnervado que nos propusemos a fazer.**

1.3 Biomecânica

A Biomecânica destaca-se como uma ciência que examina o corpo humano e seus movimentos, fundamentando-se nas leis, princípios e métodos mecânicos e conhecimentos anátomo-fisiológicos (KÄÄRIÄINEN et al., 1998). Ou ainda podemos definir a Biomecânica como o estudo da estrutura e da função dos sistemas biológicos utilizando os métodos da mecânica.

Existem excelentes revisões sobre o tema e vários livros que contem os fundamentos básicos da biomecânica. Os conceitos aqui utilizados foram retirados de NORDIN; FRANKEL (2001).

As atividades de pesquisa em biomecânica podem ser divididas em três áreas: estudos experimentais, análises de modelos e pesquisa aplicada. Estudos experimentais em biomecânica objetivam determinar as propriedades mecânicas de materiais biológicos, incluindo osso, cartilagem, músculo, tendão, ligamento, pele e sangue, como um todo, ou como partes que os constituem.

1.3.1 Propriedades de materiais baseadas em diagramas de testes de tração

Um diagrama de Força x Deformação Absoluta pode ser construído colocando-se o objeto a ser testado em um equipamento que promove sua extensão a uma velocidade constante até a ruptura. Este procedimento é conhecido como teste de tração durante o qual são captadas as dimensões da força (carga, em Newtons) e deformação absoluta (em milímetros) para geração da curva (**Figura 1**).

Figura 1 – Diagrama de força X deformação absoluta. Levando-se em consideração que na porção linear da curva a deformação é diretamente proporcional à força, é possível calcular a rigidez do material como a razão entre a variação de força e a variação do comprimento.

Conhecendo-se a área da secção transversa do objeto testado, o seu comprimento final (l_f), e seu comprimento inicial (l_i) é possível obter a curva Tensão-Deformação Relativa, através da normalização da força pela área da secção transversal e pela normalização da variação do comprimento pelo comprimento inicial:

$$\text{Tensão} = \text{Força} / \text{Área}$$

$$\text{Deformação relativa} = \frac{l_i - l_f}{l_i}$$

A tensão tem como unidade Pascal ($\text{Pa} = \text{N}/\text{mm}^2$), enquanto que a deformação relativa é adimensional, por ser uma razão entre dois comprimentos, sendo expressa tanto em porcentagem como em mm/mm.

1.3.2 Propriedades biomecânicas do tecido muscular esquelético

A organização e a biomecânica muscular advêm de uma associação entre células musculares e tecido conjuntivo, na qual o músculo pode ser considerado o elemento contrátil ativo e o tecido conjuntivo como o elemento elástico que distribui a força ativa da contração através de alongamento passivo e, ao mesmo tempo, mantém a posição relativa das fibras (WILLIAMS; GOLDSPINK, 1984). O perimísio tem sido considerado o maior componente elástico em paralelo às fibras musculares (BORG; CAULFIELD, 1980) e as alterações nas propriedades biomecânicas musculares tem sido relacionadas a alterações também no perimísio e no endomísio. É interessante observar que as modificações do perimísio aparecem nos dias iniciais dos experimentos de imobilização, mesmo antes de evidências de perdas sarcoméricas. Nos tempos mais tardios de imobilização observa-se aumento de espessura do endomísio (WILLIAMS; GOLDSPINK, 1984).

Estudos feitos com modelos de lesões musculares mostram que para a recuperação do desempenho biomecânico, a síntese e deposição adequada dos elementos da matriz extracelular são tão importantes quanto a regeneração das células musculares (LEHTO et al., 1985; KÄÄRIÄINEN et al., 1998).

Levando-se em consideração que após uma desnervação ocorrem alterações morfofuncionais no tecido muscular e nas camadas de tecido conjuntivo que podem interferir na força muscular, nos propusemos estudar o comportamento biomecânico, grau de atrofia muscular bem como a distribuição do colágeno fibrilar nas bainhas conjuntivas do músculo tibial anterior desnervado e tratado com EE em diferentes fases pós-lesão.

1.4 Tratamento das lesões nervosas periféricas

O tratamento das LNP(s) pode ser tanto conservador como cirúrgico, dependendo da gravidade da lesão, e tem como objetivos estimular o processo de reinervação e minimizar as alterações secundárias à lesão (MARQUESTE et al., 2004). O tratamento deve abranger, além das alterações diretas causadas pela lesão do nervo (distúrbios sensitivos, paresia ou paralisia do músculo desnervado e distúrbios vasomotores), os problemas associados à causa da lesão (fratura, lesão tendínea, lesão vascular, queimadura e infecção) e as alterações de tecidos moles e ósseo secundárias a LNP (atrofia e encurtamento muscular, retrações cápsulo-ligamentares, deformidades e osteoporose) (MARQUESTE et al., 2004).

Há duas classificações que, por correlacionarem a gravidade da lesão aos sintomas clínicos do paciente, auxiliam os médicos e fisioterapeutas na indicação da conduta mais adequada para o seu tratamento.

SEDDON (1943) classificou as LNP(s) como neuropraxia, axonotmese e neurotmese. Quando a continuidade axonal está preservada e existe apenas um bloqueio local da condução nervosa, a lesão denomina-se neuropraxia. Já na axonotmese pode ocorrer uma ruptura do axônio e de sua bainha de mielina, do endoneuro e do perineuro, o que compromete muito a regeneração nervosa, podendo essa levar meses para ocorrer e ser incompleta. Por sua vez, a neurotmese se caracteriza por um comprometimento de todas as estruturas que constituem o nervo, inclusive do epineuro, sendo que nesses casos um bom prognóstico estará associado a um reparo cirúrgico e mesmo assim, na maioria das vezes, o paciente apresentará alguma sequela motora crônica.

Mais tarde, SUNDERLAND (1978) propôs uma classificação com cinco níveis de gravidade, sendo as lesões do tipo I e II com chance total de recuperação, a do tipo III com prognóstico de recuperação lenta e incompleta e as do tipo IV e V sendo as mais graves, com frequente desenvolvimento de neuroma e necessidade de cirurgia para se restabelecer a recuperação estrutural e funcional da unidade neuromuscular.

Dependendo da gravidade, ou seja, da quantidade de tecido nervoso lesado, há a possibilidade de ocorrer um reparo primário, sem cirurgia. O tratamento cirúrgico através da neurorrafia ou do enxerto autólogo é uma opção para os casos mais graves, porém as dificuldades das técnicas cirúrgicas, muitas vezes, impossibilitam a melhora do membro acometido (SUNDERLAND, 1985; ROMÃO et al., 2007; REIS et al., 2008).

Alguns estudos *in vivo* têm demonstrado que o uso de células tronco de medula óssea parece ser uma opção promissora, com potencial regenerativo para as lesões de nervos periféricos (CHOI et al., 2005). A tubulização com células tronco de medula óssea, em lesões completas do nervo ciático de rato, parece resultar em uma melhor recuperação funcional em relação à aplicação de plasma rico em plaquetas (BRAGA-SILVA et al., 2006).

Outra possibilidade terapêutica é a aplicação de uma combinação de gangliosídeos exógenos na lesão nervosa periférica, promovendo uma melhora da regeneração neural expressa por recuperação funcional adequada (LAINETTI; SILVA, 1998; SOBESKI; KERNS, 2001; NETO et al., 2007; RIBEIRO et al., 2008).

Apesar da objetividade das duas classificações, na prática, muitas vezes, programar um tratamento e dar um prognóstico a essas LNP(s) não é uma tarefa das mais fáceis, principalmente nos casos de axonotmese, em que

frequentemente não é possível fazer uma distinção clara entre a gravidade da lesão e os sintomas do paciente e por isso a indicação do melhor tratamento (conservador ou cirúrgico) pode ser difícil.

Nosso estudo propõe um protocolo de tratamento conservador do músculo tibial anterior, através de EE, em dois modelos experimentais de axonotmese e pretende avaliar a evolução da lesão, através de métodos histológicos, biomecânicos, de mensuração da excitabilidade muscular e funcionais, ao longo de um mês.

1.5 Papel da estimulação elétrica nas lesões nervosas periféricas

O uso da estimulação elétrica em músculos desnervados se fundamenta na idéia da plasticidade ou adaptação muscular, de modo tanto pelo estímulo elétrico propriamente dito como pela ativação indireta da liberação de substâncias neurotróficas, o músculo modificaria sua organização estrutural (RUSSO et al., 2007).

O potencial valor terapêutico de se usar estímulos elétricos para restaurar a atividade contrátil em músculos desnervados vem sendo aventado há tempos, entretanto essa parece nunca ter sido uma conduta clínica comum e frequente (SALMONS; JARVIS, 2008).

Talvez, isso se deva ao fato de que a estimulação direta de fibras musculares, na ausência de inervação motora, requer o uso de tempos de pulso largos e altas intensidades muitas vezes não encontradas nos estimuladores convencionais. Entretanto, o desenvolvimento de equipamentos designados especificamente a esse propósito e a permissão para o uso desses equipamentos

em estudos experimentais pode fundamentar cientificamente essa prática clínica (SALMONS e JARVIS, 2008).

Já é conhecida a importância dos estímulos mecânicos para manter o músculo desnervado saudável e para evitar atrofia (SQUECCO et al., 2008). A EE de músculos desnervados tem um papel importante na regulação da síntese protéica, na prevenção da atrofia e da perda de força muscular, com capacidade de manter a morfologia e a função das fibras musculares desnervadas semelhantes às das fibras com inervação íntegra (DOW et al., 2006; SALMONS e JARVIS, 2008).

O uso da EE em pacientes com paraplegia flácida crônica resultou em uma melhora da excitabilidade dos músculos desnervados, restauração do trofismo muscular, podendo em alguns casos promover ganho de força muscular suficiente para resultar em uma melhora das atividades de vida diárias dos pacientes (KERN et al., 2004; GARGIULO et al., 2008).

Protocolos de EE aplicados em um modelo experimental de LNP em coelhos promoveram uma melhora importante em parâmetros qualitativos e quantitativos do tecido muscular. No grupo lesado e tratado, não houve alteração significativa no número total de fibras musculares (quando comparado ao músculo íntegro), indicando um menor grau de degeneração muscular. Além disso, a aplicação da EE preveniu a substituição do tecido muscular por tecido fibroso (ASHLEY et al., 2007; ASHLEY et al., 2008). Músculos desnervados eletroestimulados mantêm o trofismo e também apresentam uma tensão tetânica maior que aqueles não tratados (ASHLEY et al., 2007; STICKELER et al., 2008).

A estimulação elétrica do músculo desnervado além de auxiliar a recuperação muscular (MARQUESTE et al., 2004) é capaz de acelerar o processo

de regeneração do tecido nervoso periférico (SALMONS; JARVIS 2008), contribuindo conseqüentemente para a recuperação da função.

Doze estimulações elétricas diárias no músculo gastrocnêmio desnervado de ratos mostraram-se eficazes para diminuir a expressão gênica de atrogin 1 (uma proteína expressa grandemente durante a atrofia muscular), diminuir a densidade de tecido conjuntivo intramuscular e melhorar as características morfométricas das fibras nervosas (LIMA et al., 2008).

Levando-se em consideração que a aplicação de EE em músculos desnervados pode contribuir para a manutenção do trofismo muscular e a menor deposição de tecido fibrótico e adiposo, investigamos, neste estudo, se o músculo tibial anterior desnervado e tratado com EE teria um desempenho biomecânico melhor.

Estímulos elétricos de baixa frequência em músculos de camundongos iniciados 24 horas após uma lesão do nervo ciático (axonotmese) favoreceram a regeneração axonal (OLIVEIRA et al., 2008).

Apesar de diversos trabalhos demonstrarem os efeitos positivos da estimulação elétrica de músculos desnervados tanto ao tecido muscular como ao tecido nervoso, alguns estudos não chegaram a esta mesma conclusão: a EE após um enxerto de nervo não produziu a melhora esperada, o que pode indicar que o tempo de desnervação parece ter um papel mais importante na melhora do trofismo e da força muscular pós reinervação que a aplicação da EE (CARLSON et al. 1996; KOBAYASHI et al., 1997; DOW et al., 2006).

Vinte contrações musculares eletricamente eliciadas a cada 48 horas usando eletrodos de superfície, semelhante aos protocolos de reabilitação clínica, não preveniram a atrofia muscular e não foram capazes de estimular a

regeneração neural ou prevenir a formação de neuroma no nervo seccionado (RUSSO et al., 2007).

Autores demonstram que a EE aplicada durante o período em que o músculo já apresenta algum grau de reinervação, e não somente durante a fase precoce de atrofia e desnervação, pode inibir a regeneração neural e limitar a recuperação funcional (DOW et al., 2007). Muitos médicos são relutantes em indicar esse tipo de tratamento por recearem que a estimulação elétrica pudesse reduzir o potencial de reinervação (MERLETTI; PINELLI, 1980).

Essa questão parece estar longe de ser esclarecida, visto que alguns grupos relatam que a reinervação pode na verdade ser incrementada pela EE (ZEALEAR et al., 2002). A experiência clínica de importantes pesquisadores sugere que pode ocorrer reinervação, tanto sensorial como motora, com a aplicação de EE dois a cinco anos após a lesão, demonstrando que essa forma de tratamento não inibe o crescimento neural (KERN et al., 2002).

1.6 Estereologia

A estereologia é um conjunto de métodos desenvolvidos para garantir uma rigorosa análise quantitativa do tamanho, forma e número de objetos. Sua utilização produz resultados acurados que facilitam a interpretação e estabelecimento de correlações entre a estrutura e função (MUHLFELD et al, 2010). A estereologia permite a obtenção informações sobre estruturas tridimensionais, a partir da análise de imagens planas, bidimensionais, como aquelas obtidas em cortes histológicos preparados para a microscopia de luz e eletrônica (WEIBEL, 1979). Desse modo, medindo-se parâmetros dos perfis das

estruturas observáveis em cortes dos tecidos, podem-se extrapolar informações sobre as estruturas no espaço tri-dimensional.

Através da estereologia pode ser estimado as densidades: densidade de volume (V_v); densidade de comprimento (L_v); densidade de superfície (S_v) e densidade numérica (N_v). Também podem ser estimadas densidades por área, como por exemplo, densidade de área (A_A) e densidade numérica por área (N_A) (MANDARIM-DE-LACERDA, 2003).

A esterologia se baseia no princípio formulado pelo geologista francês August Delesse, em 1847: “A densidade de volume dos componentes de uma rocha é igual à sua densidade das áreas destes componentes que aparecem em cortes representativos feitos ao acaso”. Pelo princípio de Delesse pode-se afirmar:

$$\frac{\text{Área do componente}}{\text{Área da rocha}} = \frac{\text{Volume do componente}}{\text{Volume da rocha}}$$

ou seja: $A_A = V_V$

Para se obter um resultado fidedigno através da estereologia é necessário obter amostras representativas e randômicas do tecido. Em uma amostragem randômica do material estudado deve-se considerar que as estruturas biológicas geralmente não são homogêneas, apresentando variações regionais, e não são isotrópicas, ou seja, a aparência dos perfis varia dependendo da orientação do tecido.

Se o material de estudo for isotrópico, ou seja, não apresentar uma orientação preferencial, como acontece nos alvéolos pulmonares, os cortes devem ser “Isotrópicos Uniformes Randômicos” para a amostragem do material.

Por outro lado, em algumas situações, como na pele, na qual a organização tecidual em camadas deve sempre aparecer representada no corte histológico faz-se necessário algum controle sobre como o tecido é fatiado para amostragem. Nestes casos, para garantir a randomicidade, os cortes obtidos devem ser “Verticais Uniformes Randômicos”.

No método de amostragem de cortes verticais deve-se considerar um plano horizontal e um eixo vertical, perpendicular a ele, paralelo ao qual os cortes serão realizados. O plano horizontal pode ser escolhido pelo pesquisador, entretanto, a orientação do corte no eixo vertical deve ser determinada aleatoriamente, de forma que qualquer direção tenha a mesma chance de ser escolhida (GUNDERSEN et al., 1981).

É indispensável que seja determinado um compartimento de referência a partir do qual as estimativas serão feitas, pois as medidas são obtidas como densidades ou concentrações: por exemplo, número de mitocôndrias no citoplasma, densidade de volume dos núcleos no epitélio, comprimento dos vasos no glomérulo, área de superfície das circunvoluções no córtex cerebral.

Quando se analisam razões corre-se sempre o risco de que aconteçam alterações nos dois componentes (objeto e compartimento de referência) e isso pode levar a conclusões equivocadas. Se há um aumento proporcional nas duas estruturas, a razão medida não se altera, dando a falsa impressão de que não houve mudanças. Por isso, o ideal é calcular sempre os valores absolutos sobre o objeto, pois isso fornece resultados fidedignos e indubitáveis, além de permitir a comparação entre os dados de diferentes grupos de estudo. Se a densidade de área, ou volume, de um determinado componente tecidual for multiplicada pelo

volume do compartimento de referência, teremos o volume absoluto ocupado pelo do componente.

$V_v \times \text{Vol. compart. refer.} = \text{Volume total do componente no compart. refer.}$

Levando-se em consideração que a lesão nervosa periférica promove uma mudança da estrutura morfológica muscular, utilizamos os conceitos da estereologia para investigar se a EE é capaz de promover o remodelamento adequado do volume do músculo como um todo, das células musculares propriamente ditas e do colágeno fibrilar.

1.7 Eletrodiagnóstico

A estimulação elétrica é um recurso da fisioterapia aplicado para promover a contração muscular contralada, com o intuito de minimizar a atrofia e a fraqueza muscular progressiva (AL AMOOD et al., 1991).

O exame eletrodiagnóstico clássico permite a determinação dos parâmetros adequados de estimulação do músculo desnervado, levando em consideração as alterações de excitabilidade da junção neuro-muscular, bem como a identificação da gravidade da lesão e a possibilidade de se acompanhar a evolução do caso (POLÔNIO et al., 2010; FISCHER et al., 1939). Para tanto, o exame permite: 1) a construção das curvas de intensidade-duração do pulso (através de correntes de pulsos retangulares e exponenciais); 2) a determinação da reobase, que é da intensidade mínima de corrente para promover uma contração muscular com tempo de pulso muito largo (que em termos fisiológicos é 1 segundo); 3) a determinação da cronaxia, que é o tempo de pulso para promover uma contração muscular usando-se uma intensidade duas vezes o

valor da reobase; 4) a determinação da capacidade que os músculos têm de se acomodarem a pulsos largos de subida lenta (acomodação) (CASTRO et al., 1980; RUSSO et al., 2004; POLÔNIO et al., 2010) (Figura 2).

Figura 2 – Diagrama de intensidade X tempo, ilustrando os conceitos de reobase e cronaxia.

A combinação entre os parâmetros reobase e cronaxia é fundamental para se conseguir desencadear uma contração muscular. É necessário utilizar a intensidade mínima (reobase) e o tempo de pulso mínimo (cronaxia) para excitar os tecidos, caso contrário não haverá o desencadeamento do potencial de ação. Por exemplo, mesmo que se use a intensidade máxima permitida pelo equipamento de estimulação, se não for atingido a cronaxia não haverá contração muscular, e o inverso também é verdadeiro, ou seja, sem utilizar pelo menos a reobase, não será possível desencadear uma contração muscular, mesmo que se utilize tempos de pulso maiores (ASHLEY et al., 2005; RUSSO et al., 2007).

Em músculos com a inervação íntegra, os valores de reobase e de cronaxia normalmente são baixos (RUSSO et al., 2004; ASHLEY et al., 2005; POLÔNIO et al., 2010). A lesão do nervo periférico tende a desenvolver uma hipoexcitabilidade ao longo do tempo ocorrendo então um aumento desses parâmetros de estimulação (GUTMANN; ZELENKA, 1962; ASHLEY et al., 2005).

As curvas de intensidade-duração do pulso (I/T) são construídas com correntes de pulsos retangular e triangular, utilizando diferentes tempos decrescentes de pulso (de 1000ms a 0,1ms para a curva retangular e de 1000ms a 1ms para a curva triangular) e intensidades crescentes, de modo a encontrar a intensidade necessária para que haja uma contração muscular mínima nos diferentes tempos. Este tipo de curva serve para se ter uma idéia da estado da lesão quando se compara com o padrão normal da curva obtida do lado com inervação íntegra; além disso, analisando-se comparativamente diversas curvas obtidas ao longo do tempo é possível avaliar a evolução da lesão.

De modo geral, a curva normal I/T retangular tende a ter um platô de intensidade baixa com os tempos de pulsos largos e tende a se elevar (intensidades mais altas) à medida que se utilizam tempos de pulsos mais estreitos. Porém, nos casos de lesão nervosa periférica, a curva tende a ficar deslocada para cima e para o lado direito do gráfico, pelo fato de serem necessários tempos de pulsos e intensidades maiores para excitar o músculo o desnervado (**Figura 3**).

Figura 3 – Ilustração do Gráfico Intensidade x Tempo com uma corrente de tempo de pulso retangular.

De modo geral, a curva I/T triangular, no músculo íntegro, tende a ser alta com tempos de pulsos largos, pois é necessário utilizar intensidades altas devido ao fenômeno da acomodação; à medida que o tempo de pulso diminui, há tendência de queda na curva, que volta a subir com o uso de tempos de pulsos menores. No entanto, nos casos de lesão nervosa periférica, a curva é baixa quando se utiliza tempos de pulsos largos, demonstrando a perda da capacidade de acomodação muscular e tende a subir para os tempos de pulsos menores, porém a curva também fica deslocada para a região direita do gráfico em relação à curva normal, uma vez que os músculos desnervados não respondem aos pulsos estreitos (RUSSO et al., 2007; POLÔNIO et al., 2010) (**Figura 4**).

Figura 4 – Ilustração do Gráfico Intensidade x Tempo com uma corrente de tempo de pulso triangular.

Assim sendo, na presença de uma lesão nervosa periférica não haverá muita diferença quanto à intensidade necessária para se estimular o músculo desnervado em relação ao uso de correntes de pulso triangular ou retangular, uma vez que o músculo desnervado não reconhece diferenças entre esses dois tipos de pulsos, devido ao fato de ter perdido a capacidade de acomodação (RUSSO et al., 2007).

Outro parâmetro do eletrodiagnóstico é o coeficiente de acomodação (α) que é um índice, que relaciona a acomodação à reobase, e que pode ser usado para acompanhar a evolução da lesão ao longo do tempo. À medida que a lesão evolui positivamente, espera-se que a reobase diminua e a acomodação aumente, tornando o α maior (FUKUDA, 2007).

2 MATERIAIS E MÉTODO

O projeto desta pesquisa foi submetido à avaliação do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP). Todos os procedimentos experimentais relativos à análise morfológica foram realizados no Laboratório de Biologia Celular (LIM 59) do HCFMUSP, chefiado pela Profa. Elia Garcia Caldini, enquanto que os testes biomecânicos foram realizados no Laboratório de Biomecânica (LIM 41) do HCFMUSP, chefiado pelo Prof. Roberto Guarniero.

2.1 Animais

Foram utilizados 80 ratos (*Rattus norvegicus albinus*), da linhagem Wistar, adultos, machos, pesando aproximadamente 200 gramas, procedentes do Biotério da FMUSP. Os animais foram mantidos em gaiolas, com livre acesso à água e alimento, temperatura controlada (22°C) e iluminação artificial (luzes acesas das 8:00 às 18:00 horas).

O estudo funcional da marcha foi realizado com todos os animais; para o estudo histológico, foram utilizados 40 animais e outros 40 foram usados para o estudo biomecânico.

2.1.1 Grupos

Para obter a desnervação do músculo tibial anterior da pata direita, 80 animais foram submetidos a uma lesão do nervo ciático direito e, em seguida, divididos em dois grandes grupos: Quarenta animais foram submetidos a uma lesão do nervo ciático direito considerada leve (L), esmagamento com 0,5kg; outros 40 sofreram uma lesão severa (S), esmagamento com 1,5Kg, baseado no modelo experimental proposto por MONTE-RASO et al. (2006).

Metade dos animais (n=20) que sofreram lesão leve foi tratada com estimulação elétrica a partir do segundo dia de pós-operatório, considerando o dia da cirurgia como dia zero, constituindo o grupo experimental com lesão leve. Os outros 20 formaram o grupo controle correspondente (lesão leve sem tratamento algum). O mesmo protocolo foi realizado com os animais que sofreram lesão severa do nervo ciático.

Os animais controle (C) e tratado com estimulação elétrica (T) foram sacrificados em dois diferentes tempos pós-lesão (8 e 30 dias), formando os seguintes grupos, como 10 animais cada:

8 L – 8 dias após lesão leve sem tratamento

8 LT – 8 dias após lesão leve tratado com EE

8 S - 8 dias após lesão severa sem tratamento

8 ST – 8 dias após lesão severa tratado com EE

30 L - 30 dias após lesão leve sem tratamento

30 LT - 30 dias após lesão leve tratado com EE

30 S - 30 dias após lesão severa sem tratamento

30 ST - 30 dias após lesão severa tratado com EE

De cada um destes grupos, 05 animais foram utilizados para o estudo histológico e 05 para o ensaio biomecânico, sendo que todos realizaram a avaliação funcional da marcha.

As aplicações de EE foram realizadas três vezes por semana, de modo que os animais sacrificados 8 dias pós-lesão receberam 3 aplicações de EE, enquanto que os animais sacrificados 30 dias pós-lesão, receberam 12 aplicações de EE durante o experimento.

Além destes animais, foram utilizados 8 animais para realização de teste biomecânico, análise da marcha e estudos histológicos do músculo tibial anterior direito em pata íntegra e sem nenhum tipo de tratamento.

2.2 Procedimento cirúrgico e de lesão do nervo ciático

Os animais foram anestesiados com uma injeção intraperitoneal de quetamina (95mg/kg) e xilazina (12mg/kg) para o processo de desnervação do músculo. Após a indução anestésica foi feita uma incisão retilínea de 3cm de comprimento na pele e na fascia longitudinal na face lateral da coxa direita a partir do trocanter maior até o joelho. Os músculos glúteo maior e bíceps femoral foram separados por dissecação romba e o nervo ciático foi localizado desde sua emergência, na borda inferior do glúteo maior, até sua trifurcação, na altura do joelho. A lesão do nervo ciático foi realizada sempre na mesma localização (5mm proximais à trifurcação do nervo), de modo a facilitar a identificação do local para obtenção de material para análise histológica (**Figura 5**).

Figura 5– Fotografia mostrando o nervo ciático (seta vermelha) após exposição através da incisão longitudinal na face lateral da coxa.

O animal foi posicionado no equipamento desenvolvido para este estudo no Laboratório de Biomecânica da FMUSP para lesão do ciático por esmagamento. Segundo o grupo a que pertencia o animal, uma carga estática contínua de 0,5kg (lesão leve) ou de 1,5Kg (lesão severa) foi aplicada em um segmento de 5mm do nervo, por 30 segundos, obtendo-se desta forma a lesão por esmagamento, segundo MONTE-RASO et al., 2006 (**Figura 6**).

Figura 6 – (A) Fotografia mostrando o animal posicionado na plataforma de madeira do equipamento de lesão, com a célula de carga de 0,5Kg (seta vermelha) no momento da lesão. (B) Fotografia do detalhe do posicionamento do nervo ciático na haste metálica do equipamento (seta verde).

Após o esmagamento, o nervo ciático foi cuidadosamente destacado do dispositivo e deixado em seu trajeto de origem, sendo a pele suturada com fio de nylon tech-lon* 4-0 com aplicação de iodopovidona para evitar infecção.

Os animais foram posteriormente mantidos em gaiolas individuais, sem restrição de movimentação até a eutanásia e medicados com paracetamol durante uma semana de pós-operatório para analgesia.

2.3 Exame eletrodiagnóstico muscular e protocolo de tratamento de estimulação elétrica transcutânea

Tanto a avaliação como o tratamento com EE foram realizados com o animal anestesiado, utilizado um gerador universal de pulsos (Dualpex 071, Quark) o qual permite fazer as alterações necessárias nos parâmetros de tratamento durante a evolução da lesão.

Escolheu-se fazer a desnervação do músculo tibial anterior porque quase todas as suas fibras cruzam a porção média de seu ventre e são bem distribuídas de tendão a tendão (LIEBER, 2002). Além disso, ele é um músculo superficial o que torna fácil a identificação de uma contração mínima, permitindo que seja feito uma EE seletiva através de eletrodos de superfície. Foi realizada a tricotomia, a limpeza e a umidificação da pele antes do posicionamento dos eletrodos de alumínio, distando 1cm entre si, sobre o ventre muscular (**Figura 7**).

Figura 7- (A) Fotografia mostrando a tricotomia realizada na região lateral da pata direita do animal. (B) Fotografia mostrando o posicionamento dos eletrodos sobre a pele que recobre o músculo tibial anterior para a realização da estimulação elétrica.

O eletrodiagnóstico foi realizado três vezes: o primeiro exame foi feito antes da desnervação, o segundo 2 dias após a lesão do nervo e o terceiro um dia antes da eutanásia de cada animal.

Os valores registrados a cada eletrodiagnóstico foram: 1) reobase com corrente pulsada monofásica retangular, tempo de pulso de 1000ms e intervalo interpulso de 2000ms; 2) cronaxia com corrente pulsada monofásica retangular, intervalo interpulso de 2000ms, intensidade duas vezes o valor da reobase; e 3) acomodação com corrente pulsada monofásica triangular, tempo de pulso de 1000ms e intervalo interpulso de 2000ms.

Os parâmetros adequados para a estimulação do músculo tibial anterior desnervado foram obtidos pelo exame 2 dias após a lesão, levando-se em consideração a cronaxia encontrada: quando a cronaxia foi $\leq 1\text{ms}$ foi usada uma corrente pulsada monofásica retangular (frequência de 50Hz, tempo de pulso de 1ms); quando a cronaxia foi $>1\text{ms}$ foi usada uma corrente pulsada monofásica

triangular (frequência de 20Hz, tempo de pulso duas vezes o valor da cronaxia), segundo RUSSO et al., 2004.

As frequências utilizadas permitiram contrações musculares tetânicas com baixo risco de indução à fadiga e sem a necessidade de utilizar intensidades muito altas (BINDER-MACLEOD 1992; KUKULKA 1992; BAKER et al. 2000). As contrações eram identificadas pela completa dorsiflexão da pata direita.

O tempo de passagem de corrente (*TON*) foi de três segundos e o tempo de repouso (*TOFF*) foi de 6 segundos. Como utilizamos um *TON* considerado longo, a relação *TON:TOFF* de 1:2 foi escolhida para evitar fadiga no músculo desnervado, uma vez que já é sabido que a estimulação de músculos desnervados não resulta em melhora da resistência muscular e que em alguns casos ela até pode induzir à fadiga mais rapidamente (SALMONS; JARVIS, 2008).

Foram realizados testes prévios para determinar o número ideal de contrações e, observou-se que mais que 16 contrações levavam músculo à fadiga (RUSSO et al., 2007). Além disso, regimes intensos de estimulação trazem poucos benefícios terapêuticos em relação a outros moderados (ASHLEY et al., 2008). Dessa forma, foram promovidas 15 contrações máximas por sessão no músculo tibial anterior.

A frequência das sessões foi escolhida para simular uma condição de tratamento clínico. As aplicações foram realizadas de segunda à sexta-feira, ou seja, 3 vezes por semana e tiveram início 48h após a lesão do nervo, pois quanto menor o tempo entre a desnervação e o início do tratamento, melhores são os resultados quanto ao trofismo e a função dos músculos, uma vez que a atrofia do

músculo esquelético de rato é alta durante as primeiras semanas após a desnervação (BONDINE et al., 2001).

É importante que a EE seja iniciada no período que corresponde à fase de atrofia em resposta à desnervação (primeiros 18 meses) e não no período de necrose muscular que prevalece nos estágios mais tardios (SALMONS; JARVIS, 2008).

2.4 Eutanásia

Aos 8 e 30 dias após a lesão, o músculo tibial anterior desnervado foi coletado com os animais anestesiados e na sequência foi aplicada uma dose excessiva de anestésico para eutanásia.

As carcaças dos animais foram descartadas em sacos brancos contendo o símbolo universal de risco biológico, os quais foram lacrados e identificados pelos nomes do laboratório e seu responsável e pela data de descarte. Os sacos foram acondicionados em freezer no Laboratório de Biologia Celular (LIM 59) e o descarte até a câmara fria do abrigo de resíduos foi feito exclusivamente pela empresa contratada com profissionais devidamente paramentados mediante solicitação telefônica à empresa responsável. Posteriormente, esse material foi coletado pelo órgão municipal.

2.5 Estudo histológico

Para obtenção dos dados morfométricos foram aplicadas técnicas de estereologia, de modo a obter informações quantitativas de forma simples,

eficiente, precisa e imparcial, ou seja, sem vício ou tendência (GUNDERSEN, 1988). Os procedimentos descritos a seguir são indispensáveis para garantir a eficiência e a imparcialidade da técnica estereológica.

2.5.1 Coleta e Pesagem do Músculo

Após a eutanásia, em cada tempo estudado, o músculo tibial anterior, foi retirado do animal; a porção tendínea foi desprezada e o ventre muscular pesado em uma balança de alta precisão. Para tanto, pesou-se um frasco contendo solução fisiológica e em seguida mergulhou-se o músculo por completo na solução e pesou-se novamente. A diferença entre as pesagens, em gramas, correspondeu ao peso muscular.

2.5.2 Processamento histológico: amostragem e preparo dos blocos de parafina

Neste projeto utilizamos os métodos estereológicos para a avaliação morfo-quantitativa do tecido muscular após a lesão do nervo ciático e do potencial do tratamento deste tipo de lesão com estimulação elétrica. Os parâmetros selecionados para análise incluem medidas de volume do tecido muscular propriamente dito e do colágeno fibrilar. Além disto, avaliamos o volume médio da célula muscular, como parâmetro da atrofia celular.

O procedimento de amostragem do músculo foi realizado de maneira sistemática, randômica e uniforme (SUR sampling), levando em consideração o princípio do “fractionator” (GUNDERSEN, 1986) de maneira que todo o tecido tenha a mesma chance de ser amostrado e a amostra selecionada para análise

seja representativa do todo. Desta forma o músculo foi seccionado transversalmente ao seu maior eixo em fatias de 4 mm com auxílio de uma navalha e um sistema teste de linhas guia (Figura 8). As fatias foram então alinhadas e dois conjuntos representativos formados.

Figura 8 – Esquema dos cortes transversais do Músculo Tibial Anterior com espessura de 4 mm , corte com a seta azul foram processados para estudo histológico. À esquerda observa-se um esquema das fatias incluídas no bloco de parafina.

O conjunto destinado ao estudo histológico foi fixado por imersão em paraformaldeído 4% tamponado (PBS 0,1 M, pH 7,0), por 24 horas, e processado rotineiramente para inclusão em parafina e o outro conjunto foi congelado em isopentano derretido e mantidas à -70°C para ser usado em análises imunoistoquímicas futuras.

Previamente à fixação cada fatia destinada ao processamento histológico foi marcada com nanquim, para que pudesse ser colocada voltada para cima quando da inclusão em parafina.

2.5.3 Processamento histológico: microtomia e métodos de identificação histológica

Cortes seriados de 5µm de espessura foram obtidos a partir dos blocos de parafina e distendidos em lâminas de vidro. As lâminas foram codificadas e o código revelado somente após a obtenção dos dados quantitativos para garantir uma análise cega. Após hidratação, as lâminas foram coradas pela Hematoxilina-eosina (HE) para estudo histopatológico, segundo rotina de coloração, e pelo Picrosírius-hematoxilina (PSH) para identificação das fibras colagênicas do tecido conjuntivo:

2.5.3.1 Coloração por Picrosírius-hematoxilina

Os cortes histológicos foram desparafinados, hidratados e corados durante uma hora com Sirius Red 0,1% (Sirius Red F 3 B 200, Mobay Chemical Co. Union, New Jersey, EUA) dissolvido em solução aquosa saturada de ácido pícrico sendo, em seguida, rapidamente lavados em água corrente e contra-corados com hematoxilina de Harris, por 5 minutos (JUNQUEIRA et al., 1978).

O corante Sirius Red é uma molécula alongada com seis grupamentos sulfônicos ácidos e quatro grupamentos cromofóricos diazóicos; os grupamentos sulfônicos do corante interagem fortemente com os aminoácidos básicos da molécula de colágeno conferindo-lhe intensa cor vermelha sendo assim muito

utilizado para identificação do colágeno em cortes histológicos (JUNQUEIRA et al., 1978)

2.5.4 Parâmetros quantitativos do tecido muscular

A partir de fragmentos de músculo sem lesão, músculo lesado não tratado e em músculo lesado tratado com EE com diferentes graus de lesão e tempos pós-lesão foram determinados os seguintes parâmetros: volume absoluto do músculo, o volume absoluto ocupado por tecido muscular, volume absoluto de colágeno fibrilar, volume médio das fibras musculares e relação da quantidade absoluta de colágeno pelo volume muscular total.

2.5.4.1 Volume absoluto do músculo tibial anterior

O volume total do músculo tibial anterior (V_M) foi obtido dividindo-se o peso do músculo (“peso úmido”, obtido no momento de sua obtenção) pela densidade específica do tecido neste caso considerada 1,06 g/cm³ (MAYHEW, 2006; 2008), de acordo com a fórmula:

$$V_M (\text{cm}^3) = \text{peso (g)} / 1,06 (\text{g/cm}^3)$$

2.5.4.2 Volume absoluto ocupado pelo tecido muscular

O volume ocupado pelas células musculares propriamente ditas no músculo foi obtido pelo método de contagem de pontos (HOWARD e REED, 2005). Para tanto os cortes corados pelo método Picrossírius (para facilitar a

diferenciação entre matriz e células) foram fotografados utilizando-se uma objetiva de 40 x. A seguir, um sistema teste de pontos com área equivalente ao ponto de 5000 μm^2 foi sobreposto às imagens fotográficas. Foram contados os pontos incidentes sobre as células musculares e os pontos totais incidentes sobre a imagem histológica do músculo como um todo. Assim sendo, a fração de volume ocupado pelas células musculares propriamente ditas ($V_{V \text{ tecido muscular}}$) foi calculada, aplicando-se a seguinte equação:

$$V_{V \text{ tecido muscular}} = \Sigma P_{\text{tecido muscular}} / \Sigma P_M$$

Onde $\Sigma P_{\text{tecido muscular}}$ é a somatória de pontos incidentes nas células musculares e a ΣP_M é a somatória de pontos incidente em toda imagem histológica.

Subsequentemente, o volume ocupado pelas células musculares foi estimado multiplicando-se a fração de volume ($V_{V \text{ tecido muscular}}$) pelo volume total do músculo correspondente (V_M) segundo a fórmula:

$$V_{\text{absoluto tecido muscular}} = V_{V \text{ tecido muscular}} \times V_M$$

2.5.4.3 Volume Médio da Célula Muscular

O volume médio da célula muscular foi estimado baseado no volume ponderado médio das células. Este é um método não tendencioso para se estimar o volume celular utilizando-se medidas diretas de interceptos que atravessam os perfis celulares. Aplica-se um sistema teste de pontos e linhas e são medidos os comprimento dos fragmentos de linha que atravessam os perfis celulares, sendo que somente são medidos aqueles perfis sobre os quais há a incidência de um ponto do sistema-teste.

Nesta análise foram utilizadas as mesmas imagens histológicas para avaliação volumétrica.

Em certos casos uma mesma célula pode ser atingida por mais de um ponto e neste caso todos os interceptos são medidos. As medidas foram realizadas utilizando-se o software ImageJ e a seguinte fórmula foi aplicada para se obter o volume médio da célula:

$$V_{\text{médio célula}} = [\pi/(3 \times n)] \times \sum l^3$$

Onde n é o número de medidas realizadas em uma mesma célula, $\sum l^3$ é a soma do comprimento dos interceptos elevada à terceira potência.

2.5.4.4 Volume absoluto de colágeno fibrilar

Para a avaliação do volume ocupado pelo colágeno fibrilar no músculo tibial anterior utilizamos também os cortes histológicos corados com o Picrossírius.

Em cada corte foram selecionados aleatoriamente 5 a 10 campos que foram fotografados com objetiva 20x. As imagens capturadas foram transferidas para o programa de tratamento digital das imagens Image J; foram então convertidas em imagens em escala de cinza (8-bit) e o colágeno fibrilar foi selecionado utilizando-se a ferramenta de “threshold” (limiar). As áreas selecionadas foram então quantificadas como frações de área ocupadas por colágeno. Para de evitar a sub e superestimação do conteúdo de colágeno as imagens tratadas foram comparadas com as imagens originais por direta visualização (**Figura 9**).

Figura 9- (A)- Fotomicrografia de tecido muscular corado pelo Picrosirius, na qual se observam os perfis das células musculares pálidas cortadas transversalmente e o colágeno fibrilar corado de vermelho profundo. **(B)** - Mesma fotomicrografia tratada no programa de análise de imagem para quantificação do colágeno.

Para o cálculo do volume absoluto de colágeno fibrilar do músculo como um todo, multiplicou-se a fração de área ocupada por colágeno pelo volume absoluto do músculo.

2.5.6 Análise histológica do nervo ciático

Um segmento de 10mm do nervo ciático foi coletado cada animal e foram feitas marcas de tinta nanquim para identificação das regiões proximal e distal do segmento de nervo retirado. (LUÍS et al., 2007). Em seguida, o nervo foi fixado em glutaraldeído 4% e incluído em historesina.

Foram obtidos cortes histológicos de 3 μ m de espessura (cortes semi-finos) a partir do coto distal do nervo. Os cortes foram corados com solução aquosa de azul de toluidina e fucsina para observação em microscopia de luz.

2.6 Estudo biomecânico

Ao término de cada tempo experimental proposto, os animais destinados aos testes de tração foram anestesiados e a tíbia foi desarticulada juntamente com o complexo ósseo e músculo-tendíneo da pata do animal. Todas as outras estruturas (a fíbula e os demais músculos da pata) foram retiradas, deixando o terço proximal da tíbia com a origem do músculo tibial anterior como as únicas estruturas de ligação até o tornozelo do animal (JÄRVINEN, 1976). O tempo máximo entre a retirada do material dos animais e a realização do teste de tração não foi superior a 10 minutos e durante este período os espécimes foram deixados em solução fisiológica em temperatura ambiente.

A seguir, procedeu-se à avaliação da área transversal do terço médio do ventre muscular. Para tanto, o músculo foi encaixado longitudinalmente em uma canaleta com 8,0 mm de largura; esta canaleta estava acoplada a um sistema composto a uma haste associada a um medidor de altura (relógio comparador marca Mitutoyo, com resolução de 0,01mm). A haste era baixada até se encostar à superfície muscular e a leitura do seu deslocamento era anotada. A diferença entre o deslocamento da haste na canaleta vazia e na canaleta contendo o músculo correspondeu à altura do músculo (**Figura 10**). A área da secção transversal foi calculada pela multiplicação do valor da base da canaleta (8mm) pela altura do músculo medida.

Figura 10 – (A) Visão geral do dispositivo que permite o cálculo da altura do músculo. **(B)** – detalhe mostrando a haste vertical que se desloca até encostar-se à superfície muscular. A diferença entre o deslocamento até fundo da canaleta e o deslocamento até a superfície muscular corresponde à altura do músculo.

O ensaio de tração do complexo músculo-tendíneo foi feito em máquina universal de ensaios mecânicos KRATOS® 5002, dotada de célula de carga (dinamômetro) de 100 kgf com escala ajustável para 10 kgf e resolução de 0,010 kgf.

Os valores de força e deformação foram adquiridos em tempo real por um sistema de aquisição de dados marca LYNX® modelo ADS2000, dotado de um programa dedicado para registrar no computador os dados do ensaio. A velocidade de ensaio foi de 20 mm/minuto.

Os espécimes foram preparados, fixando-se a extremidade proximal da tibia dentro de uma peça metálica cilíndrica através de três parafusos radiais (**Figura 11**).

Figura 11 – Perna preparada para o ensaio de tração com a tíbia fixada ao cilindro. A seta aponta para o músculo tibial anterior exposto.

O espécime assim preparado foi colocado na máquina universal de ensaios mecânicos de modo que o complexo músculo-tendíneo fosse alinhado ao eixo de movimento da máquina (**Figura 12**).

Figura 12- (A): Visão geral da máquina universal de ensaios mecânicos com o músculo (seta) já posicionado pronto para o teste de tração. (B): Detalhe da aparência do músculo (seta) preso à máquina e já em processo final de tracionamento.

Antes do início do ensaio, o espécime foi submetido a uma pré-carga de 0,5N (CRISCO et al., 1994) e o comprimento inicial (distância entre a origem e a inserção do músculo tibial anterior) foi mensurado utilizando um paquímetro com

resolução de 0,05mm, sendo os valores arredondados para uma casa decimal após a vírgula.

Nos ensaios biomecânicos foram avaliados os seguintes parâmetros: a) **tensão máxima** (T_{max}) em kiloPascal (kPa), calculada pela razão da força máxima pela área da secção transversa do músculo; b) a **rigidez do tecido** (Rig) em Newtons por milímetros (N/mm), definida pela razão da diferença da força (Δ força) pela diferença da deformação absoluta (Δ def) entre dois pontos presentes na região linear do gráfico; c) a **deformação relativa percentual** (Drp), calculada pela razão da deformação absoluta pelo comprimento inicial do músculo multiplicada por 100.

2.7 Análise da marcha

Como indicador funcional realizou-se a análise da marcha de todos animais, através da análise da impressão de suas pegadas em papel milimetrado colocado sobre uma passarela de madeira de 43cm X 9cm, fechada nas laterais e dotada de um abrigo no final do percurso (**Figura 13**), segundo modelo proposto por DE MEDINACELI et al., 1982 e modificado por REYNAUDS et al., 1996.

Figura 13- Passarela utilizada para o estudo da marcha.

Todos os animais que foram submetidos à lesão do nervo ciático realizaram o teste de avaliação da marcha imediatamente antes da cirurgia e repetiram o teste no dia anterior à sua eutanásia.

Os animais foram previamente treinados a caminhar nessa passarela e, no momento do teste, as patas traseiras dos animais foram pintadas com tinta nanquim azul para que as pegadas ficassem impressas no papel (Figura 14).

Figura 14 – Fotografia mostrando o instante final do teste para avaliação da marcha. Podem ser vistas as pegadas do animal impressas no papel milimetrado.

Foram realizados três registros de pegadas para cada animal por sessão e o resultado para cada animal corresponde à média desses três registros.

Ainda de acordo com a proposta de DE MEDINACELI et al., 1982, após a secagem das impressões das pegadas, foram mensuradas as seguintes dimensões de comprimento:

- a) o comprimento da pata (CP), medindo-se a distância entre o calcanhar e o terceiro dedo;
- b) a amplitude de abertura total dos dedos (ATD), mensurada do primeiro ao quinto dedo;

c) a amplitude de abertura dos dedos intermediários (ADI), medida do segundo ao quarto dedo (**Figura 15**).

Figura 15 – Representação esquemática dos parâmetros medidos para calcular o Índice Funcional do Ciático (IFC): ATD = abertura total dos dedos (1º. ao 5º. dedo); ADI = abertura dos dedos intermediários (do 2º. ao 4º. dedo); CP = comprimento da pata (adaptado de MONTERASO et al., 2006).

Para cada uma dessas dimensões foi calculado um “fator”, corrigindo-se os resultados pós-lesão pelos resultados pré-lesão (VAREJÃO et al., 2001). Por exemplo, o fator comprimento da pata (FCP) foi assim calculado:

$$FCP = \frac{CP_{\text{pré-lesão}} - CP_{\text{pós-lesão}}}{CP_{\text{pós-lesão}}}$$

Os fatores ATD e ADI foram calculados da mesma maneira.

Uma vez obtidos os fatores, foi calculado o Índice Funcional do Ciático (IFC) para cada animal, como proposto por BAIN et al. (1989) e modificado por VAREJÃO et al. (2001):

$$IFC = -38,3 \times FCP + 109,5 \times FATD + 13,3 \times FADI - 8,8$$

O IFC é um valor negativo, de modo que um IFC igual a 0 significa ausência de disfunção do nervo enquanto que a disfunção total, condizente a uma secção completa do nervo ciático, vale -100 (VAREJÃO 2001).

2.8 Análise estatística

Tanto para os animais tratados com EE como para os controles, a comparação entre os tipos de lesão (leve x severa) no mesmo tempo experimental (8 ou 30 dias) foi feita pelo teste *t de Student*, se os dados cumprissem os critérios de normalidade e homogeneidade. Caso contrário, usou-se o teste não paramétrico de *Mann-Whitney*. Os mesmos testes foram utilizados para a comparação entre os grupos tratados com os grupos controles, segundo o tipo de lesão e o tempo experimental.

Para a comparação entre o normal, 8 dias e 30 dias pós-lesão, segundo o tipo de lesão e o tratamento, foi usada a análise das variâncias (ANOVA) quando os dados eram normais e homogêneos. Caso contrário, usou-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Quando encontradas diferenças significativas nas variâncias, a localização destas diferenças foi feita pela comparação dois a dois através o teste de Tukey (para o ANOVA) e teste de Dunn (para o Kruskal-Wallis).

Para todos os testes realizados foi utilizado um nível de significância de 5% ($\alpha = 0,05$). Desta forma, considerados estatisticamente significantes os testes com nível descritivo menor que 5% ($p < 0,05$).

RESULTADOS

3.1 Complicações cirúrgicas

Em três animais não tratados com EE observou-se, após a lesão do nervo ciático, a ocorrência de automutilação de um ou dois dedos laterais da pata lesada, provavelmente pela perda da sensibilidade após a lesão neural. Esses animais foram descartados do estudo e substituídos por outros.

Todos os animais apresentaram contrações musculares quando eletricamente estimulados. Não foram observadas contraturas articulares nos animais lesados

3.2. Resultados do teste eletrodiagnóstico

Foram analisadas a cronaxia, reobase, acomodação e alfa obtidas no teste eletrodiagnóstico realizados antes da lesão (normal), 8 dias após a lesão leve controle e tratado (8 L e 8 LT), 8 dias após lesão severa controle e tratado (8 S e 8 ST), 30 dias após a lesão leve controle e tratado (30 L e 30 LT) e 30 dias após a lesão severa controle e tratado (30 S e 30 ST). A Tabela 1 resume estes resultados. Cada um deles será comentado individualmente na seção correspondente.

Tabela 1 – Valores (média±desvio padrão) obtidos para os **parâmetros do eletrodiagnóstico** de músculo tibial anterior normal, de animais com lesão leve ou severa do nervo ciático tratados ou não com estimulação elétrica.

	Normal	Lesão Leve				Lesão Severa			
		Controle		Tratado		Controle		Tratado	
		8 L	30 L	8 LT	30 LT	8 S	30 S	8 ST	30 ST
Reobase (mA)	2,31 ± 0,47	4,1 [■] ± 0,99	3,2 [■] ± 0,78	3,0 ^{* ■} ± 0,70	2,3 ^λ ± 0,50	3,8 [■] ± 0,92	3,4 [■] ± 0,78	3,2 [■] ± 0,78	2,20 ^{§ ¥} ± 0,44
Cronaxia (ms)	85 ± 16,7	510 [■] ± 105	420 [■] ± 75,2	327,7 ^{* ■} ± 36,3	238 ^{λ ■} ± 92,7	433,0 [■] ± 132,2	316,0 [■] ± 50,0	370,0 [■] ± 82,3	233,0 ^{§ ■} ± 43,3
Acomodação (mA)	7,62 ± 1,35	4,1 [■] ± 0,87	4,3 [■] ± 0,82	4,6 ^{* ■} ± 0,52	4,8 ^{λ ■} ± 1,13	3,2 [■] 0,44±	4,2 [■] ± 0,70	4,3 ^{◇ ■} ± 0,78	4,4 [■] ± 1,23
Coefficiente alfa	3,4 ± 0,82	0,98 [■] ± 0,25	1,58 [■] ± 0,61	1,95 ^{* ■} ± 0,53	2,94 ^λ ± 0,88	1,18 [■] ± 0,51	2,01 ^{■ ◇} ± 0,75	1,75 ^{◇ ■} ± 0,62	2,96 [§] ± 0,67

■ = p > 0,05 comparado com normal

◇ = p < 0,05 comparado com 8 S

§ = p < 0,05 comparado com 30 S

* = p < 0,05 comparado com 8 L.

λ = p < 0,05 comparado com 30 L

¥ = p < 0,05 comparado com 8 ST

3.2.1 Reobase

Aos 8 dias pós-lesão, os músculos lesados apresentaram a reobase significativamente maior, mesmo aqueles tratados, quando comparados com o normal.

Para os animais examinados 30 dias pós-lesão leve ou severa, observou-se que a reobase, nos tratados, era significativamente menor que nos controles, indicando que o tratamento pela EE foi capaz de diminuir a reobase aos 30 dias, chegando inclusive a retornar aos padrões de normalidade tanto para a lesão leve como para a lesão severa.

Notou-se também que no caso de lesão leve, a reobase pode atingir valores mais baixos já aos 8 dias em comparação com os animais não tratados.

O Gráfico 1 ilustra os dados obtidos para reobase.

Gráfico 1 – Resultados obtidos para reobase no eletrodiagnóstico de músculo tibial anterior normal, de animais com lesão leve ou severa do nervo ciático tratados ou não com estimulação elétrica.

■ = p > 0,05 comparado com normal

§ = p < 0,05 comparado com 30 S

* = p < 0,05 comparado com 8 L

¥ = p < 0,05 comparado com 8 ST

λ = p < 0,05 comparado com 30 L

3.2.2 Cronaxia

Nos dois tempos experimentais estudados e nos dois tipos de lesão a cronaxia apresentou-se significativamente maior que no músculo normal.

Os músculos tratados com EE apresentaram valores de cronaxia menores que os controles; seu valor caiu ao longo do tempo em todos os casos, sendo que nos músculos tratados. O Gráfico 2 resume os resultados referentes à cronaxia.

Gráfico 2 - Resultados obtidos para cronaxia no eletrodiagnóstico de músculo tibial anterior normal, de animais com lesão leve ou severa do nervo ciático tratados ou não com estimulação elétrica.

* = $p < 0,05$ comparado com 8 L

λ = $p < 0,05$ comparado com 30 L

$\S$ = $p < 0,05$ comparado com 30 S

3.2.3 Acomodação

Em comparação com os animais normais, os dados mostram valores de acomodação baixos aos 8 dias tanto para a lesão leve como para a lesão severa.

Pode-se observar que a cronaxia é melhor (mais alta) nos animais tratados quando comparados aos controles, exceto para lesão severa aos 30 dias.

O Gráfico 3 ilustra os valores obtidos para o parâmetro acomodação.

Gráfico 3 - Resultados obtidos para acomodação no eletrodiagnóstico de músculo tibial anterior normal, de animais com lesão leve ou severa do nervo ciático tratados ou não com estimulação elétrica.

* = $p < 0,05$ comparado com 8 L.

λ = $p < 0,05$ comparado com 30 L.

◇ = $p < 0,05$ comparado com 8 S

3.2.4. Coeficiente alfa

A análise dos dados do coeficiente alfa mostra que a aplicação da estimulação elétrica é capaz de elevar seu valor em todos os grupos tratados; no entanto, este valor se equivale estatisticamente ao valor do músculo normal somente para os músculos tratados aos 30 dias pós-lesão.

O Gráfico 4 mostra os resultados obtidos para o coeficiente de acomodação no eletrodiagnóstico.

Gráfico 4 - Resultados obtidos para o coeficiente de acomodação no eletrodiagnóstico de músculo tibial anterior normal, de animais com lesão leve ou severa do nervo ciático tratados ou não com estimulação elétrica.

■ = p > 0,05 comparado com normal

◇ = p < 0,05 comparado com 8 S

§ = p < 0,05 comparado com 30 S

* = p < 0,05 comparado com 8 L.

λ = p < 0,05 comparado com 30 L

3.3 Resultados da análise histopatológica qualitativa e estereológica

Todos os fragmentos de músculo processados para estudo em microscopia de luz puderam ser aproveitados e forneceram imagens para a análise estrutural.

Devido ao fato da lesão nervosa periférica ter sido parcial, o tecido muscular não foi afetado igualmente pelo processo de atrofia celular. Assim sendo, mesmo nos animais lesados havia áreas de tecido muscular histologicamente normal, sendo que estas eram mais extensas nos animais com lesão leve do que naqueles com lesão severa.

No tecido muscular dos animais normais (Figura 16 A) houve o predomínio absoluto de células musculares estriadas e o tecido conjuntivo estava representado pelo epimísio (bainha conjuntiva externa), que aparecia nos cortes histológicos da periferia muscular, pelo perimísio (finas trabéculas do tecido conjuntivo que envolvem os feixes musculares) e pelo endomísio (delicada bainha envolvendo cada uma das células musculares), de difícil visualização devido a sua pequena espessura. As células musculares cortadas transversalmente apresentavam diâmetro relativamente uniforme em toda extensão muscular com citoplasma compacto rico em miofibrilas e os característicos núcleos periféricos.

3.3.1 Análise qualitativa aos 8 dias

Os músculos dos animais que sofreram lesão leve do nervo ciático e foram sacrificados aos 8 dias, tanto os controles como os tratados com estimulação elétrica apresentavam fascículos dissociados devido à falência estrutural do perimísio (Figura 16B).

Nos grupos com lesão severa, os animais controles apresentaram alterações estruturais do endomísio, perimísio e menor diâmetro das células musculares, além da dissociação dos fascículos (Figura 16 C). Já os animais tratados com estimulação elétrica apresentaram músculos mais semelhantes ao padrão de normalidade, com células musculares de diâmetro uniforme, ainda que tenham exibido uma trama de colágeno fibrilar bastante desenvolvida no perimísio; o endomísio apresentou-se delgado e sem alterações estruturais. (Figura 16D)

3.3.2. Análise qualitativa aos 30 dias

Da mesma forma que aos 8 dias, os músculos dos animais controles apresentaram um acúmulo de colágeno fibrilar no perimísio e também no endomísio, sendo que esta alteração é mais discreta nos animais que sofreram lesão leve (Figura 16 E) e mais pronunciada naqueles submetidos à lesão severa (Figura 16 G). Neste último grupo, particularmente, houve um grande desarranjo estrutural com o colágeno ocupando grande parte do tecido.

Nos animais tratados, tanto aqueles com lesão leve (Figura 16 F) como naqueles de lesão severa (Figura 16 H), ocorre também um depósito de grande quantidade de colágeno fibrilar, porém disposto ordenadamente nas regiões de perimísio, mantendo a organização do endomísio. Outra característica dos músculos tratados é a homogeneidade de diâmetros das células musculares, que tendem a se assemelhar às células musculares normais.

PRANCHA

3.3.3 Resultados do estudo estereológico

Os dados obtidos no estudo estereológico para volume muscular, volume de tecido muscular, volume absoluto de tecido muscular, volume absoluto de colágeno, volume médio do miócito e a relação entre o volume de colágeno e o volume muscular estão representados na Tabela 2. O resultado da análise estatística destes dados estão assinalados na mesma tabela. Cada resultado será descrito no gráfico correspondente.

Tabela 2 – Valores (média±desvio padrão) obtidos no estudo estereológico de músculo tibial anterior normal, de animais com lesão leve ou severa do nervo ciático tratados ou não com estimulação elétrica.

	Normal	Lesão Leve				Lesão Severa			
		Controle		Tratado		Controle		Tratado	
		8 L	30 L	8 LT	30 LT	8 S	30 S	8 ST	30 ST
Vol. M	0,521 ± 0,087	0,289 [■] ± 0,021	0,32 [■] ± 0,021	0,334 ^{■*} ± 0,022	0,381 ^{λ■} ± 0,034	0,300 [■] ± 0,007	0,325 [■] ± 0,012	0,336 ^{◇■} ± 0,015	0,364 ^{§■} ± 0,031
Vol. asb. tec. musc.	0,464 ± 0,32	0,199 [■] ± 0,14	0,266 [■] ± 0,34	0,291 ^{*■} ± 0,11	0,383 ^{€λ■} ± 0,49	0,219 [■] ± 0,29	0,189 [■] ± 0,13	0,312 ^{◇■} ± 0,24	0,331 ^{§■} ± 0,37
Vol. abs. col.	0,036 ± 0,015	0,021 [■] ± 0,006	0,063 ^{*■} ± 0,01	0,037 [*] ± 0,013	0,056 ^{λ■} ± 0,012	0,029 [■] ± 0,003	0,089 ^{◇λ■} ± 0,016	0,043 [◇] ± 0,012	0,049 ^{§■} ± 0,008
Vol. cel. musc. (mm³ x 1000)	1,93 ± 0,86	1,64 ± 0,38	1,53 [■] ± 0,55	1,73 ± 0,23	1,42 [■] ± 0,173	0,95 ^{*■} ± 0,37	0,96 [■] ± 0,230	1,60 [◇] ± 0,45	1,39 ^{§■} ± 0,040

■ = p , 0,05 comparado ao normal

* = p < 0,05 comparado com 8 L.

€ = p < 0,05 comparado com 8 LT ◇ = p < 0,05 comparado com 8 S

λ = p < 0,05 comparado com 30 L § = p < 0,05 comparado com 30 S

3.3.3.1 Volume absoluto do músculo tibial anterior

A análise mostra que em todos os grupos o volume do músculo tibial anterior foi estatisticamente menor que no animal normal ($p < 0,05$). Além disso, cada um dos grupos tratados apresentou um volume maior que seu respectivo controle ($p < 0,05$), como ilustrado no Gráfico 5.

Gráfico 5 - Resultados obtidos para o volume absoluto do músculo tibial anterior normal, de animais com lesão leve ou severa do nervo ciático tratados ou não com estimulação elétrica.

* = $p < 0,05$ comparado com 8 L.

λ = $p < 0,05$ comparado com 30 L

◇ = $p < 0,05$ comparado com 8 S

§ = $p < 0,05$ comparado com 30 S

3.3.3.2 Volume absoluto ocupado pelo tecido muscular

A análise mostrou que o volume absoluto do tecido muscular, ou seja o volume ocupado pelas células musculares propriamente ditas, foi menor no em

todos os grupos estudados quando comparado com o normal. Além disso, demonstrou-se que, em comparação com os controles não tratados, o volume de células musculares foi maior nos grupos tratados, tanto para a lesão leve como para a lesão severa.

Observou-se ainda que nos casos de lesão leve tratada com estimulação elétrica houve uma melhora significativa entre o dia 8 e dia 30 lesão; o mesmo não ocorreu na lesão severa, que logo no dia 8 apresentou-se já maior que o controle e permaneceu neste patamar aos 30 dias.

Estes resultados estão ilustrados no Gráfico 6.

Gráfico 6 - Resultados obtidos para o **volume absoluto do tecido muscular** de animais normais, de animais com lesão leve ou severa do nervo ciático tratados ou não com estimulação elétrica.

* = $p < 0,05$ comparado com 8 L.

λ

= $p < 0,05$ comparado com 30 L

§

= $p < 0,05$ comparado com 30 S

◊ = $p < 0,05$ comparado com 8 S

€

= $p < 0,05$ comparado com 8 LT

3.3.3.3 Volume médio das células musculares

Os dados mostraram que, na lesão leve, as células musculares, tanto no grupo tratado como no grupo controle tiveram um volume médio semelhante ao normal aos 8 dias pós-lesão.

Já na lesão severa não tratada, o volume médio das células foi significativamente menor já aos 8 dias e continuou assim aos 30 dias pós-lesão.

Também observou-se que nos casos de lesão severa os animais tratados apresentaram o volume médio dos miócitos estatisticamente maiores que os controles.

O Gráfico 7 ilustra estes resultados.

Gráfico 7 - Resultados obtidos para o **volume médio de células musculares** de animais normais, de animais com lesão leve ou severa do nervo ciático tratados ou não com estimulação elétrica.

■ = p , 0,05 comparado ao normal
◇

= p < 0,05 comparado com 8 S

* = p < 0,05 comparado com 8 L
§

= p < 0,05 comparado com 30 S

3.3.3.4 Volume absoluto de colágeno fibrilar

A análise do volume absoluto do colágeno revela que nas lesões controles seja leve ou severa, há inicialmente (aos 8 dias) uma diminuição significativa do conteúdo de fibras de colágeno em relação ao músculo normal. A estimulação elétrica, nos dois casos, foi capaz de manter o volume de colágeno em níveis semelhantes ao normal.

Nas lesões não tratadas, o conteúdo de colágeno aumenta muito, com diferenças significativas em relação ao normal e aos grupos de 8 dias. No entanto, nos animais com lesão severa e tratados pela estimulação elétrica, o volume de colágeno se mantém aos 30 igual ao animal de 8 pós-lesão e semelhante ao controle. O Gráfico 8 resume estes resultados.

Gráfico 8 - Resultados obtidos para o volume absoluto de colágeno fibrilar no músculo tibial anterior de animais normais, de animais com lesão leve ou severa do nervo ciático tratados ou não com estimulação elétrica.

■ = p < 0,05 comparado ao normal

◇

= p < 0,05 comparado com 8 S

*

= p < 0,05 comparado com 8 L

§

= p < 0,05 comparado com 30 S

3.3.4 Análise histopatológica do nervo ciático

A análise dos fragmentos de nervo ciático mostrou que houve lesão dos feixes axonais. No entanto, não foi possível distinguir histologicamente os nervos dos animais dos grupos de lesão leve ou lesão severa. Tanto aos 8 dias como aos 30 dias observaram-se sinais de desorganização estrutural, como o perineuro muito delgado e de perfil sinuoso, presença de poucas fibras mielinizadas e grande quantidade de núcleos de células não-neuronais, possivelmente de células de Schwann (Figura .17)

Figura 17 – Micrografia de um corte histológico mostrando uma região do nervo ciático lesado. Notar a sinuosidade do perineuro e a grande concentração de 3. núcleos de células não neuronais (objetiva: 20x).

3. 4 Resultados do estudo biomecânico

Cinco animais de cada grupo foram testados, totalizando 40 músculos submetidos ao teste de tração. O comprimento de cada pata a ser submetida ao

teste de tração foi medido após a dissecação. Para cada teste foi gerado um diagrama força x deslocamento, como o pertencente a um animal do grupo 8LEE, exemplificado na **Figura 18**.

Figura 18 - Diagrama força X deslocamento gerado durante o ensaio de tração, realizado em um músculo 8LEE. A Força está no eixo da ordenada e o deslocamento está na abscissa. A Força Máxima corresponde ao pico da curva, a partir do qual o músculo não oferece mais resistência à tração.

Nos músculos íntegros a separação iniciou-se sempre no terço médio do ventre muscular coincidindo com a região de ruptura dos músculos que sofreram a desnervação tanto leve como severa dos grupos controle e tratado aos 8 dias após a lesão. Já para os músculos que sofreram o teste de tração aos 30 dias após a lesão nervosa periférica a separação entre as extremidades distendidas, iniciou-se sempre nas extremidades proximal ou distal do músculo.

Tabela 3 – Valores (média±desvio padrão) obtidos para os parâmetros do **teste biomecânico** de músculo tibial anterior normal, de animais com lesão leve ou severa do nervo ciático tratados ou não com estimulação elétrica.

	Normal	Lesão Leve				Lesão Severa			
		Controle		Tratado		Controle		Tratado	
		8 L	30 L	8 LT	30 LT	8 S	30 S	8 ST	30 ST
Tensão	504,4 ± 63,17	522,9 ± 94,18	854,55 ^{■*} ± 78,22	605,3 [■] ± 77,97	767,52 ^{■€} ± 91,50	489,05 ± 49,31	850,49 ^{■◇} ± 64,54	571,35 ± 87,52	670,75 ^{■§} ± 144,85
Rigidez	2,50 ± 0,54	1,78 [■] ± 0,47	3,0 ^{■*} ± 0,65	2,40 [*] ± 0,38	3,10 ^{■€} ± 058	1,85 [■] ± 0,56	2,90 ^{■◇} ± 0,16	2,40 [◇] ± 0,30	2,50 ± 0,36
Deformidade relativa	30,37 ± 4,98	23,36 [■] ± 2,52	23,96 [■] ± 0,63	23,94 [■] ± 4,49	24,69 [■] ± 2,01	25,12 [■] ± 4,0	22,05 [■] ± 1,29	21,63 ^{■◇} ± 1,12	26,97 ^{§¥} ± 2,92

■ = p , 0,05 comparado ao normal
 € = p < 0,05 comparado com 8 LT
 λ = p < 0,05 comparado com 30 L
 ¥ = p < 0,05 comparado com 8 ST

* = p < 0,05 comparado com 8 L.
 ◇ = p < 0,05 comparado com 8 S
 § = p < 0,05 comparado com 30 S

3.4.1. Tensão máxima

Da análise dos dados observou-se que a tensão máxima foi aumentando à medida que o processo de regeneração neural progrediu no tempo.

Aos dias, a ten

Nos grupos controles aos 30 dias a tensão máxima se apresentou significativamente elevada em relação ao músculo normal.

Nos animais de 8 dias pós- lesão a tensão mostrou-se parecida com aquela dos músculos normais, exceto para a lesão leve de 8 dias na qual o tratamento elevou ligeiramente a tensão máxima.

Aos 30 dias, houve um grande aumento da tensão em todos os músculos lesados, porém o aumento da tensão foi menor naqueles músculos lesados e

tratados com estimulação elétrica. O Gráfico 9 mostra os resultados obtidos para tensão máxima.

Gráfico 9 - Resultados obtidos para os valores de tensão máxima do músculo tibial anterior de animais normais, de animais com lesão leve ou severa do nervo ciático tratados ou não com estimulação elétrica.

■ = p , 0,05 comparado ao normal

€ = p < 0,05 comparado com 8 LT

§ = p < 0,05 comparado com 30 S

* = p < 0,05 comparado com 8 L.

◇ = p < 0,05 comparado com 8 S

3.4.2 Rigidez

Nos músculos controles aos 8 dias a rigidez mostrou-se menor que aquela do músculo controle, enquanto que nos tratados este parâmetro manteve-se semelhante ao normal.

Aos 30 a rigidez cresceu ao longo do processo de regeneração neural, porém no grupo tratado com lesão severa a rigidez ainda permaneceu semelhante ao padrão normal.

O Gráfico 10 mostra os dados obtidos para rigidez.

Gráfico 10 - Resultados obtidos para os valores de **rigidez** do músculo tibial anterior de animais normais, de animais com lesão leve ou severa do nervo ciático tratados ou não com estimulação elétrica.

■ = p , 0,05 comparado ao normal

€ = p < 0,05 comparado com 8 LT

§ = p < 0,05 comparado com 30 S

* = p < 0,05 comparado com 8 L.

◊ = p < 0,05 comparado com 8 S

3.5.3 Deformidade Relativa Percentual

Exceto para o grupo lesão severa tratado com estimulação elétrica, todos os demais apresentaram valores de deformidade relativa menores que o normal. O grupo 30 ST apresentou diferença neste parâmetro quando comparado ao grupo 30 S e 8 ST.

O grupo 8 ST apresentou uma deformidade ainda menor que o seu respectivo controle. O Gráfico 11 ilustra estes achados.

Gráfico 11 - Resultados obtidos para os valores de deformação relativa percentual do músculo tibial anterior de animais normais, de animais com lesão leve ou severa do nervo ciático tratados ou não com estimulação elétrica.

◇ = $p < 0,05$ comparado com 8 S

§ = $p < 0,05$ comparado com 30 S

X = $p > 0,05$ comparado ao normal

§ = $p < 0,05$ comparado com 8 ST

3.6 Estudo da marcha

A observação visual da marcha dos animais revelou que houve uma melhora ao longo do tempo, sendo que logo após a lesão a pata apresentava pouca dorsiflexão e aos 30 dias era já possível realizar a dorsiflexão parcial.

Pode-se notar também que, inicialmente, a distribuição da descarga de peso era maior na pata esquerda íntegra do que na direita lesada. Ao longo do tempo este parâmetro também melhorou.

O comprimento da pegada e a abertura total dos dedos medidos no papel milimetrado foram aumentando ao longo do tempo. Os cálculos feitos a partir das pegadas foram usados para a determinação do Índice Funcional do Ciático (IFC), mostrados na Tabela 3.

Tabela 3 – Valores (média±desvio padrão) do Índice Funcional do Ciático de animais com lesão leve ou severa do nervo ciático tratados ou não com estimulação elétrica.

	Lesão Leve				Lesão Severa			
	Controle		Tratado		Controle		Tratado	
	8 L	30 L	8 LT	30 LT	8 S	30 S	8 ST	30 ST
Índice Funcional do Ciático	- 81,07 ± 8,4	- 68,98* ± 6,7	- 61,56* 4,5±	- 55,08 ^λ ± 8,5	- 77,39 ± 16,01	- 62,08 [◇] ± 4,6	- 62,23 [◇] ± 8,2	- 57,34 [§] ± 3,4

* = p < 0,05 comparado com 8 L.

^λ = p < 0,05 comparado com 30 L

[◇] = p < 0,05 comparado com 8 S

[§] = p < 0,05 comparado com 30 S

Comparando-se cada grupo tratado com seu respectivo controle, os valores de IFC são significativamente menores, indicando um possível efeito benéfico da estimulação elétrica.

No entanto deve-se notar que nos animais não tratados o IFC também caiu ao longo do tempo (Gráfico 12).

A estimulação elétrica se mostrou especialmente benéfica diminuindo o IFC logo no primeiro período após a lesão tanto para a lesão leve como para a severa.

Gráfico 12 - Resultados obtidos para os valores de Índice Funcional do Ciático de animais com lesão leve ou severa do nervo ciático tratados ou não com estimulação elétrica.

■ = p , 0,05 comparado ao normal

€ = p < 0,05 comparado com 8 LT

§ = p < 0,05 comparado com 30 S

* = p < 0,05 comparado com 8 L.

◇ = p < 0,05 comparado com 8 S

DISCUSSÃO

Trabalhos experimentais com utilização de EE em músculos desnervados são de extremo interesse para profissionais de reabilitação, uma vez que há controvérsias sobre as evidências científicas para seu uso clínico (TOMORI et al.,2010). Mais ainda, para que o tratamento clínico dos pacientes possa evoluir faz-se necessário associar os resultados obtidos com as avaliações clínicas, às alterações morfofisiológicas provocadas pelas diversas modalidades terapêuticas, informação essa que só é possível de se obter através de estudos experimentais com animais e *in vitro*.

Para a interpretação dos resultados foram concorrem testes biomecânicos que possibilitam analisar toda a unidade músculo-tendínea, avaliação estereológica da composição tecidual do músculo estudado, eletrodiagnóstico e uma avaliação funcional da marcha.

. Um dos problemas que deve ser levado em consideração em estudos como este, é a dificuldade de se produzir lesões padronizadas no nervo. (VAREJÃO et al., 2004). Ainda que no estudo histopatológico do músculo tenha sido possível observar mais indicadores de atrofia, como a fibrose e o menor diâmetro das células musculares, nem sempre foi possível obter parâmetros diversos para a lesão leve e severa.

Os dados do eletrodiagnóstico mostraram que em todos os animais estudados os valores de reobase, cronaxia, acomodação e coeficiente alfa tenderam a se deslocar no sentido dos valores obtidos no músculo normal. No entanto, deve-se ressaltar que a estimulação elétrica acentuou esta tendência levando a valores bem mais próximos do normal que nos animais não tratados. A manutenção dos valores nos patamares iniciais indicariam que não houve a regeneração neural, caracterizando a desnervação muscular (POLONIO et al., 2010).

Especialmente, no caso da reobase, a estimulação elétrica promoveu a reversão aos padrões absolutos de normalidade mesmo nas lesões severas. Estes dados estão de acordo com RUSSO et al. 2007, indicando que houve a regeneração neural.

O presente estudo reafirma a importância da realização do eletrodiagnóstico na reabilitação para se determinar os parâmetros adequados para indução da contração durante o tratamento. O eletrodiagnóstico deve ser

feito periodicamente para se fazer os ajustes dos parâmetros, que garantam a contração muscular desejada, uma vez que estes variam durante a evolução do tratamento.

Ainda em relação ao eletrodiagnóstico os nossos resultados são opostos aqueles de GIGO-BENATO et al. (2010) que encontrou os valores de cronaxia menores nos músculos desnervados e tratados EE quando comparados com não tratados, usando os mesmos parâmetros de estimulação elétrica. Uma leitura atenta aos métodos utilizados por estes autores revela que foram produzidas 20 contrações máximas do tibial anterior em cada sessão. Nossas observações durante um estudo piloto para testar a viabilidade dos parâmetros de estimulação elétrica mostraram que a partir da 16ª. contração máxima ocorria a fadiga muscular (e por isso optamos por produzir apenas 15 contrações em cada sessão). É provável que a fadiga muscular tenha influenciado desfavoravelmente o desempenho do músculo no eletrodignóstico no trabalho de GIGO-BENATO et al. (2001).

Como pode ser observado, o músculo desnervado, tanto nos animais tratados como nos controles, apresentou menor volume absoluto. Tal fato pode ser explicado pela atrofia que acomete os músculos desnervados, com degradação de elementos citoplasmáticos, membranosos e extracelulares (KAARIANEN et al., 1998). Nossos dados estão de acordo com TAKEKURA et al. (1996) que apontam para uma redução de cerca de 50% da massa muscular na primeira semana pós-lesão; a seguir, continuam perdendo volume podendo chegar até mesmo a 18% do inicial (TOMORI et al., 2010).

A alteração histológica preponderante no músculo desnervado foi a atrofia por desuso. É interessante observar que a lesão severa, ao contrário da leve, provoca

a diminuição do volume miócito logo nos primeiros dias pós-lesão e a aplicação do estímulo elétrico é capaz de reverter este fenômeno, mantendo valores melhores (no sentido de serem mais parecidos como os valores normais) mesmo após 30 dias. Uma vez que o volume da célula muscular está relacionado à quantidade de elementos contráteis citoplasmáticos, não há dúvidas que a estimulação elétrica teve um efeito benéfico que, como consequência, levou ao aumento do volume absoluto de tecido muscular nos animais com lesão severa tratados com estimulação elétrica.

Nos animais não tratados houve uma tendência de diminuição da quantidade de colágeno aos 8 dias pós-lesão. Isso talvez possa ser explicado pela reação do músculo à desnervação, uma vez que há uma modificação importante do balanço de fatores tróficos e da condição eletro-química do tecido. Este desequilíbrio afetaria não somente a célula muscular como também o tecido conjuntivo das bainhas, que inicialmente, reagiria então, com a degradação parcial da trama colagênica acompanhando a atrofia muscular inicial (atrofia esta confirmada pela diminuição do volume absoluto muscular). Em seguida, ainda nos animais controles, a tendência é de aumento progressivo da quantidade de colágeno fibrilar, caracterizando um quadro de fibrose (confirmada pela análise histopatológica), mais ou menos grave segundo a severidade da lesão.

No entanto, nos músculos tratados, com aplicação de estímulos elétricos, observou-se já aos 8 dias pós-lesão, a presença de uma trama colagênica mais vigorosa quando se compara com os controles. Uma limitação do nosso estudo é não poder descrever se estes músculos tratados estão sendo estimulados a sair precocemente da fase de degradação inicial da matriz extracelular (que foi

descrita nos controles) ou se a estimulação elétrica evitou que a trama colagênica sofresse este colapso inicial.

No entanto, vale ressaltar aqui o papel desempenhado pela estimulação elétrica na modulação na deposição de colágeno aos 30 dias. Na base da argumentação para esta afirmação estão os resultados obtidos mostrando que, sem a aplicação dos estímulos elétricos, houve a deposição de grandes quantidades de colágeno que se depositou tanto no endomísio como no perimísio, desorganizando a estrutura muscular. Por outro lado, a aplicação dos estímulos elétricos foi capaz de inibir níveis maiores de fibrose e a disposição das fibras de colágeno se restringiu ao perimísio, mantendo assim o ambiente da periferia celular (endomísio) em condições mais próximas da normalidade, permitindo a troca eficiente de nutrientes e catabólitos entre a célula muscular e o meio extracelular.

Assim sendo, a estimulação elétrica parece agir, inicialmente, a favor da manutenção da rede de colágeno e, posteriormente, limitando a deposição desorganizada da matriz extracelular. Estes achados estão de acordo com aqueles encontrados por PIEDADE et al., 2008, que estudaram os efeitos da aplicação do ultra-som em lesão lacerativa do gastrocnêmio.

Ao comparar a Tensão máxima do músculo normal em relação aos desnervados observa-se que os músculos desnervados aos 8 dias após a lesão suportam a tração de forma igual ao músculo normal; mas, com o passar do tempo essa situação se inverte, ou seja, os músculos desnervados passam a resistir mais ao teste de tração em relação aos músculos íntegros. Esse resultado pode estar associado a uma maior deposição de fibras de colágeno nos músculos

desnervados o que certamente confere maior resistência a esses músculos no teste de tração.

Os resultados dos testes biomecânicos se associam os achados histopatológicos. A tensão máxima é maior 30 dias após a lesão coincidindo com a maior quantidade de colágeno. Interessantemente, o músculo do animal com lesão severa tratado apresentou uma tensão máxima significativamente menor que o controle, o que pode indicar que a maior organização das fibras de colágeno encontrada nos músculos tratados seja responsável pela menor tensão neste grupo.

De fato, estes achados coincidem com Piedade et al. (2008) que indica que a melhor organização do colágeno na reparo muscular induzida pelo ultrassom corresponde a valores de tensão máxima mais próximos do normal no gastrocnêmio de ratos.

A análise da rigidez é um parâmetro essencial para a avaliação das propriedades mecânicas musculares, pois sua redução indica que o músculo está se alongando mais na presença de cargas menores, o que leva a uma maior susceptibilidade às lesões.

Os valores de rigidez nos músculos controles aos 8 dias eram menores que os no músculo normal. Este achado também se correlaciona com os dados relativos ao colágeno fibrilar nestes músculos, uma vez que os cortes histológicos exibiram padrões de desestruturação do perimísio com afastamento dos fascículos musculares. Tal desorganização pode ter contribuído fortemente para a queda da rigidez muscular nestes animais, tal como foi postulado por MACKENNA et al. (1997) para o músculo cardíaco, nem sempre uma maior

densidade de fibras colagênicas implica uma rigidez tecidual maior, uma vez que seu arranjo e distribuição também são revelantes.

Apenas o grupo lesão severa tratado foi capaz de desenvolver a mesma Deformação Relativa Percentual encontrada nos músculos íntegros. Talvez este comportamento possa estar associado ao alto grau de organização tecidual que estes animais apresentaram.

Todos os animais que sofreram desnervação apresentaram um IFC pós-lesão pior em relação ao IFC pré-lesão, mostrando dessa forma, que tanto a lesão leve quanto a severa foram suficientes para desenvolver um déficit funcional na marcha desses animais. A EE agiu precocemente com melhoria do IFC detectada logo aos 8 dias pós-lesão.

Estudos estruturais mostraram que músculos denervados células com várias alterações: as miofibrilas mostram-se mais finas, em menor número e são frequentemente descontínuas, além de mostraram-se fora de registro em relação à organização sarcomérica. Nos espaços entre as miofibrilas encontra-se maior quantidade de material citoplasmático amorfo, mitocôndrias e fragmentos de retículo sarcoplasmático e membranas do sistema T. Demonstrou-se que a EE nos músculos denervados resulta em uma forte recuperação estrutural, com miofibrilas mais largas e estreitamente empacotadas e em registro (SALMONS; JARVIS, 2008).

O fato de que a EE tenha induzido uma maior organização e agregação das miofibrilas pode ter sido responsável por termos encontrado uma resposta mais semelhante ao músculo normal nos parâmetros de eletrodiagnóstico.

Embora este estudo tenha apontado diversos aspectos que falam a favor da aplicação clínica da estimulação elétrica é sempre importante levar em

consideração as limitações da aplicação direta destes achados na prática terapêutica. Por outro lado, a estimulação elétrica direta é a é método popular de se estimular músculos esqueléticos de pacientes em reabilitação.

Para estabelecer os mecanismos celulares que estariam na base das respostas observadas neste estudo são necessários estudos da expressão gênica dos moléculas controladoras da síntese e degradação de macromoléculas no tecido tanto nas células musculares como nos fibroblastos do tecido conjuntivo associado.

5. CONCLUSÕES

a) Os dois graus de lesão nervosa periférica propostas neste estudo não evidenciam diferenças significativas nas análises biomecânicas e funcional da marcha.

b) O tratamento com estimulação elétrica estimula as propriedades biomecânicas (tensão máxima, rigidez e deformidade relativa) do músculo desnervado que sofreram lesões severas uma vez que biomecanicamente essas variáveis são mais parecidas com os músculos normais em relação aos grupos que não sofreram tratamento algum. A saber, a tensão máxima foi estimulada tanto aos 8 quanto aos 30 dias, a rigidez 8 dias e a deformação relativa aos 30 dias .

c) O estudo estereológico mostrou que a estimulação elétrica promove uma modulação da deposição do colágeno fibrilar.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Al-Amood WS, Lewis DM, Schmalbruch H. Effects of chronic electrical stimulation on contractile properties of long-term denervated rat skeletal muscle J Physiol. 1991; 441:243-56.
- Ashley Z, Sutherland H, Lanmuller H et al., Determination of the chronaxie and rheobase of denervated limb muscles in conscious rabbits. Artif Organs 2005; 29:212-215.
- Ashley Z, Salmons S, Boncompagni S, Protasi F, Russold M, Lanmuller H, Mayr W, Sutherland H, Jarvis JC. Effects of chronic electrical stimulation on long-term denervated muscle of the rabbit hind limb. J Muscle Res Cell Motil 2007;28:203-217 a.
- Ashley Z, Sutherland H, Lanmuller H, Russold MF, Unger E, et al. Atrophy, but not necrosis, in rabbit skeletal muscle denervated for periods up to one year. Am J Physiol 2007; 292: C440-C451 b.
- Ashley Z, Sutherland H, Russold MF, Lanmüller H, Mayr W, Jarvis JC, Salmons S. Therapeutic stimulation of denervated muscle: the influence of pattern. Muscle Nerve. 2008; Jul; 38 (1):875-86.
- Bain, J.R., Mackinnon, S.E., and Hunter, D.A. (1989). Functional evaluation of complete sciatic, peroneal, and posterior tibial nerve lesions in the rat. Plast. Reconstr. Surg. 1989; 83, 129–136.
- Baker LL, Wederich CL, McNeal DR, Newsam CJ, Waters RL. Physiologic Principles of Electrical Stimulation. In: Neuro Muscular Electrical Stimulation. A practical guide. Rancho, 4th ed. 2000; pp 23-46.
- Bendszus M, Koltzenburg M, Wessing C & Solymosi L. Sequential MR imaging of denervated muscle: Experimental Study. Am J Neuroradiol. 2002; 23:1427-1431
- Binder-Macleod SA. Force-frequency relation in skeletal muscle. In: Dynamics of Human Biologic Tissues, DP Currier and RM Nelson, eds. FA Davis, Philadelphia, PA, 1992; pp 97-113.
- Bodine SC, Latres E, Baumhueter S, Lai VK, et al. Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. Science 2001; 294:1704–1708.
- Borg TK, Caulfield JB. Morphology of connective tissue in skeletal muscle. Tissue Cell. 1980 12 (1):197-207.
- Braga-Silva J, Gehlen D, Roman JA, et al. Efeito das células tronco adultas de medula óssea e do plasma rico em plaquetas na regeneração e recuperação funcional nervosa em um modelo de defeito agudo em nervo periférico em ratos. Acta Ortop. bras. 2006; v.14 n.5.
- Bruck W. The role of macrophages in Wallerian degeneration. Brain Pathol 1997; 7:741-752.

- Carlson BM, Billington L & Faulkner . Studies on the regenerative recovery of long-term denervated muscle in rats. *Restor Neurol Neurosci*. 1996; 10, 77-84.
- Castro CES, Longo GJ, Parizotto NA. A importância do eletrodiagnóstico de estímulo na terapia excitomotora. *Rev Paul Fisioter*. 1980; 2:54-68.
- Choi BH, Zhu SJ, Kim BY et al. Transplantation of cultured bone marrow stromal cell to improve peripheral nerve regeneration. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2005; 34:537-42.
- Crisco JJ, Jokl P, Heinen GT, Connell MD, Panjabi MM. A muscle contusion injury model. *Am J Sports Med*. 1994; 22 (5): 702-710.
- Daneyemez M, Solmaz I& Izci Y. Prognostic factors for the surgical management of peripheral nerve lesions. *Tohoku J. Exp. Med*. 2005, 205, 269-275.
- De Medinaceli L, Freed WJ, Wyatt RJ. An index of the functional condition of rat sciatic nerve based on measurements made from walking tracks. *Exp Neurol*. 1982; 77:634-43.
- Dow DE, Carlson BM, Hassett CA, Dennis RG and Faulkner JA. Electrical stimulation of denervated muscles of rats maintains mass and force, but not recovery following grafting. *Res Neurol Neuroscience* 2006; 24, 41-54.
- Dow DE, CedernaPS, Hassett CA, Dennis RG, Faulkner JA. Electrical stimulation prior to delayed reinnervation does not enhance recovery in muscle of rat. *Restor Neurol Neurosci*. 2007; 25(5-6):601-10.
- Finol HJ, Lewis DM, Owens R. The effects of denervation on contractile properties or rat skeletal muscle, *J Physiol* 1981; 319: 81-92.
- Eberstein, A, Eberstein, S. Electrical stimulation of denervated muscle: is it worthwhile? *Medicine and Science in Sports and exercise*, New York, 1996, v. 28, n. 12 p. 1469.
- Fischer E. The effect of faradic and galvanic stimulation upon the course of atrophy in denervated skeletal muscle. *Am J Physiol*. 1939;127:605-18.
- Fukuda Y.T. In: Importância do estudo eletrodiagnóstico [online]. Jun. 2007. Disponível:<http://movimento.incubadora.fapesp.br/portal/referencias/Fukuda/eletroterapia/mofototerapia/Eletrodiagnóstico.pdf>. [capturado em: 4 de março. 2008].
- Gargiulo P, Vatnsdal B, Ingvarsson P, Knútsdóttir S, Gudmundsóttir V, Yngvason S, Helgason T. Restoration of muscle volume and shape induced by electrical stimulation of denervated degenerated muscles: qualitative and quantitative measurement of changes in rectus femoris using computer tomography and image segmentation. *Artif Organs*. 2008 Aug; 32 (8) :609-13.
- Gasparini ALP, Barbieri CH & Mazzer N. Correlação entre diferentes métodos de avaliação funcional da marcha de ratos com lesão por esmagamento do nervo isquiático. *Acta Ortop Bras*, 2007; 15, 5:285-289.
- Gundersen HJ and Osterby R. Optimizing sampling efficiency of stereological studies in biology: or „do more less well“. *J Microsc*.1981; 121(Pt 1): 65-73.

- Gundersen HJ. Stereology of arbitrary particles. A review of unbiased number and size estimators and the presentation of some new ones, in memory of William R. Thompson. J Microsc. 1986 Jul;143(Pt 1):3-45.
- Gundersen HJG, Bendtsen TF, Korbo L, Marcussen N, Møller, Nielsen K, Nyengaard JR, Pakkenberg B, Sørensen, Vesterby A, West MJ. Some new simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. APMIS 1988; 96: 379-394.
- Gutmann E, Zelena J. Morphological change in the denervated muscle. In: Gutmann E, ed. The Denervated Muscle, Chapter 2. Prague Czechoslovak Academy of Sciences, 1962; 57-102.
- Guyton, C.A.; Hall, E.J. Tratado de fisiologia médica, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.
- Howard CV, Reed MG. Unbiased stereology. Three-dimensional measurement in microscopy. 2nd ed. Abingdon, Oxon: Garland Science/Bios Scientific. 2005:103-117.
- Järvinen M. Healing of a crush injury in rat striated muscle: 4. effect of early mobilization and immobilization on the tensile properties of gastrocnemius muscle. Acta Chir Scand. 1976; 142: 47-56.
- Junqueira LCU, Cossermelli W, Brentani RR. Differential staining of collagens type I,II and III by sirius red and polarization microscopy. Arch Histol Jpn 1978; 41: 267-74.
- Kääriäinen M, Kääriäinen J, Järvinen TLN, Sievänen H, Kalimo H, Järvinen M. Correlation between biomechanical and structural changes during the regeneration after laceration injury of skeletal muscle. J Orthop Res, 1998; 16: 197-206.
- Kanaya F, Firrell J, Tsai TM, Breidenbach WC. Functional results of vascularized versus nonvascularized nerve grafting. Plast. Reconstr. Surg. 1992; 89, 924-930.
- Kern H, Hofer C, Mödlin M, et al. Denervated muscles in humans: limitations and problems of currently used functional electrical stimulation training protocols. Artif Organs 2002; 26: 216–8.
- Kern H, Boncompagni S, Rossini K, et al. Long-term denervation in humans causes *degeneration* of both contractile and excitation-contraction coupling apparatus, which is reversible by functional electrical stimulation (FES): a role for myofiber regeneration? J Neuropathol Exp Neurol 2004; 63:919–31.
- Kern H, Hofer C, Mödlin M, et al. Stable muscle atrophy in long-term paraplegics with complete upper motor neuron lesion from 3- to 20-year SCI. Spinal Cord 2007; 46:293–304.
- Kobayashi J, Mackinnon SE, Watanabe O, Ball DJ, Gu XM, et al. The effect of duration of muscle denervation on functional recovery in the rat model. Muscle Nerve. 1997; 20, 858-866.
- Kukulka CG: Human skeletal muscle fatigue. In: Dynamics of Human Biologic Tissues, DP Currier and RM Nelson, eds. FA Davis, Philadelphia, PA, 1992, pp 163-181.

- Lainetti RD, Silva CF. Local addition of monosialoganglioside GM1 stimulates peripheral axon regeneration in vivo. *Braz J Med Biol Res.* 1998; 26:841-5.
- Lehto M, Duance VC, Restall D. Collagen and fibronectin in a healing skeletal muscle injury. *J Bone Joint Surg*, 1985; 67-B (5): 820-828.
- Lieber RL. Skeletal muscle structural, function & plasticity. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2002. Ed. Pphiladelphia Lippincott, USA; 2002; P448
- Lima DC, Caeirão OM, Peviani SM, Russo TL, Somazz MC, Salvini TF, Teodori RM, Minamoto VB. Muscle and nerve responses after different intervals of electrical stimulation sessions on denervated rat muscle. *Am J Phys Med Rehabil.* 2009; vol 88, n.10.
- Luís AL, Amado S, Geuna S, Rodrigues JM et al. Long-term functional and morphological assessment of a standardized rat sciatic nerve crush injury with a non-serrated clamp. *J Neurosci Methods.* 2007; 15;163 (1):92-104.
- Machado ABM. Neuroanatomia Funcional. In :Tecido nervoso. 2ªed. Editora Atheneu. São Paulo, 2003. pp17 – 33.
- Mandarim-de-Lacerda CA. Stereological tools in biomedical research. *An Acad Bras Cienc.*2003; 75 (4): 469-486.
- Margreth A., Salviati G., Di Mauro S., Turati G. Early biochemical consequences of denervation in fast and slow skeletal muscle and relationship to neural control over muscle differentiation. *J Biochem.* 1972; 126, 1099-1110.
- Marqueste T, Alliez JR, Allun O, Jammes Y & Decherchi P. Neuromuscular rehabilitation by treadmill running or electrical stimulation after peripheral nerve injury and repair. *J Appl Physiol.* 2004; 96:1988-1995.
- Mayhew TM. Stereology and the placenta: where's the point? – a review. *Placenta* 27 (Suppl A), *Troph Res* 2006; 27:S17-S25.
- Mayhew TM. Taking tissue samples from the placenta: an illustration of principles and strategies. *Placenta.* 2008; 29:1-14.
- Merletti R, Pinelli P. A critical appraisal of neuromuscular stimulation and electrotherapy in neurohabilitation. *Eur Neurol* 1980; 19 (1):30-2.
- Midrio M. The denervated muscle: facts and hypotheses. A historical review. *Eur J Appl Physiol.* 2006; 98:1-21.
- Monte-Raso VV, Barbieri CH, Mazzer N, Fazan VPS. Effects of therapeutic ultrasound on injuries due to crushing of the sciatic nerve in rats: functional evaluation of gait. *Rev bras fisioter.* 2006; V. 10 n. 1.
- Mühlfeld C, Nyengaard JR, Mayhew TM. A review of state-of-the-art stereology for better quantitative 3D morphology in cardiac research. *Cardiovasc Pathol.* 2010;19:65-82.
- Neto JC, Vasconcelos BC, Sobral AP, da Silva VA Jr, Nogueira RV. Clinical and histopathologic study of the use of gangliosides for nerve regeneration in rats after axonotmesis. *J Oral Maxillofac Surg.* 2007; 65:870-4.

- Nordin M, Frankel VH. Basic biomechanics of the musculoskeletal system. 3rd ed. Lippincott Williams & Wilkins 2001.
- Oliveira LS, Sobral LL, Takeda SY, Betini J, Guirro RR, Somazz MC, Teodori RM. Electrical stimulation and swimming in the acute phase of axonotmesis: their influence on nerve regeneration and functional recovery. *Rev Neurol*. 2008; Jul 1-15;47(1):11-5.
- Perry VH, Brown MC, Gordon S. The macrophage response to central and peripheral nerve injury. *Journal of Experimental Medicine*. 1987; 165, 1218±1223.
- Piedade MCB, Galhardo MS, Battelhner CN, Ferreira MA, Caldini EG, Toledo OMS. Effect of Ultrasound Therapy on the Repair of Gastrocnemius Muscle Injury in Rats. *Ultrasonics* 2008; 48: 403-411.
- Polônio JT, Barbieri CH, Mattiello-Sverzut AC. Eletroestimulação seletiva mantém estrutura e função do tibial anterior desnervado de ratos. *Acta ortop. bras*. 2010; vol.18 no.2.
- Rantanen J, Ranne J, Hurme T, Kalimo H. Denervated segments of injured skeletal muscle fiber are reinnervated by newly formed neuromuscular junctions. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1995; V 54,n.2, pp188-194.
- Reis FA, Belchior ACG, Nicolau RA, Fonseca TS, Carvalho PTC. Efeito da terapia com laser de arsenieto de gálio e alumínio (660nm) sobre a recuperação do nervo ciático de ratos após lesão por neurotmesa seguida de anastomose epineural: análise funcional. *Rev. Bras. Fioter*. 2008; 12(3):215-21.
- Reynolds JL, Urbanek MS, Asato H, Kuzon Jr WM. Deletion of individual muscle alters rat walking-track parameters. *J. Reconstr. Microsurg*. 1996; 12 461-466.
- Ribeiro CMBI; Vasconcelos BCEII; Silva JC, et al. Histopathological analysis of gangliosides use in peripheral nerve regeneration after axonotmesis in rats. *Acta Cir. Bras*. 2008; vol.23 no.4.
- Riley DA, Ilyina-Kakueva EI, Ellis S et al., skeletal muscle fiber, nerve, and blood vessel breakdown in space-flown rats. 1990; 4: 84-9.
- Romão AM, Viterbo F, Stipp E, Garbino J, Rodrigues JA. Eletroestimulação do músculo Tibial cranial após esmagamento do nervo fibular comum: estudo neurofisiológico e morfométrico no rato. *Rev Bras Ortop*. 2007;42(3):41-6
- Russo T, Franca C, Castro C, Salvini TF. Alterations of chronaxie, rheobase and accommodation in denervated skeletal muscle submitted to electrical stimulation. *Braz J Phys Ther* 2004; 8: 169-175.
- Russo TL, Peviani SM, Freria CM, Benato DG, 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 & Jarvis J. Functional electrical stimulation of denervated muscles: an experimental evaluation. *Artif Organs*. 2008; 32 (8) 597-603.
- Scherer SS., Salzer J. Axon-Schwann cell interaction during peripheral nerve degeneration and regeneration. *J Glial development* London: Oxford University Press. 2003; p 299-330.

- Schlaepfer WW, Bunge RP. The effects of calcium ion concentration on the degeneration of amputated axons in tissue culture. *J Cell Biol* 1973; 59:456-470.
- Schmalbrucher H, Al-Amoody WS, Lewis DM. Morphology of long-term denervated rat soleus muscle and the effect of chronic electrical stimulation. *J Physiol* 1991; 441:233-241.
- Seddon, HJ. Three types of nerve injury. *Brain*, 1943; 66, 237-288.
- Sendtner M, Stöckli KA, Thoenen H. Synthesis and localization of ciliary neurotrophic factor in the sciatic nerve of the adult rat after lesion and during regeneration. *J Cell Biol* 1992; 118: 139-148.
- Sobeski JK, Kerns JM, Safanda JF, Shott S, Gonzalez MH. Functional and structural effects of GM-1 ganglioside treatment on peripheral nerve grafting in the rat. *Microsurgery*. 2001; 21:108-15.
- Son YL, Thompson WJ. Schwann cell processes guide regeneration of peripheral axons. *Neuron* 1995; 14, 125±132.
- Squecco R, Kern H, Biral D, Rossini K & Francini F. Mechano-sensitivity of normal and long term denervated soleus muscle of the rat. *Neurol Res*. 2008; Mar; 30(2):155-9.
- Stickler Y, Martinek J, Hofer C, et al. A finite element model of electrically stimulated human thigh: Changes due to denervation and training. *Artif Organs*. 2008; 32(8): 620-624.
- Stoll G and Muller H W. Nerve Injury, Axonal Degeneration and Neural Regeneration. *Brain Pathology*. 1999; 9:313-325.
- Sunderland, S. Nerve and nerve injuries. 2nd ed. Churchill Livingstone. 1978; pp133-141.
- Sunderland S. Nervios periféricos y sus lesiones 2 ed. Barcelona: Salvat; 1985.
- Takekura H, Kasuga N, Kitada K, Yoshioka T. Morphological changes in the triads and sarcoplasmic reticulum of rat slow and fast muscle fibres following denervation and immobilization. *J Muscle Res Cell Motil*. 1996; 17:391-400.
- Takekura H, Tamaki H, Nishizawa T, et al. Plasticity of the transverse tubules following denervation and subsequent reinnervation in rat slow and fast muscle fibres. *J Muscle Res Cell Motil* 2003; 24: 439-451.
- Terenghi G. Peripheral nerve regeneration and neurotrophic factors. *J Anat*. 1999; 194(1):1- 14.
- Terris DJ, Cheng ET, Utley DS, Tarn DM, Ho PR, Verity NA. Functional recovery following nerve injury and repair by silicon tubulization: comparison of laminin-fibronectin, dialyzed plasma, collagen gel, and a phosphate buffered solution. *Auris Nasus Larynx* 1999; 26, 117-122.
- Tomori Kounosuke, Yukiko Ohta, Nishizawa Tomie, et al. Low-intensity electrical stimulation ameliorates disruption of transverse tubules and neuromuscular junctional architecture in denervated rat skeletal muscle fibers. *J Muscle Res Cell Motil* 2010; 31:195-205.

- Varejão AS, Meek MF, Robinson PH, Gramsbergen A. Methods to evaluate functional nerve recovery in adult rats: Walking track analysis, video analysis and withdrawal reflex. *J neurosci methods*. 2001; 96:89-96.
- Vrbova G, Mehra N, Shanmuganathan H, Tyreman N et al. Chemical communication between regenerating motor axons and Schwann cells in the growth pathway. *European Journal of Neuroscience*, 2009 v 30; pp 366-375.
- Weibel ER. Fleischner Lecture. Looking into the lung: what can it tell us? *AJR Am J Roentgenol* 1979; 133 (6):1021-31.
- Williams PE, Goldspink G. Connective tissue changes in immobilised muscle. *J. Anat.* 1984; 138 (21): 343-350.
- Wishart TM, Pemberton HN, James SR, Chris J McCabe CJ, Gillingwater TH. Modified cell cycle status in a mouse model of altered neuronal vulnerability (slow Wallerian degeneration; Wlds). *Genome Biol.* 2008; 9(6): p101.
- Yang DP, Zhang DP, Mark K, Bonder DE, Pomeroy SL AND Kim H. Schwann cell proliferation during Wallerian degeneration is not necessary for regeneration and remyelination of the peripheral nerves: axon-dependent removal of newly generated Schwann cells by apoptosis. *Mol Cell Neurosci.* 2008; May ; 38(1): 80– 88.
- Zeale DL, Rodriguez RJ, Kenny T et al. Electrical stimulation of a denervated muscle promotes selective reinnervation by native over foreign motoneurons. *J Neurophysiol* 2002; 87:2195-9.