



Revista Brasileira de Fisioterapia

ISSN: 1413-3555

rbfisio@ufscar.br

Associação Brasileira de Pesquisa e Pós-
Graduação em Fisioterapia
Brasil

Caierão, QM; Betini, J; Teodori, RM; Balisardo Minamoto, Viviane
O efeito do intervalo da estimulação elétrica no músculo desnervado de rato
Revista Brasileira de Fisioterapia, vol. 12, núm. 2, marzo-abril, 2008, pp. 143-148
Associação Brasileira de Pesquisa e Pós-Graduação em Fisioterapia
São Carlos, Brasil

Disponível em: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=235016537011>

- Como citar este artigo
- Número completo
- Mais artigos
- Home da revista no Redalyc



Sistema de Informação Científica
Rede de Revistas Científicas da América Latina, Caribe, Espanha e Portugal
Projeto acadêmico sem fins lucrativos desenvolvido no âmbito da iniciativa Acesso Aberto

O efeito do intervalo da estimulação elétrica no músculo desnervado de rato

The effect of time interval between electrical stimulation on the denervated rat muscle

Caierão QM¹, Betini J¹, Teodori RM^{1,2}, Minamoto VB^{1,2}

Resumo

Objetivo: Comparar o efeito da estimulação elétrica (EE) aplicada diariamente e em dias alternados na densidade de área do tecido conjuntivo (TC) e na área de secção transversa (AST) das fibras do músculo desnervado. **Materiais e métodos:** Trinta e cinco ratos foram divididos em grupos controle (C), desnervado (D), desnervado + eletroestimulado diariamente (EED) e desnervado + eletroestimulado em dias alternados (EEA). A aplicação da EE no músculo gastrocnêmio teve início 24 horas após lesão nervosa do tipo axoniotmese, sendo a mesma aplicada durante 20 e 30 dias. Cortes transversais foram corados com HE para mensurações da AST e densidade de área de TC. Análise estatística: teste *Shapiro Wilk*, seguido pela análise de variância (ANOVA) F (*one-way*) e teste de *Tukey* (5%). **Resultados:** Na análise da densidade de área do TC, observou-se que somente o Grupo EED apresentou valores similares ao Grupo C nos dois períodos analisados. No Grupo 20 dias, não houve diferença na AST quando comparados os grupos submetidos à EE com o Grupo D ($p > 0,05$), e após 30 dias todos os grupos experimentais alcançaram valores similares ao Grupo C. **Conclusões:** A EE não foi eficiente para minimizar a atrofia das fibras musculares. Entretanto, o TC foi responsivo à EE, sendo a aplicação diária mais benéfica ao músculo do que a aplicação em dias alternados, sugerindo que o intervalo de aplicação da EE em músculo desnervado é variável importante para as adaptações do TC.

Palavras-chave: desnervação; gastrocnêmio; tecido conjuntivo; hipertrofia; estimulação elétrica.

Abstract

Objective: To compare the effect of electrical stimulation (ES) applied daily and on alternate days, on the area density of the connective tissue (CT) and on the cross-sectional area (CSA) of the denervated muscle fibers. **Methods:** Thirty-five rats were divided into the following groups: control (C), denervated (D), denervated + daily electrical stimulation (D+DES) and denervated + alternate-day electrical stimulation (D+ES). The application of ES on the gastrocnemius was started 24 hours after nerve damage of axonotmesis type and was applied for 20 and 30 days. Cross-sections were stained with hematoxylin-eosin to measure the CSA and area density of CT. The statistical analysis consisted of the Shapiro Wilk test followed by analysis of variance (ANOVA) F (*one-way*) and the Tukey test ($p \leq 0.05$). **Results:** Analysis of the area density of CT showed that only the D+DES Group presented values similar to those of the C Group, for the two analysis periods. There was no difference in CSA in the 20-day Group between the ES Groups and the D Group ($p > 0.05$). After 30 days, all the experimental groups reached CSA values similar to the C Group. **Conclusions:** The ES was inefficient for minimizing the muscle fiber atrophy. However, the CT was responsive to ES, and daily applications were more beneficial for the muscle than were alternate-day applications, thus suggesting that the interval for applying ES to denervated muscle is an important variable for CT adaptation.

Key words: denervation; gastrocnemius; connective tissue; hypertrophy; electrical stimulation.

Recebido: 18/10/2007 – Revisado: 19/11/2007 – Aceito: 13/02/2008

¹ Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia, Universidade Metodista de Piracicaba (Unimep) – Piracicaba (SP), Brasil

² Curso de Fisioterapia, Unimep

Correspondência para: Viviane Balisardo Minamoto, Universidade Metodista de Piracicaba Curso de Mestrado em Fisioterapia, Rodovia do Açúcar, km 156, Bloco 7, CEP 13400-911, Piracicaba (SP), Brasil, e-mail: vbminamo@unimep.br

Introdução ::::

As fibras musculares apresentam íntima relação com o tecido conjuntivo (TC) que as envolve, sendo este importante para a manutenção da integridade e das propriedades do músculo esquelético, dentre as quais está a produção de movimento e força¹⁻³. Ambas as estruturas, fibra muscular e matriz extracelular (MEC), respondem, de forma direta, ao estímulo elétrico, por meio da contração dos filamentos de actina e miosina e regulação da síntese protéica na MEC, respectivamente⁴.

Desta forma, o comprometimento da inervação muscular afeta tanto a fibra muscular, evidenciado pela diminuição da área de secção transversa da fibra (AST)^{5,6}, como a MEC, observado pelo aumento do TC intramuscular^{6,7}. Como resultado, o músculo desnervado apresenta deficiência na sua função, observada pela diminuição da produção de força e aumento da resistência muscular passiva⁸⁻¹⁰.

Essas modificações ocorrem imediatamente após a desnervação e persistem enquanto o músculo está desprovido de suprimento nervoso. Caso a desnervação permaneça por longo período, o TC fibroso substituirá os elementos contráteis do músculo, inibindo completamente a regeneração muscular¹¹.

A estimulação elétrica (EE) é um recurso utilizado após lesão nervosa periférica, com o objetivo de minimizar a degeneração e a fraqueza muscular durante o período em que o nervo está se regenerando^{12,13}.

Estudos referentes ao uso da EE como forma de tratamento terapêutico são controversos entre si, devido aos diferentes parâmetros e protocolos utilizados na aplicação da EE. No entanto, eles são importantes para a compreensão dos efeitos desse recurso no músculo desnervado. Sabe-se que algumas variáveis, como diferentes intervalos de aplicação da EE ao longo de 24 horas¹⁴ e quantidade de estímulo por dia¹⁵, são determinantes nos resultados obtidos com este tipo de intervenção. Esses estudos mostraram que, enquanto cem contrações aplicadas diariamente, em intervalos constantes, foram eficientes para manter a massa e a força muscular, o mesmo número de contrações, durante quatro horas de sessão de EE, seguida por 20 horas de repouso, não foram suficientes para manutenção dessas variáveis¹⁴. Além disso, foi também observado que um número de 200 contrações foi o ideal para se obter efeitos significativos na massa e força muscular¹⁵. Os resultados deste último estudo também permitem concluir que, apesar de ser necessário um número mínimo de contrações, contrações em excesso podem aumentar o dano ao tecido, devido a grande quantidade de energia aplicada ao músculo. Estudo recente¹⁶ mostrou que 20 contrações diárias, eletricamente induzidas, não foram suficientes para prevenir a atrofia das fibras musculares. Importante enfatizar que Dow et al.¹⁵ e Russo et al.¹⁶ utilizaram diferentes parâmetros físicos da corrente, o que influencia os resultados encontrados.

Os efeitos da EE no músculo desnervado também podem ser dependentes da fase de regeneração na qual o nervo se encontra. Esta hipótese é fundamentada por estudos prévios, que mostram que o músculo innervado não responde à EE^{17,18}, sendo, portanto, esperada resposta diferenciada do músculo quando a EE é aplicada em diferentes fases da regeneração nervosa.

Deste modo, o objetivo deste estudo foi comparar as adaptações morfológicas do músculo gastrocnêmio desnervado após utilização de dois protocolos de aplicação de EE. Foi testada a hipótese de que tais adaptações seriam influenciadas pelo intervalo de aplicação de EE (aplicação em dias alternados ou diariamente). Além disso, foi estudado o efeito deste recurso durante diferentes períodos da lesão nervosa (20 e 30 dias após a mesma). Acredita-se que os resultados advindos deste estudo possam auxiliar na escolha de tratamento fisioterapêutico mais adequado para o músculo desnervado.

Materiais e métodos ::::

Trinta e cinco ratos *Wistar* (200 ± 50g) foram divididos aleatoriamente em sete grupos experimentais (n= 5/grupo): controle (C); desnervados e analisados após 20 e 30 dias (D-20, D-30); desnervados + eletroestimulados diariamente durante 20 e 30 dias (EED-20, EED-30) e desnervados + eletroestimulados em dias alternados (EEA-20, EEA-30). Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas, à temperatura de 23 ± 2 °C, com livre acesso à ração e água, e submetidos a ciclo claro/escuro de 12 horas. O experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), protocolo 008-06. Para os procedimentos de lesão nervosa, aplicação da EE e coleta do músculo, os animais foram anestesiados com injeção intramuscular de Ketalar® (cloridrato de ketamina; 50mg/mL) e Rompun® (cloridrato de tiazina; 2g/100mL), aplicada no músculo glúteo direito, na proporção de 1:1, em dose de 0,3mL/100g de peso corporal. Após a coleta do músculo, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical.

Protocolo para lesão nervosa e estimulação elétrica

O procedimento de lesão nervosa foi realizado segundo protocolo modificado previamente descrito¹⁹. Para isso, os animais foram submetidos à incisão de aproximadamente 15mm na região glútea esquerda, para exposição e lesão do nervo isquiático. O nervo foi submetido a esmagamento por meio de pinça hemostática, aplicando-se quatro pinçamentos com duração de 20 segundos e intervalo de um segundo entre eles. A pressão de pinçamento foi padronizada para todos os animais, utilizando-se como referência o segundo

dente da cremalheira⁷, sendo todos os pinçamentos realizados por um mesmo indivíduo.

A EE iniciou-se 24 horas após a lesão nervosa, e os animais foram eletroestimulados diariamente (segunda a sexta-feira) ou três vezes/semana, durante 20 ou 30 dias, conforme o grupo experimental. A corrente elétrica foi gerada pelo equipamento *Dualpex 961* (Quark, Brasil), utilizando-se dois eletrodos percutâneos auto-adesivos, com 1cm² de área, posicionados na região inguinal e sobre o músculo gastrocnêmio esquerdo. As variáveis da estimulação foram: forma de pulso quadrática bifásica simétrica, 3ms de largura de pulso, frequência de 10Hz e intensidade de 5mA, padronizada a partir da visualização da contração vigorosa do músculo. Para evitar acomodação do músculo ao estímulo, foi acrescido 1mA a cada cinco minutos de aplicação da corrente, totalizando 10mA ao final dos 30 minutos de eletroestimulação⁹. Em todas as sessões de EE, foi aplicado gel na superfície do eletrodo, com o objetivo de favorecer melhor acoplamento entre eletrodo e pele.

Coleta do material

Após a retirada do gastrocnêmio esquerdo, o ventre da porção medial do músculo foi congelado em isopentano, previamente resfriado em nitrogênio líquido, sendo as amostras armazenadas em nitrogênio líquido para subsequente análise. Para obtenção dos cortes histológicos, os músculos foram colados com *tragacanth gum* sobre uma placa de madeira. De todos os músculos foram obtidos cortes de 12µm de espessura, por meio de micrótomo criostato (Mod. 300, Ancap, Brasil), que foram corados com hematoxilina-eosina (H&E). O melhor corte histológico, livre de artefatos e vasos sangüíneos, foi escolhido e fotografado com objetiva de 20x em toda a sua extensão. As imagens foram obtidas por um microscópio óptico BX-41 (Olympus, Japão) acoplado à câmera digital C5050 (Olympus, Japão), sendo a densidade de área de TC mensurada por planimetria por contagem de pontos²⁰ utilizando o *software Image Pro Plus 4.0* (Media Cybernetics, EUA). A AST de aproximadamente 200 fibras/músculo foi mensurada utilizando-se o *software Motic Image Advanced 3.2* (Motic Instruments, Canadá).

Análise dos dados

Inicialmente, foi aplicado o teste *Shapiro-Wilk* para testar a normalidade entre os grupos. Em seguida aplicou-se o teste de *Levene* para verificar a homocedasticidade entre os grupos. Como todas variáveis apresentaram distribuição normal e homocedasticidade, foi aplicado a análise de variância (ANOVA) F (*one-way*), seguido pelo teste de *Tukey HSD*. Em todos os cálculos foi estabelecido um nível de significância de 5%. O *software* utilizado para os testes estatísticos foi *Statistical Package for Social*

Sciences for Personal Computer Windows (SPSS/PC, versão 11.0). Os valores estão expressos em média e desvio-padrão.

Resultados

Densidade de área do tecido conjuntivo

A distribuição da densidade de TC pode ser observada na Figura 1, na qual nota-se que sua proliferação foi mais evidente no perímio. Quanto ao padrão morfológico do músculo, observa-se que o grupo submetido à EE diária por 30 dias (Figura 1D) é o que apresenta morfologia mais similar ao músculo controle (Figura 1A).

Os Grupos D e EEA analisados após 20 dias apresentaram maior densidade de área de TC quando comparado ao Grupo C ($p=0,005$), sendo que o Grupo EED apresentou valor similar ao Grupo C (Tabela 1).

Nos animais analisados após 30 dias, foi observado que o Grupo D apresentou maior densidade de área de TC, quando

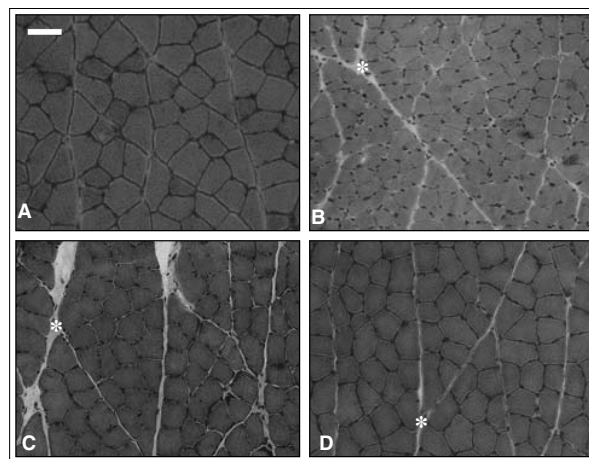


Figura 1. Corte transversal do músculo gastrocnêmio dos grupos C (A), D20 (B), D30 (C), EED30 (D). Observar densidade de tecido conjuntivo (asterisco), principalmente no perímio. Coloração H&E; Bar= 50µm, 20x.

Tabela 1. Porcentagem de densidade de área de tecido conjuntivo de todos os grupos experimentais.

Grupos		
Controle	12 ± 1,37	
	20 dias	30 dias
D	18 ± 3,50 [†]	15 ± 2,83*
EEA	17 ± 2,70 [†]	13 ± 2,46
EED	15 ± 2,47	11 ± 1,59

*quando comparado ao C e ao EED; $p \leq 0,0008$; [†]quando comparado ao C; $p < 0,005$; Desnervado (D), eletroestimulado em dias alternados (EEA) e eletroestimulado diariamente (EED).

comparado aos Grupos C e EED ($p \leq 0,0008$, Tabela 1). Além disso, não houve diferença dos grupos submetidos à EE quando comparado ao C.

Área de secção transversa das fibras musculares

Os animais dos Grupos D, EED e EEA analisados após 20 dias apresentaram diminuição da AST das fibras, quando comparados ao Grupo C ($p \leq 0,0000$, Tabela 2). Tanto a EED quanto a EEA não foram eficazes para evitar a atrofia muscular, uma vez que não houve diferença entre os grupos eletroestimulados e o D ($p > 0,05$, Tabela 2). Com relação ao período de

30 dias, todos os grupos apresentaram valor de AST similares entre si ($p > 0,09$, Tabela 2).

A maior concentração do número de fibras do Grupo C encontrou-se entre fibras de AST na razão de 1000-2999 μm^2 (86%). Por outro lado, os Grupos D, EEA e EED analisados após 20 dias apresentaram maior concentração de fibras com AST na razão de 1-1999 μm^2 (84 a 93%), mostrando atrofia nos músculos desnervados, independente do uso da EE (Figura 2A). Já os Grupos D, EEA e EED analisados após 30 dias apresentaram distribuição do número de fibras por AST similar à observada no Grupo C, com a maior concentração entre 1000-2999 μm^2 (87 a 92%) mostrando o restabelecimento da AST das fibras neste período (Figura 2B).

Tabela 2. Área de secção transversa das fibras musculares de todos os grupos experimentais.

Grupos		
Controle	2337 \pm 323 (μm^2)	
	20 dias (μm^2)	30 dias (μm^2)
D	1246 \pm 368*	2052 \pm 430
EEA	1394 \pm 179*	1999 \pm 347
EED	1579 \pm 207*	2078 \pm 203

*quando comparado ao C; $p < 0,0000$; Desnervado (D), eletroestimulado em dias alternados (EEA) e eletroestimulado diariamente (EED).

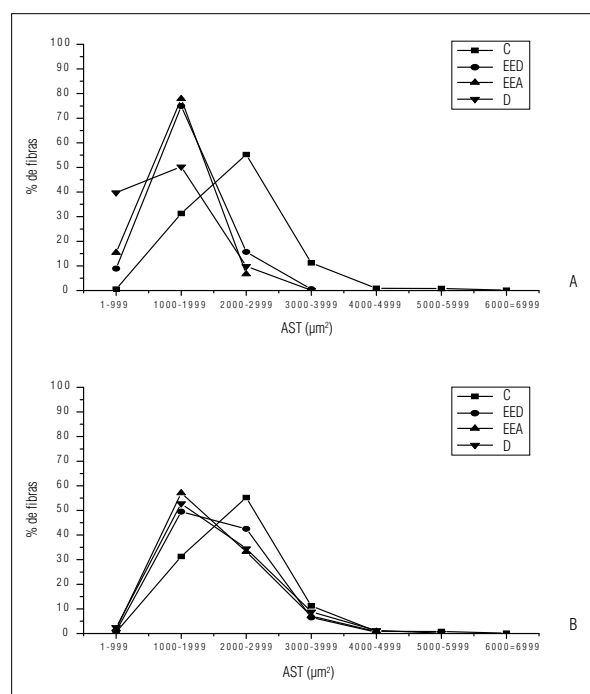


Figura 2. Frequência da distribuição do número de fibras musculares por área de secção transversa (AST) dos grupos controle (C), eletroestimulado diariamente (EED), eletroestimulado em dias alternados (EEA) e desnervado (D), nos períodos de 20 (A) e 30 (B) dias. Observar a concentração de fibras musculares com AST na razão de 1-1999 μm^2 nos grupos desnervados.

Discussão

Vários são os fatores que determinam a eficácia da utilização da EE no tratamento de músculos desnervados e, apesar do grande número de estudos realizados com o objetivo de determinar o melhor protocolo de tratamento^{14,15}, não foi encontrada, na literatura, a influência da aplicação diária e alternada nas adaptações musculares. A comparação entre esses dois tipos de aplicação da EE é importante, uma vez que não é conhecido se o intervalo de aplicação da EE é variável importante no tratamento de músculos desnervados. Outro interesse do presente estudo foi analisar os efeitos da EE em diferentes fases da regeneração nervosa. Assim, baseado em estudos prévios^{21,22}, a análise muscular ocorreu após 20 e 30 dias, quando o músculo encontra-se em uma fase de poliinervação, isto é, em uma fase de remodelamento neuromuscular e em um período de recuperação muscular quase completa, respectivamente.

Embora o TC e a fibra muscular sejam responsivos à atividade elétrica, os resultados apresentados sugerem que a resposta desses tecidos à EE seja dependente de quantidade de estímulo de contração diferenciado, uma vez que somente o TC foi responsivo ao tratamento aplicado. Uma hipótese pode ser que a simples contração muscular regule a expressão da MEC, enquanto que o estímulo hipertrófico seja dependente de uma sobrecarga muscular não atingida pela EE aplicada. Uma outra hipótese é de que exista uma resposta temporal diferenciada desses tecidos à EE, sendo a resposta hipertrófica da fibra muscular observada somente em longo prazo, após 30 dias de tratamento.

No período de 20 dias, observou-se que o intervalo de aplicação da EE é determinante para a adaptação do TC, pois somente o tratamento diário foi eficiente para manutenção da densidade de área do tecido dentro dos valores normais. Já nos grupos tratados por 30 dias, quando a maturação nervosa está

em processo mais avançado, o intervalo entre as sessões de tratamento parece não influenciar nesta manutenção, uma vez que tanto a EE diária quanto alternada manteve a densidade de área de TC similar ao valor controle. No entanto, somente o grupo submetido à estimulação diariamente apresentou resultado diferente do grupo desnervado.

A importância da atividade contrátil em evitar a proliferação do TC intramuscular, como observada neste estudo, também foi encontrada em estudo anterior²³, sendo que este mecanismo está, provavelmente, relacionado ao fato de que a expressão de genes da MEC seja regulada por estímulos físicos⁴. A manutenção da densidade de área de TC é importante, uma vez que o aumento deste tecido funciona como barreira mecânica que dificulta o suprimento sanguíneo para as fibras musculares, o que pode contribuir para a instalação da atrofia muscular²⁴ e também prejudicar o possível processo de reinervação muscular²⁵. Além disso, a densidade de área aumentada de TC faz com que as fibras colágenas tenham contato mais íntimo umas com as outras, podendo estimular a formação de ligação cruzada anormal, o que resulta em perda da extensibilidade e aumento na rigidez tecidual²⁶.

Além de sua influência na determinação da densidade da MEC, o estímulo físico é responsável pela organização da MEC^{4,27}. Esta organização é importante, pois as fibras musculares nem sempre se estendem de uma extremidade à outra do músculo, sendo a disposição do tecido indispensável para a transmissão adequada de força muscular³.

A rápida perda das proteínas musculares após desnervação ocorre principalmente nos componentes miofibrilares, que representam 60% das proteínas do músculo²⁸, sendo a atividade contrátil importante para manutenção da AST das fibras musculares¹⁵. No entanto, no presente estudo, os grupos eletroestimulados diariamente ou em dias alternados não mostraram, nos dois períodos analisados, resultados diferentes dos músculos apenas desnervados. Alguns fatores podem estar relacionados com esses resultados, como insuficiente quantidade de atividade elétrica ou estímulo inadequado de EE capazes de provocar hipertrofia muscular e curto período de análise para se observar alteração na AST das fibras. Estudo prévio¹⁵ mostrou que a EE foi capaz de manter a AST em músculo desnervado, porém, o protocolo de EE utilizado, distinto do utilizado no presente estudo, não é viável para o tratamento fisioterapêutico, uma vez que os autores utilizaram eletrodos implantados.

Apesar da atrofia observada após 20 dias da lesão nervosa, pode-se observar um aumento progressivo da AST ao longo do

tempo, sendo que a mesma restabeleceu-se espontaneamente em todos os grupos analisados após 30 dias da lesão nervosa. Este dado sugere que, após lesão nervosa do tipo axoniotmese, na qual o período de desnervação é curto (reinervação inicia-se no 14º após a lesão)²¹, o restabelecimento do estímulo elétrico voluntário é suficiente para reverter a atrofia do músculo de rato decorrente da desnervação transitória.

Importante ressaltar que, embora a EE não tenha sido eficiente para minimizar a diminuição da AST das fibras musculares, outras adaptações das fibras musculares, não analisadas neste estudo, podem ter ocorrido com a aplicação da EE. Estudos prévios mostraram que o estímulo elétrico melhora o metabolismo das fibras musculares²⁹, o que contribui para a manutenção do padrão energético das mesmas, favorecendo a contração muscular. Além disso, foi também observado que quando um músculo é submetido à contração, por pelo menos 30 minutos diários, ocorre aumento no volume de mitocôndrias e da capacidade enzimática, com conseqüente melhora da fadiga muscular³⁰.

Conclusões ::::

A lesão de nervo periférico provocou alterações significativas nas fibras musculares e no TC intramuscular do músculo gastrocnêmio de rato, sendo que a aplicação da EE teve efeito somente nas adaptações do TC. A aplicação diária da EE foi determinante para a resposta adequada do TC, mostrando que o intervalo de aplicação do estímulo elétrico durante o período de tratamento é variável importante para as adaptações deste tecido. Essa informação é importante, pois fornece subsídios para a escolha de protocolo de EE mais adequado para o músculo desnervado. Apesar da importância do estímulo elétrico para a manutenção da massa muscular, os protocolos de EE utilizados não foram eficientes para minimizar a atrofia muscular, sendo que o restabelecimento da AST das fibras ocorreu espontaneamente no período de 30 dias após a axoniotmese.

Agradecimentos ::::

Agradecemos à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp, 05/52720-0) e ao Fundo de Apoio à Pesquisa da Universidade Metodista de Piracicaba (FAP-Unimep, 384/05).



Referências bibliográficas : : : .

1. Huijing PA. Muscle as a collagen fiber reinforced composite: a review of force transmission in muscle and whole limb. *J Biomech.* 1999;32(4):329-45.
2. Lieber RL. Skeletal muscle structure, function, & plasticity: the physiological basis of rehabilitation. 2a ed. Philadelphia: Lippincott; 2002.
3. Järvinen TA, Józsa L, Kannus P, Järvinen TL, Järvinen M. Organization and distribution of intramuscular connective tissue in normal and immobilized skeletal muscles. An immunohistochemical, polarization and scanning electron microscopic study. *J Muscle Res Cell Motil.* 2002;23(3):245-54.
4. Aaron RK, Ciombor DM, Wang S, Simon B. Clinical biophysics: the promotion of skeletal repair by physical forces. *Ann N Y Acad Sci.* 2006;1068:513-31.
5. Soić-Vranić T, Bobinac D, Bajek S, Jerković R, Malnar-Dragojević D, Nikolić M. Effect of salbutamol on innervated and denervated rat soleus muscle. *Braz J Med Biol Res.* 2005;38(12):1799-805.
6. Fernandes KCBG, Polacow MLO, Guirro RRJ, Campos GER, Somazz MC, Pinto VF, et al. Análise morfométrica dos tecidos muscular e conjuntivo após desnervação e estimulação elétrica de baixa frequência. *Rev Bras Fisioter.* 2005;9(2):235-41.
7. Polacow MLO, Silva CA, Guirro RRJ, Campos MR, Borges JP. Estudo morfométrico do músculo sóleo denervado de ratos tratados pela associação de metformina e estimulação elétrica. *Rev Bras Fisioter.* 2003;7(1):77-84.
8. Salonen V, Lehto M, Kalimo M, Penttinen R, Aro H. Changes in intramuscular collagen and fibronectin in denervation atrophy. *Muscle Nerve.* 1985;8(2):125-31.
9. Ashley Z, Sutherland H, Lanmüller H, Russold MF, Unger E, Bijak M, et al. Atrophy, but not necrosis, in rabbit skeletal muscle denervated for periods up to one year. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2007;292(1):440-51.
10. Dow DE, Carlson BM, Hassett CA, Dennis RG, Faulkner JA. Electrical stimulation of denervated muscles of rats maintains mass and force, but not recovery following grafting. *Restor Neurol Neurosci.* 2006;24(1):41-54.
11. Lehto M, Alanen A. Healing of a muscle trauma. Correlation of sonographical and histological findings in a experimental study in rats. *J Ultrasound Med.* 1987;6:425-9.
12. Eberstein A, Eberstein S. Electrical stimulation of denervated muscle: is it worthwhile? *Med Sci in Sports Exerc.* 1996;28(12):1463-9.
13. Lomo T, Westgaard RH, Dahl HA. Contractile properties of muscle: control by pattern of muscle activity in the rat. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 1974;187(1086):99-103.
14. Dow DE, Faulkner JA, Dennis RG. Distribution of rest periods between electrically generated contractions in denervated muscles of rats. *Artificial Organs.* 2005;29(6):432-5.
15. Dow DE, Cederna PS, Hassett CA, Kostrominova TY, Faulkner JA, Dennis RG. Number of contractions to maintain mass and force of a denervated rat muscle. *Muscle Nerve.* 2004;30(1):77-86.
16. Russo TL, Peviani SM, Freria CM, Gigo-Benato D, Geuna S, Salvini TF. Electrical stimulation based on chronaxie reduces atrogin-1 and MyoD gene expressions in denervated rat muscle. *Muscle Nerve.* 2007;35(1):87-97.
17. Noronha MA, Camargo LC, Minamoto VB, Castro CES, Salvini TF. O efeito da estimulação elétrica neuromuscular (NMES) no músculo tibial anterior do rato. *Rev Bras Fisioter.* 1997;2(2):71-6.
18. Brasileiro JS, Salvini TF. Limites da estimulação elétrica neuromuscular no fortalecimento de músculos esqueléticos saudáveis e com déficit de força. *Fisioterapia Brasil.* 2004;5(3):224-30.
19. Bridge PM, Ball DJ, Mackinnon SE, Nakao Y, Brandt K, Hunter DA, et al. Nerve crush injuries--a model for axonotmesis. *Exp Neurol.* 1994;127(2):284-90.
20. Mathieu O, Cruz-Orive LM, Hoppeler H, Weibel ER. Measuring error and sampling variation in stereology: comparison of the efficiency of various methods for planar image analysis. *J Microsc.* 1981;121(1):75-88.
21. Carmignoto G, Finesso M, Siliprandi R, Gorio A. Muscle reinnervation--I. Restoration of transmitter release mechanisms. *Neuroscience.* 1983;8(3):393-401.
22. Gorio A, Carmignoto G, Finesso M, Polato P, Nunzi MG. Muscle reinnervation-II. Sprouting, synapse formation and repression. *Neuroscience.* 1983;8(3):403-16.
23. Williams PE, Catanese T, Lucey EG, Goldspink G. The importance of stretch and contractile activity in the prevention of connective tissue accumulation in muscle. *J Anat.* 1988;158:109-14.
24. Lu DX, Huang SK, Carlson BM. Electron microscopic study of long-term denervated rat skeletal muscle. *Anat Rec.* 1997;248(3):355-65.
25. Carter AJ, Kristmundsdóttir F, Gilmour J, Glasby MA. Changes in muscle cytoarchitecture after peripheral nerve injury and repair. *J Hand Surg.* 1998;23(3):365-9.
26. Borisov AB, Huang SK, Carlson BM. Remodeling of the vascular bed and progressive loss of capillaries in denervated skeletal muscle. *Anat Rec.* 2000;258(3):292-304.
27. Chiquet M. Regulation of extracellular matrix gene expression by mechanical stress. *Matrix Biology.* 1999;18(5):417-26.
28. Furuno K, Goodman MN, Goldberg AL. Role of different proteolytic systems in the degradation of muscle proteins during denervation atrophy. *J Biol Chem.* 1990;265(15):8550-7.
29. Forti F, Cancelliero KM, Guirro RRJ, Silva CA. Efeitos da glutamina e da estimulação elétrica sobre o perfil metabólico de músculos desnervados. *Rev Bras Educ Fis Esp.* 2004;18(3):273-81.
30. Williams RS, Garcia-Moll M, Mellor J, Salmons S, Harlan W. Adaptation of skeletal muscle to increased contractile activity. Expression of nuclear genes encoding mitochondrial proteins. *J Biol Chem.* 1987;262(6):2764-7.