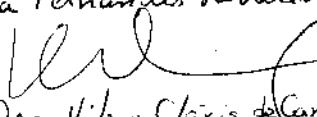


Este exemplar corresponde
à versão final da Tese de Mes-
trado apresentada à Faculdade
de Ciências Médicas de UNICAMP
pela médica Maria da Consolação
Gomes Cunha Fernandes Tavares.


Prof. Dra. Vilma Cloris de Carvalho
- Orientadora -

MARIA DA CONSOLAÇÃO GOMES CUNHA FERNANDES TAVARES

ASPECTOS MORFOLÓGICOS DO EFEITO DA ELETROTHERAPIA SOBRE O
MÚSCULO EXTENSOR LONGO DOS DEDOS DESNERVADO, DE RATOS

ORIENTADORA: PROF. DOUTORA VILMA CLORIS DE CARVALHO

DISSERTAÇÃO APRESENTADA A
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA
UNICAMP PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO
DE MESTRE EM MEDICINA.

CAMPINAS
1989

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

T197a

10639/BC

DEDICO :

A MINHA MÃE E A MINHA IRMÃ MARIA EDWIRGES

AO ROBERTO E AOS NOSSOS FILHOS

A PROFESSORA DOUTORA VILMA CLÓRIS DE CARVALHO,
QUE DURANTE O DECORRER DESTES TRABALHOS , PREOCUPOU-SE EM
FAZER DESTA DISSERTAÇÃO , ALÉM DE INSTRUMENTO DE
APRENDIZAGEM , MOTIVO PARA O MEU CRESCIMENTO PESSOAL.

AGRADECEMOS

Ao professor Doutor Humberto Santo Neto, pela eficiente coorientação e interesse por esta pesquisa.

Ao engenheiro eletrônico Roberto Fernandes Tavares Filho, pelo suporte técnico nas áreas de instrumentação e computação.

Ao professor Doutor Fausto Bérzin, pela colaboração nos testes eletromiográficos e pela amizade a nós dedicada.

Aos docentes do departamento de anatomia da UNICAMP, que colaboraram nesta pesquisa, em especial, ao professor Francesco Langone pelo trabalho de estatística e ao professor José Angelo Camilli pela colaboração nas fotografias de microscopia óptica.

A professora Doutora Mary Anne Heide Dolder, pelo ensinamentos de microscopia eletrônica e incentivo na realização desta pesquisa.

A professora Doutora Maria Alice da Cruz Hofling, pelo interesse e sugestões.

A todos os funcionários do Departamento de Anatomia da UNICAMP, de modo especial ao senhor Antonio Carlos Fucharelli, que muito nos ajudou no cuidado e manipulação dos animais.

A bióloga Antonia Maria Ferreira Lima pela valiosa colaboração, principalmente durante o trabalho de fixação e inclusão do material para microscopia eletrônica.

A funcionária Maria Tereza de Paula pelo interesse e eficiência na confecção das fotografias.

Ao físico Carlos Alberto de Paula Leite, pelas sugestões e acompanhamento no uso do microscópio eletrônico.

PROCEDÊNCIA DAS SUBSTÂNCIAS UTILIZADAS

Acetato de Uranila	Merk, R.F.A.
Acetona P.A.	Merk, R.F.A.
Cacodilato de Sódio	Sigma Chemical Co.
Citrato de Chumbo	Polysciences Inc
DDSA	R.P.Cargille Labs Inc
DMP-30	Polysciences Inc
Epoxy (Epon 812)	R.P.Cargille Labs Inc
Etanol	Merk, R.F.A.
Formaldeído - 35%	Merk, R.F.A.
Glutaraldeído 25%	Merk, R.F.A.
Hidrato de Cloral a 10%	Merk, R.F.A.
MNA	R.P.Cargille Labs Inc
Óxido de Propileno	Aldrich Chemical Co.
Paraformaldeído	Merk, R.F.A.
Tetróxido de Ósmio	Sigma Chemical Co.

PROCEDÊNCIA DOS EQUIPAMENTOS UTILIZADOS

Camara fotográfica MC 63	Zeiss, West Germany
Microcomputador NAJA	Kemitron, Brasil
Microscópio Eletrônico de transmissão	Zeiss, West Germany
Ultramicrotomo Porter Blum MT2	Ivan Sorvalli Inc Maryland USA

ÍNDICE

1. Introdução	1
2. Revisão da Literatura	4
3. Material e Métodos	1
4. Resultados	28
5. Discussão	52
6. Conclusão	67
7. Bibliografia	68
Anexos	81

1. INTRODUÇÃO

Em pesquisa médica, o número de variáveis importantes e de difícil padronização torna a avaliação de alguns métodos terapêuticos extremamente difícil e subjetiva. É portanto essencial que cada hipótese levantada seja examinada e verificada através de experiências em animais e de observações na prática médica e da repetição de uma mesma pesquisa em vários centros. É importante que haja distinção segura dos resultados onde se constata relação causa-efeito, daqueles resultados que ocorreram de forma aleatória.

Em medicina e em particular, em medicina de reabilitação, observa-se o uso rotineiro de algumas técnicas que nem sempre foram submetidas à análise rigorosa.

O fato de ser a eletroterapia de músculos desnervados uma técnica muito usada em vários centros de reabilitação, com considerável custo e grande desconforto para o paciente, torna o seu estudo criterioso, importante em termos de política de saúde.

Estudos experimentais realizados em animais de várias espécies, têm mostrado o valor da eletroterapia em retardar a atrofia muscular consequente

à desnervação [14,21,67,37,52,60,62,29,35,7,24]. No entanto, alguns pesquisadores como Schimrigk et al (1977) , Girlanda et al (1982) e Nix & Dahm (1987) não observaram em seus trabalhos este potencial terapêutico da estimulação elétrica sobre o músculo desnervado. Estudos realizados em pacientes são escassos. No trabalho de Valencic et al (1986), foi observado uma melhora de resposta motora devido à estimulação elétrica crônica do músculo tibial anterior desnervado. No entanto, no final do programa de estimulação elétrica , nenhum destes pacientes apresentou melhora no padrão de reinervação. Observamos entretanto que a amostragem deste trabalho foi pequena , constando apenas de um grupo de nove pacientes. Conforme observaram Merletti & Pinelli (1980) e Nix & Dahm (1987), os estudos feitos com relação à efetividade da eletroterapia nas condições práticas em que é empregada ,são escassos e as opiniões contraditórias.

Para o estabelecimento da real utilidade da eletroterapia no tratamento de neuropatias periféricas, mais estudos fazem se necessários para , entre outros aspectos: a)verificar a superioridade desta técnica quando comparada com estímulos mecânicos (massagem, movimentação passiva), térmicos, etc; b)estabelecer a dosagem terapêutica efetiva;c)determinar o mecanismo de ação; d)investigar a possibilidade de efeitos indesejáveis tais como dificultar a reinervação , causar

contraturas, etc .

Nosso trabalho tem como objetivo:

1-Realizar, a nível de microscopia óptica, estudos morfométricos que avaliem a eficácia da estimulação elétrica em músculos desnervados.

2-Observar, a nível de microscopia eletrônica , efeitos da eletroterapia em aspectos morfológicos da fibra muscular, que possam favorecer a compreensão do seu mecanismo de ação.

2. REVISÃO DE LITERATURA

A história do emprego da eletroterapia no tratamento do músculo desnervado evoluiu em três fases distintas:

Primeira fase: da descoberta da eletricidade até o início das pesquisas, voltadas especificamente para a determinação do efeito da eletroterapia, para a prevenção da atrofia muscular de desnervação. Esta fase inicia-se toda revestida de mistério e fantasia para culminar com a descoberta e desenvolvimento de aparelhos bem controlados capazes de produzir várias formas de corrente e com o emprego da eletroterapia com várias finalidades em medicina.

Segunda fase: expressa em trabalhos que tinham como objetivo comprovar a eficácia da eletroterapia em prevenir a atrofia muscular consequente à desnervação e determinar a forma de onda, dosagem e técnica de aplicação capaz de obter o efeito desejado. Os métodos disponíveis na época eram simples e pouco precisos.

Terceira fase: caracteriza-se por estudos utilizando

técnicas mais sofisticadas de microscopia, métodos histoquímicos e eletromiográficos para observação do efeito da eletroterapia no músculo desnervado com o objetivo de descobrir o mecanismo de ação, a melhor forma de aplicação e a dosagem mais efetiva.

PRIMEIRA FASE

A aplicação terapêutica da corrente elétrica teve início na antiguidade com o emprego da eletricidade animal. Assim, o médico romano Seribonius Largo, contemporâneo do imperador Cláudio (10 AC-35DC) utilizava esta forma de tratamento em enfermos da mente. Nesta época, a eletroterapia era considerada uma forma de tratamento misteriosa e não apresentava nenhum fundamento científico. Conta-se por exemplo, que no tempo do imperador romano Tiberius, um escravo emancipado de nome Antero, durante um passeio pelas margens do rio Tibre, tropeçou num peixe elétrico e ficou curado de sua gota. Desta forma totalmente empírica o emprego da eletroterapia manteve-se até o século XVI [41].

No século XVI, William Gilbert, médico da família real da Inglaterra escreveu sobre mais de vinte descobertas com relação ao uso da eletricidade com finalidades curativas e passou a ser considerado o pai da eletroterapia moderna [8,41].

As referências históricas relatam que a primeira personalidade a usar a eletricidade como agente terapêutico foi Johan Gottob Krueger, no ano de 1674. No entanto, o primeiro médico a empregar a eletroterapia de forma mais sistemática foi Jean Louis Jallabert que conseguiu produzir contrações musculares por meio de centelhas elétricas. Por volta de 1745 Privatti e Abbet Nollet já discutiam a utilização terapêutica da corrente elétrica sendo que nesta época só era conhecida a máquina eletrotástica. Em 1780 surgiu a corrente galvânica. As experiências de Galvani tiveram o grande mérito de iniciar o estudo da eletrofisiologia, ao demonstrar que o músculo pode manifestar qualidades contráteis, quando submetido a um estímulo elétrico eficaz. Galvani interpretou a sua experiência como prova da existência de eletricidade no corpo humano, que se descarregava ao tocar o metal. Foi Volta, o descobridor da pilha elétrica, quem deduziu que a eletricidade originada do contacto de dois metais diferentes era capaz de provocar contração muscular. Mas o termo corrente galvânica foi conservado e Galvani foi consagrado como o descobridor do fenómeno da contração muscular sob o efeito da corrente elétrica [8,50].

Com a descoberta do fenómeno da indução por Faraday , em 1831 , surgiu a possibilidade de estimular músculos e nervos com correntes elétricas alternadas sob controle. Vieram em seguida os trabalhos de Duchenne e

de Remack e a inversão da forma polar de Erb [41].

A partir da primeira grande guerra, deu-se notável incremento à tecnologia das fontes de produção das correntes utilizáveis em medicina, através do desenvolvimento da válvula e, após a segunda guerra mundial, com o desenvolvimento dos transistores. A partir daí grande número de aparelhos foram surgindo, tornando possível o emprego da eletricidade com várias finalidades no diagnóstico e tratamento das doenças. As pesquisas começaram então a surgir e evoluir em cada área de aplicação da eletroterapia [8,41,50].

SEGUNDA FASE

Por volta de 1940 começou a surgir o interesse no emprego dos pulsos de corrente elétrica no tratamento do músculo desnervado. Várias pesquisas foram feitas a partir de então com o objetivo de comprovar a eficácia da eletroterapia em prevenir a atrofia de desnervação [14,15,21,37,38,39,67] . Os pesquisadores utilizavam músculos diferentes de várias espécies de animais em seus trabalhos e a dosagem e forma de aplicação da corrente elétrica era escolhida aleatoriamente. Os métodos de avaliação eram pouco precisos e constavam de medidas do peso do músculo, do diâmetro global do músculo, etc. Estes fatos explicam a

frequente contradição observada nos vários trabalhos desta época.

Gutmann & Gutmann (1944) , empregando estimulação elétrica galvânica no músculo tibial anterior esquerdo desnervado de coelhos observaram uma menor perda de peso deste músculo, menor quantidade de fibrose e fibras musculares maiores quando comparado com um grupo de animais desnervados e não estimulados. Este efeito foi maior quando o tratamento foi iniciado precocemente.

Wehrmacher et al, (1945) e Kosman et al, (1947) - (a), aplicando estimulação farádica no músculo gastrocnêmio desnervado de ratos, por duas semanas após desnervação, encontraram um peso de 30 a 38% maior no músculo desnervado e tratado quando comparado com aquele não tratado. A diferença cai para 10 a 15 % após um mês de tratamento.

Corrente direta interrompida, (galvânica) e corrente sinusoidal lenta, mostraram-se eficazes em diminuir a atrofia quando utilizadas durante períodos de tempo variados após desnervação (14,21,38,39,52,62). Quando a frequência sinusoidal aumenta, a duração de cada fase diminui, tendendo a apresentar-se como corrente farádica.

Estimulando com correntes alternadas na frequência de 25 cps , Kosman et al (1947)-(a) encontraram que o músculo gastrocnêmio desnervado de

ratos, estimulado, pesou aproximadamente 40% mais que o músculo desnervado não estimulado. Wehrmacher et al (1945), estimulando o músculo gastrocnêmio desnervado de ratos com corrente direta interrompida, encontraram uma diferença de peso entre o grupo tratado e o não tratado, de 29%. Mas, Pollock et al (1951) trabalhando com corrente sinusoidal (60cps, quatro a seis mA, 16 ms de duração) não observaram limitação na atrofia muscular de desnervação no mesmo grau que os outros investigadores. Herbison (1971), admitiu que a discrepância dos resultados era consequente à diferença na dosagem do estímulo elétrico empregado pelos vários pesquisadores. Assim, se o grupo de Pollock tivesse aumentado a intensidade da corrente, a duração e o número de sessões, os resultados poderiam ter sido diferentes. Hines et al (1945) e Wehrmacher et al (1945), encontraram que a efetividade da eletroterapia em retardar a atrofia muscular de desnervação é proporcional à intensidade da corrente. Wehrmacher et al (1945) afirmaram ainda, que a intensidade ótima da corrente é aquela que provoca a máxima contração, independente da forma de corrente utilizada.

Wehrmacher et al (1945) observaram que tratamentos diários de 5, 11, 22, 45, 90 e 180 segundos de corrente farádica aplicados por duas semanas seguindo desnervação eram igualmente efetivos em retardar a atrofia muscular de desnervação em ratos. Com corrente

galvânica, Kosman et al (1947)-(b) e Gutmann & Guttmann (1944) não encontraram diferenças nos resultados quando a eletroterapia era aplicada em sessões de tratamento de 30 segundos e de 15 ou 20 minutos, respectivamente.

Schaffer et al (1954) empregaram estimulação farádica por quinze minutos duas vezes ao dia no rato e observaram limitação no processo de atrofia.

Na maioria dos estudos, foram dadas uma a duas sessões de tratamento [14,15,21, 30, 38, 39,52,62,66,67].

Wehrmacher et al (1945) e Kosman et al (1947)-(b) compararam a efetividade da eletroterapia quanto à frequência das sessões de tratamento e concluíram que a eficácia do tratamento é em grande parte proporcional à frequência das sessões.

Kosman et al (1947)-(b) estudando a influência do período de repouso entre as sessões, observaram que um tempo adequado entre as sessões é importante para obter-se os efeitos benéficos de tratamentos frequentes e repetidos.

Elliott & Thompson (1963) estabeleceram que o tipo de contração interfere no resultado do tratamento. Assim, a contração isométrica preserva melhor o peso do músculo, a composição química e a velocidade de contração e o tratamento isotônico é mais efetivo em manter a performance de trabalho.

Kosman et al (1947)-(a) observaram que o

músculo gastrocnêmio de rato, contraíndo contra a resistencia de vinte e cinco miligramas, retarda a atrofia em dezenove por cento, enquanto os mesmos pesquisadores e Fischer & Ramsey (1946) , em experimentos independentes, demonstraram que a diferença entre o músculo desnervado e estimulado e o não estimulado aproxima-se a quarenta por cento, quando o tratamento é aplicado com o músculo mantido em posição de estiramento (contração isométrica).

Steinberger et al (1968) após seis e dezoito meses de estimulação do músculo bíceps femural desnervado e reinervado de coelho, não observaram diferenças significativas entre os grupos tratados e não tratados, quanto à intensidade do estímulo requerido para provocar uma resposta muscular perceptível.

A forma de colocação dos eletrodos é importante e a falta de padronização deste aspecto pode explicar a diferença dos resultados em vários estudos. Zebo (1967) mostrou que a tensão decresce à medida que o eletrodo ativo distancia-se do eletrodo de registro.

Herbison (1971) estudou o efeito da estimulação elétrica dos músculo gastrocnêmio e quadríceps desnervados de ratos, utilizando pulsos de duração de 0.2 , 100 e 25 ms e frequencias de 20, 2 e 20 Hertz respectivamente , nos seus vários grupos de estudo. Os resultados mostraram diferenças significativas e o autor nesta época, considerou que o

uso de dosagens diferentes nos trabalhos feitos neste campo, pode justificar a falta de uniformidade dos resultados.

Em 1977, Schimrigk et al, fizeram estudos histológicos no músculo reto femoral desnervado de ratos e observaram que o grupo tratado apresentava menor quantidade de núcleos com localização central na célula, maior número de fibras necróticas e menor grau de regeneração.

Drachman & Witzke (1972) fizeram um estudo sobre o efeito da estimulação elétrica na sensibilidade à acetilcolina do músculo desnervado e mostraram que, após quatro dias, esta sensibilidade à acetilcolina era menos difusa no diafragma estimulado após desnervação do que no diafragma desnervado não estimulado.

Em 1975, Westgaard trabalhando com músculo soleo de ratos, focalizou também o seu estudo nas propriedades de membrana e encontrou que a estimulação elétrica direta do músculo desnervado, parece compensar a ausência de influências neurais, embora não exclua a possibilidade dos fatores neurotróficos contribuírem neste controle.

No final da década de 70, Pinelli (1978) e Merletti & Pinelli (1980) avaliaram criticamente a situação da eletroterapia do músculo desnervado enfocando a importância deste estudo, o estágio dos

conhecimentos da época e a necessidade de mais pesquisa na área.

De vários trabalhos publicados durante esta fase tiveram a importância de focalizar a atenção no potencial da eletroterapia no tratamento do músculo desnervado.

TERCEIRA FASE

Caracteriza-se esta fase, pelo desenvolvimento de pesquisas com metodologia mais precisa e pela utilização de técnicas mais aperfeiçoadas. A atenção dos pesquisadores foi dirigida a aspectos diversos quanto aos efeitos, a indicação médica e a forma de aplicação da eletroterapia.

Em 1982, Jaweed et al, Nemeth e Pachter et al, abordando aspectos diversos, encontraram diferenças significativas entre os grupos de músculos desnervados e estimulados eletricamente e os grupos de músculos desnervados e não estimulados. Assim, Jaweed et al (1982) observaram que a estimulação elétrica aplicada no músculo sóleo desnervado ou precocemente reinervado de ratos Wistar, não alterou o tempo de contração ou o tempo médio de relaxamento, mas interferiu significativamente no período de latência e na tensão máxima de contração isométrica. Nemeth (1982) demonstrou que a eletroterapia interfere no processo atrofico de

desnervação, diminuindo a perda de enzimas oxidativas, (dehidrogenase beta hidróxibutirato , citocromo oxidase, dehidrogenase succinato e NADH-redutase dependente de tetrazoluin) . Pachter et al (1982) utilizaram a microscopia óptica e a microscopia eletrônica de transmissão e observaram que a eletroterapia do músculo desnervado é potencialmente eficaz em reduzir alterações morfológicas, nas organelas e nas dimensões das fibras musculares tipo um e tipo dois.

Mas, Birlanda et al, também em 1982, estudando o efeito da eletroterapia nos músculos extensor longo dos dedos e sóleo desnervados de coelhos, não obtiveram diferenças importantes entre os diâmetros das fibras musculares dos grupos tratados e não tratados. Este trabalho , questiona desta forma a utilidade clínica da eletroterapia de músculos desnervados.

Em 1983, Herbison et al, estudando o efeito da estimulação elétrica do músculo soleo desnervado de ratos Wistar, encontraram reduções no grau de atrofia e no número de fibrilações durante a desnervação. Entretanto, não foram observadas alterações no tempo de reinervação.

Em 1984 , Cole et al observaram que a estimulação elétrica reduz as perdas de massa muscular e de força de contração que ocorrem após a desnervação. Utilizaram em seu trabalho o músculo gastrocnêmio de

ratos e continuando suas observações durante um período após reinervação, constataram que as diferenças entre os músculos estimulados e não estimulados eram mantidas.

Em 1986, Herbison et al, estudaram o efeito da estimulação de axônios intactos de músculos parcialmente desnervados. Observaram que no músculo sóleo de ratos Wistar parcialmente desnervado, há um aumento no peso, na massa muscular e na tensão de contração em consequência à estimulação elétrica do nervo ciático, por eletrodos implantados.

Valencic et al em 1986 observaram em nove pacientes melhora da resposta motora do músculo tibial anterior desnervado, após à estimulação elétrica por um longo período de tempo. Este dado é importante para levantar a hipótese da possibilidade de utilizar-se a estimulação elétrica funcional de músculos desnervados.

Em 1987, Nix et al compararam tratamento com estímulos tetânicos e com frequência de um hertz, aplicando contrações isométricas durante vinte minutos por dia, no músculo extensor longo dos dedos desnervado, de coelhos, e constataram que a estimulação tetânica, induz intensa fibrose e é prejudicial ao músculo desnervado. Mas a estimulação de um hertz retarda a atrofia e a fadiga induzidas por desnervação, bem como o tempo de contração prolongado.

3. Material e Métodos

3.1 Animais

Utilizamos 33 ratas Wistar, distribuídas em duas séries distintas de 18 e 15 animais, provenientes do biotério central da Unicamp. Os animais apresentavam desnutrição moderada, segundo a tabela de nutrição publicada pela Carworth Europe (Tabela I).

TABELA I-[40]
GANHO DE PESO EM FUNÇÃO DA IDADE
DE RATOS WISTAR
(de acordo com Carworth Europe)

Idade(dias)		21	24	28	31	35	42	49	56	63	70
peso	M	45	63	87	105	129	171	213	255	295	330
(g)											
	F	43	55	71	83	99	127	155	183	209	230

Os animais após saírem do Biotério, continuaram recebendo ração Probiotério G-49 (Anexo I) e água sem restrições, sendo mantidos em gaiolas retangulares de dimensões de 40 x 33 x 17 cm, dispostas lado a lado, nas mesmas condições ambientais. Cada gaiola era ocupada por grupos de animais alocados aleatoriamente. Os animais foram distribuídos da seguinte maneira:

PRIMEIRA SÉRIE:

Idade : 2 meses

Peso médio : 114,17 (+/- 6,91)

Primeiro grupo: controle (6 animais)

Segundo grupo: desnervado e não estimulado (6 animais)

Terceiro grupo: desnervado e estimulado (6 animais)

SEGUNDA SÉRIE:

Idade : 3 meses

Peso médio : 189,47 (+/- 13,31)

Primeiro grupo: controle (3 animais)

Segundo grupo: desnervado e não estimulado (3 animais)

Terceiro grupo: desnervado e estimulado (9 animais)

Na primeira série foram verificados os efeitos ocorridos consequentes à estimulação e na segunda série pretendíamos constatar eventuais diferenças quanto ao efeito da eletroterapia iniciada em datas diferentes após a desnervação.

3.2 Procedimento Cirúrgico para Desnervação

Para a cirurgia de desnervação, os ratos foram anestesiados com hidrato de cloral a 10% (0.3 ml por cem gramas de peso corporal) por via intraperitoneal. Executamos uma incisão longitudinal de aproximadamente 1.5 cm interessando a pele e subcutâneo na região posterior da raiz da coxa direita, na porção correspondente ao terço proximal do fêmur. Em seguida, os músculos da região glútea foram divulsionados e o nervo ciático exposto, isolado e submetido à ressecção de um segmento de dois centímetros. O coto proximal foi esmagado para evitar reinervação. A ferida cirúrgica foi suturada com pontos simples de algodão 2-0.

3.3 Procedimento da eletroestimulação

Para a realização das sessões de eletroestimulação fez-se necessário a contenção rigorosa dos animais. Para isto, confeccionamos um dispositivo

constando de uma prancha, onde se apoiava um cilindro plástico de 15 cm de comprimento, semi-transparente, fixado por duas placas de madeira dispostas transversalmente. As extremidades do cilindro, de diâmetros diferentes, foram abertas. O diâmetro menor, de aproximadamente 1.5 cm, serviu para o rato respirar. Pela extremidade maior, de 6 cm de diâmetro, o rato era colocado no interior do cilindro e uma portinhola com uma trava impedia a sua saída. O membro posterior direito do animal era exposto fora da caixa através de uma pequena abertura lateral. Girando o cilindro, posicionávamos a pata adequadamente em posição elevada (figuras 1 e 2).

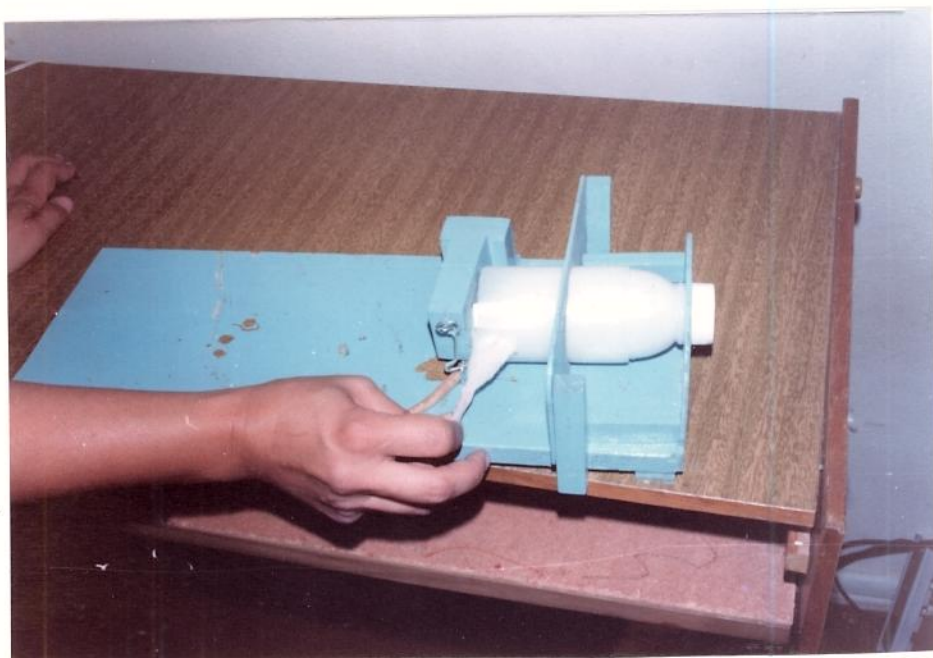


FIGURA 1: EXPOSIÇÃO DO MEMBRO POSTERIOR DO RATO NA PRANCHA DE CONTENÇÃO.

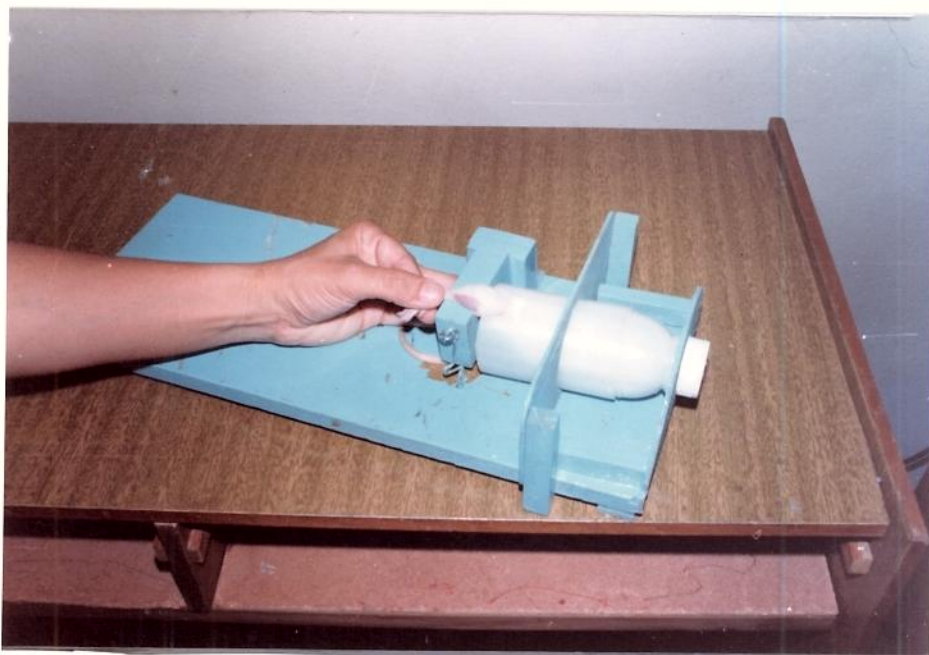


FIGURA 2: RATO COLOCADO EM POSIÇÃO PARA ELETROESTIMULAÇÃO.

Foram realizadas duas sessões diárias de trinta minutos de estimulação. Os estímulos elétricos foram constituídos de pulsos retangulares de 1 ms de largura, frequência de 10 Hz, modulados com um sinal retangular de período de 20 segundos sendo 10 seg de repouso e 10 seg de estimulação. A amplitude do sinal foi ajustada para o valor capaz de causar vigorosa contração muscular, correspondendo a aproximadamente, 15 mA.

A obtenção destes pulsos foi conseguida através da utilização de um computador NAJA, compatível com o TRS80 e de amplificador de potência

especificamente projetado para esta finalidade. O programa foi desenvolvido em linguagem de máquina Z80 conforme apresentado no anexo 1, ao final da tese.

Usamos técnica bipolar, colocando dois eletrodos superficiais iguais (figura 3), sobre a pele do animal, nas regiões proximal e distal da face antero-lateral da perna direita.

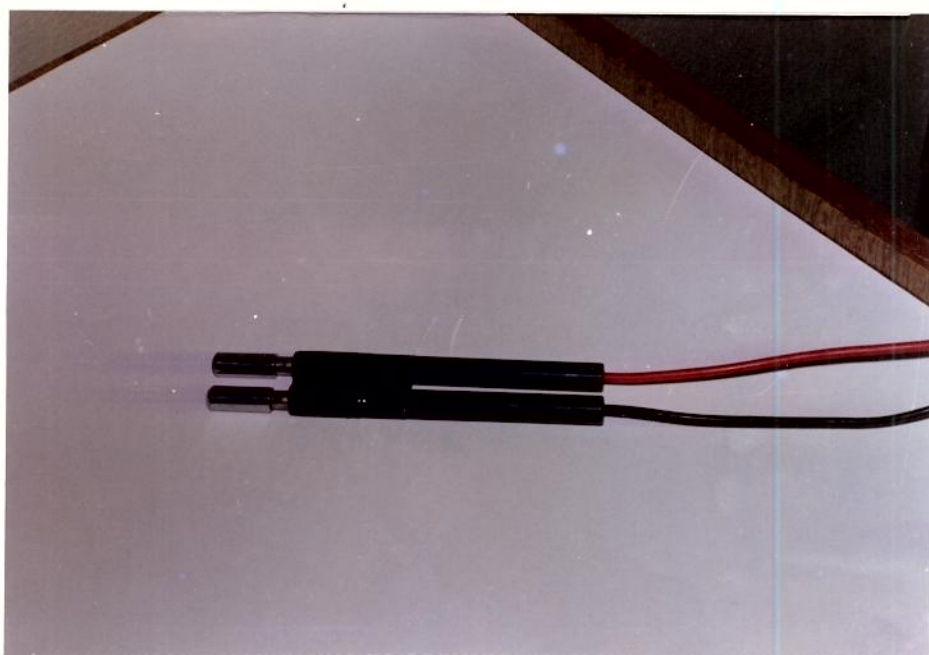


FIGURA 3 . ELETRODOS SUPERFICIAIS UTILIZADOS PARA APLICAÇÃO DE ESTÍMULO ELÉTRICO

Para certificarmos-nos de que as fibras musculares do extensor longo dos dedos estariam sendo despolarizadas durante o tratamento, introduzimos um eletrodo de agulha (agulha de insulina isolada com

esmalte, com exceção da ponta) à aproximadamente 1 cm de profundidade, sobre a região correspondente ao músculo em estudo. Aplicamos então eletroestimulação conforme padronizamos para este experimento e observamos a captação do potencial evocado pelo eletrodo de agulha. Para este teste, usamos estimulador NS6P acoplado a um cronaxímetro TECA TE-4 (Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Unicamp).

O tratamento foi rotineiramente efetuado durante seis dias por semana. Iniciamos o tratamento na primeira série no quarto dia após a desnervação. Na segunda série os animais do terceiro grupo foram divididos em subgrupos de 3 animais e a estimulação foi iniciada no primeiro, quinto e décimo primeiro dia após desnervação.

3.4 Obtenção do material e fixação

No trigésimo dia após a cirurgia de desnervação, testamos a função motora dos ratos que haviam sido desnervados, pesquisando sinais de contração da musculatura extensora dos artelhos pela observação clínica e limitação na amplitude de movimento das articulações do membro inferior direito comparando com o lado contralateral. Sacrificamos em seguida todos os animais.

O músculo extensor longo dos dedos, à direita, de metade dos animais de cada grupo da primeira série, foram fixados em formal a 10% e processados para microscopia óptica. As amostras foram incluídas em parafina e submetidas à cortes transversais e longitudinais de sete micrômetros de espessura. Foi usada a coloração hematoxilina-eosina. Um corte transversal, selecionado do terço médio de cada músculo foi utilizado para fins de morfometria.

A outra metade do material da primeira série foi processada para microscopia eletrônica. Para isto, após a anestesia do animal, retiramos o material da seguinte maneira: abrimos o tórax do animal, retiramos o coração para diminuir o fluxo sanguíneo nas extremidades, injetamos 4ml de fixador de Karnovsky [36] por via intra muscular na pata direita, retiramos o músculo extensor longo do dedos e o mergulhamos no referido fixador. Esta operação foi realizada em cada rato em aproximadamente 40 segundos.

Com os músculos mergulhados no fixador, cortamos e desprezamos suas extremidades tendíneas. Seccionamos então o contingente de fibras correspondente ao terço superficial da espessura do ventre muscular do músculo e fragmentamos esta região em retângulos (com as fibras dispostas longitudinalmente). As amostras obtidas foram colocadas em recipientes contendo fixador de Karnovsky. Após 3 horas foram lavadas com solução de

tampão cacodilato , 0.1 M e colocadas por duas horas em tetróxido de Ósmio a 2%. Prosseguiu-se com a sua desidratação em etanol em concentrações crescentes de 40 a 100 %. Em seguida foi realizada embebição em óxido propileno + epon 812 (1:1). No dia seguinte foi feita inclusão em Epon 812 permanecendo em estufa a 60 graus por três dias.

Todo o material da segunda série foi processado para microscopia eletrônica. Os estudos de morfometria e observação dos fusos neuromusculares foram feitos sob microscopia óptica e os estudos da ultraestrutura da fibra muscular foram feitos através da microscopia eletrônica. Os animais foram sacrificados de forma similar à segunda metade da primeira série, mas a fragmentação e o processamento do material foi feito de forma diferente.

Os músculos foram fragmentados da seguinte maneira: retiramos uma fatia do terço médio em relação ao comprimento do músculo e a fragmentamos em toda extensão em retângulos paralelos com as fibras dispostas longitudinalmente. Estas amostras foram utilizadas para morfometria e estudo das fibras musculares extrafusais a nível de microscopia óptica. Do restante do material, fragmentamos de forma similar a porção correspondente ao terço superficial da espessura do ventre muscular do músculo e desprezamos o resto.

As amostras obtidas foram deixadas em

recipientes contendo fixador de Karnovsky ,em geladeira, até o dia seguinte. Procedeu-se lavagem de uma hora em tampão cacodilato e colocou-se o material em tetróxido de ósmio a 2% durante duas horas. As amostras foram então deixadas por uma noite em solução de acetato de uranila 0.5 % em sacarose 0.3 M, em geladeira. No dia seguinte foi feita desidratação em acetona em concentrações crescentes (30 - 100 %),durante uma hora e quarenta e cinco minutos. A seguir foi realizada embebição em acetona + epon 812(1:1) , durante três horas e deixada em Epon 812 durante 60 minutos em estufa a 45 graus centígrados. Em seguida foi feita inclusão em Epon 812 com as amostras dispostas longitudinalmente no bloco e o material permaneceu em estufa a 60 graus por cinco dias.

Do material processado para a microscopia eletrônica da primeira e da segunda séries, fizemos cortes semifinos e ultrafinos, utilizando navalhas de vidro e ultramicrotomo Porter Blum MT2 , do Instituto de Biologia da Unicamp.

Os cortes semifinos foram montados em lâminas de vidro e corados com azul de toluidina a 1 % e observados ao microscópio óptico. Um corte semifino de cada fragmento obtido da secção transversal do terço médio de cada músculo da segunda série , foi fotografado em câmara MC63-ZEISS e utilizado para morfometria.

Os cortes ultrafinos foram "pescados" em

telas de 200 mesh , próprias para microscopia de transmissão e coradas com citrato de chumbo [53] . Para observação da ultraestrutura utilizamos microscópio eletrônico de transmissão ZEISS EM-9 do centro de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biologia.

3.5 Medidas das áreas

Medimos as áreas de 100 fibras de cada grupo. Fotografamos aleatoriamente regiões variadas (campos centrais e periféricos) dos cortes selecionados do terço médio de cada músculo de metade dos animais correspondentes à primeira série. Da segunda série utilizamos um corte semifino de cada fragmento escolhido aleatoriamente obtido da secção transversal do terço médio de cada músculo .

Para o cálculo da área utilizamos o método da integração numérica de Simpson , dividindo a figura em duas partes através do traçado de uma reta diametral e levantando-se dez pontos igualmente espaçados dentro deste diâmetro (figura 4). A fórmula para o cálculo da área é a seguinte:

$$\text{área} = h/3(3*f(x_0) + 4*f(x_1) + \dots + f(x_{2n}))$$

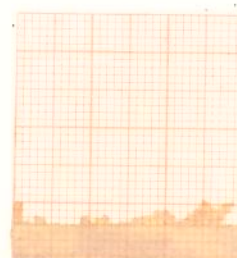
onde:

h =intervalo entre os pontos de medida

$f(x_n)$ =valor da distância entre o contorno e a linha
diametral no ponto n

FOTO NUMERO 0

x	y1	y2
0	0	0
.25	.9	.2
.5	1.1	.4
.75	1.2	.5
1	1.2	.6
1.25	1.2	.6
1.5	1.1	.5
1.75	1	.5
2	.8	.5
2.25	.5	.4
2.5	0	0



Área:598.5 micrômetros quadrados

FIGURA 4. MÉTODO UTILIZADO PARA MEDIDA DAS ÁREAS
DAS FIBRAS MUSCULARES

Esta fórmula foi programada em basic
permitindo o levantamento seguro das áreas (anexo
dois)

4. Resultados

4.1 Observações no pós operatório

Durante todo o período de sobrevivência, os animais desnervados, mantiveram déficit motor na pata direita, apresentando incapacidade de extensão dos artelhos; desenvolveram atrofia evidente da musculatura da perna direita e não apresentaram limitação na amplitude dos movimentos das articulações.

Nos grupos desnervados e estimulados após uma semana de tratamento, observamos hiperemia no local de colocação dos eletrodos, em sequência ao tratamento eletroterápico, que durava algumas horas. Com a continuação da série de estimulações a região apresentava alteração permanente de cor, discreta descamação e em alguns animais, registrou-se a formação de pequena crosta.

4.2 Observações macroscópicas

Durante a retirada do músculo extensor longo dos dedos, não observamos áreas de hemorragia,

aderências , rompimento de fibras ou qualquer alteração macroscópica.

4.3 Observações Microscópicas

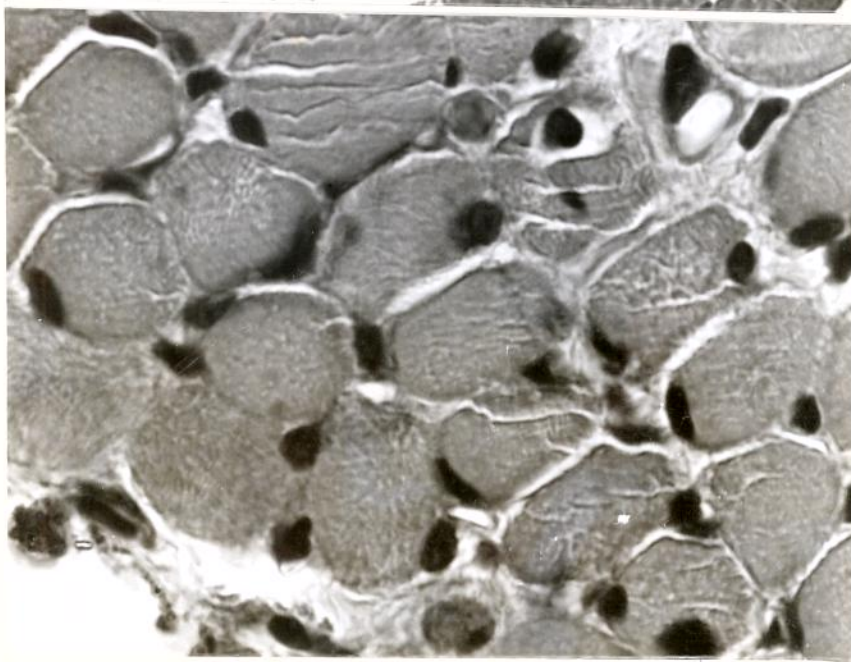
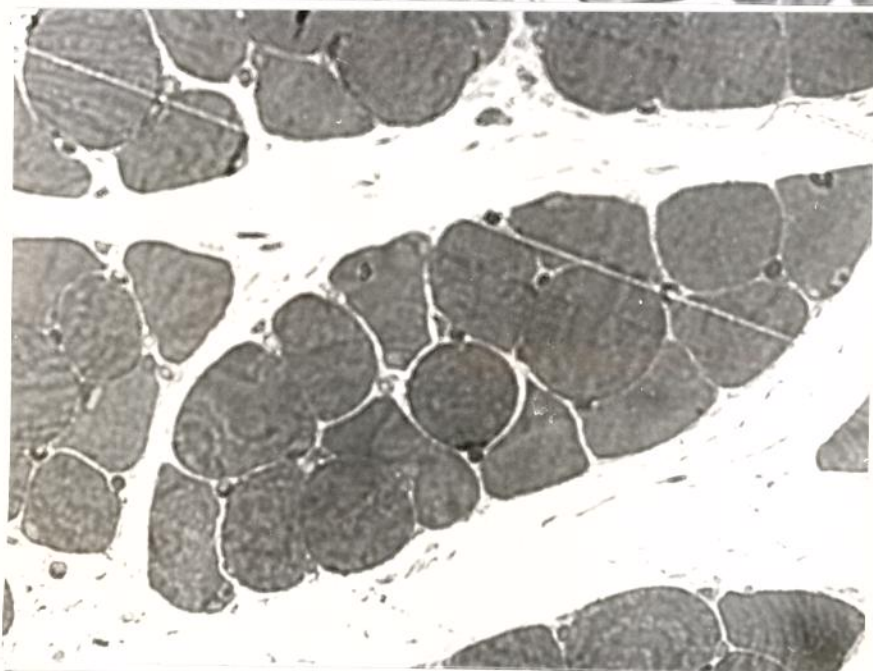
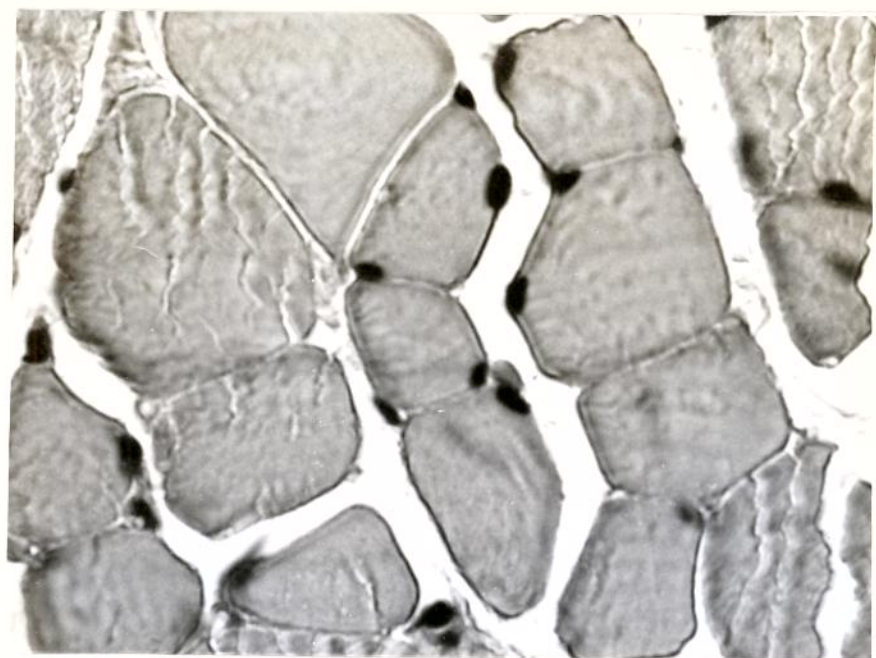
4.3.1 Microscopia Óptica

Nos cortes transversais observamos que as áreas das fibras musculares dos grupos controle das duas séries mostraram-se nitidamente maiores que as áreas das fibras musculares dos grupos desnervados estimulados e não estimulados (figuras 5,6 e 7).

FIGURA 5:CORTE TRANSVERSAL DO MUSCULO EXTENSOR LONGO DOS DEDOS DO GRUPO CONTROLE. DIAMETRO MEDIO: 763,41 MICRÔMETROS. HE-750 X

FIGURA 6: CORTE TRANSVERSAL DO MUSCULO EXTENSOR LONGO DOS DEDOS DO GRUPO DESNERVADO NÃO ESTIMULADO. DIAMETRO MEDIO:384,11 MICRÔMETROS. HE-750 X

FIGURA 7: CORTE TRANSVERSAL DO MUSCULO EXTENSOR LONGO DOS DEDOS DO GRUPO DESNERVADO ESTIMULADO. DIAMETRO MEDIO: 487,42 MICRÔMETROS. HE-750 X



Comparando as áreas transversais das fibras musculares dos grupos desnervados não-estimulados e estimulados das séries um e dois observamos dimensões visivelmente menores no grupos dos desnervados não estimulados.

Em cortes transversais corados pela técnica hematoxilina-eosina de todos os grupos, observamos fibras musculares ligeiramente ovaladas ou poliédricas com áreas de dimensões variadas, sarcoplasma acidófilo e núcleos ovalados dispostos na periferia. Constatamos entre as fibras musculares de todos os grupos , a presença de fusos neuromusculares com evidências de cápsula íntegra e presença de geralmente quatro fibras intrafusais com estrutura aparentemente bem preservada. Observamos que havia quase sempre pelo menos uma fibra intrafusar que se destacava pela maior dimensão de sua área. Entre as fibras musculares constatamos a presença de vasos sanguíneos de pequeno calibre e capilares (figura 8).

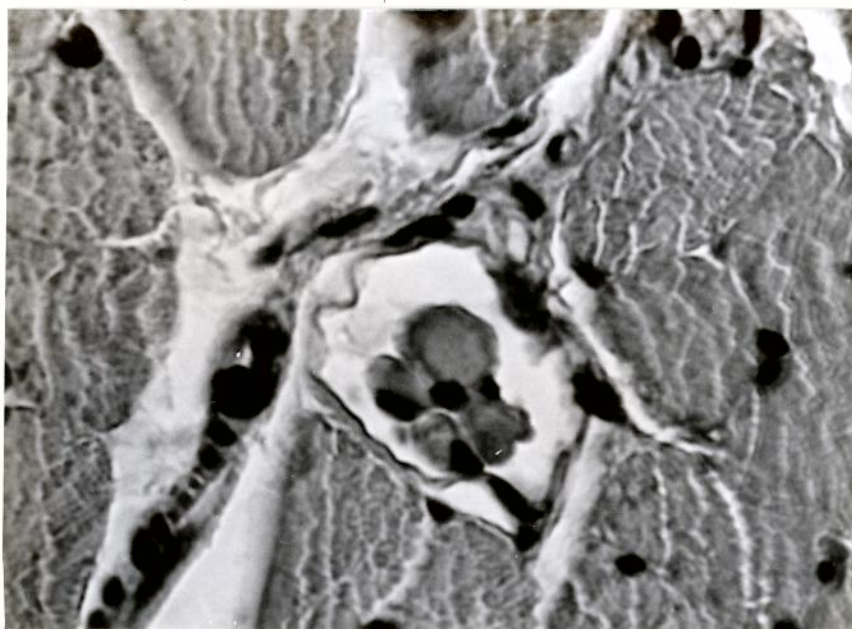


FIGURA 8: CORTE TRANSVERSAL DO MÚSCULO EXTENSOR LONGO DOS DEDOS DO GRUPO DESNERVADO E ESTIMULADO ; FUSO NEUROMUSCULAR COM CAPSULA ÍNTEGRA E QUATRO FIBRAS INTRAFUSAIS COM ESTRUTURA PRESERVADA. PRESENÇA DE VASO SANGUÍNEO PRÓXIMO AO FUSO. HE-750 x

Em cortes longitudinais de todos os grupos observamos a forma alongada das fibras musculares e de seus núcleos e estriações transversais no sarcoplasma. Constatamos ainda a presença de vasos sanguíneos e de fusos neuromusculares. Neste plano de corte, os fusos neuromusculares apresentaram-se também

com estrutura aparentemente bem preservada, com a cápsula delimitando geralmente quatro fibras intrafusais com os núcleos dispostos em série ou em cachos. A disposição dos núcleos em série foi mais frequente em todos os fusos neuromusculares observados (figura 9).

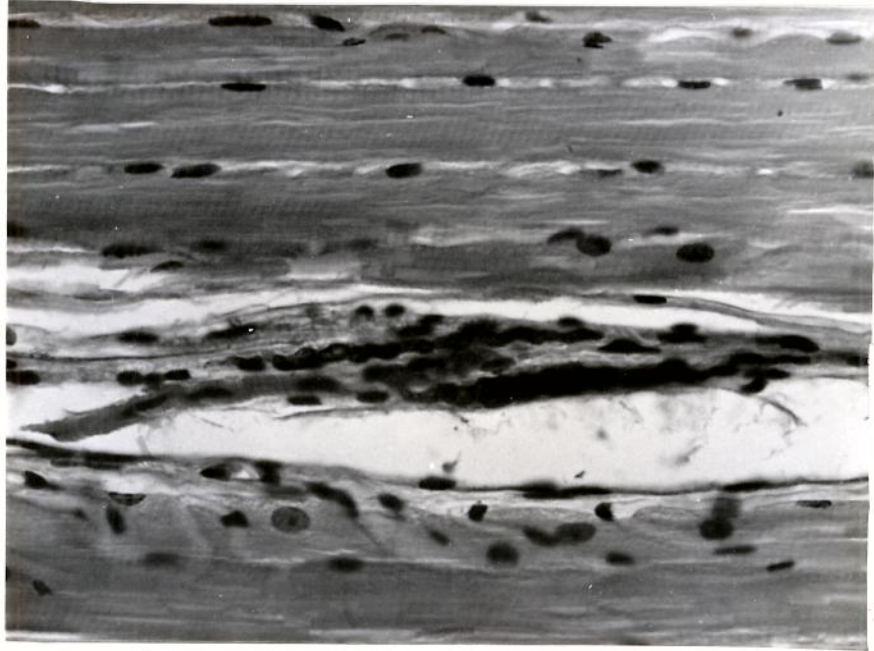


FIGURA 9:CORTE LONGITUDINAL DO MÚSCULO EXTENSOR LONGO DOS DEDOS DO GRUPO DESNERVADO E ESTIMULADO ; FIBRAS MUSCULARES COM NÚCLEOS ALONGADOS LOCALIZADOS NA PERIFERIA E ESTRIAÇÕES TRANSVERSAIS.PRESENÇA DE FUSO NEUROMUSCULAR COM CÁPSULA APARENTEMENTE ÍNTEGRA E FIBRAS INTRAFUSAIS COM NÚCLEOS DISPOSTOS EM SÉRIE E EM CACHO.

HE-750

4.3.2 Microscopia eletrônica

4.3.2.1 Músculos do grupo controle

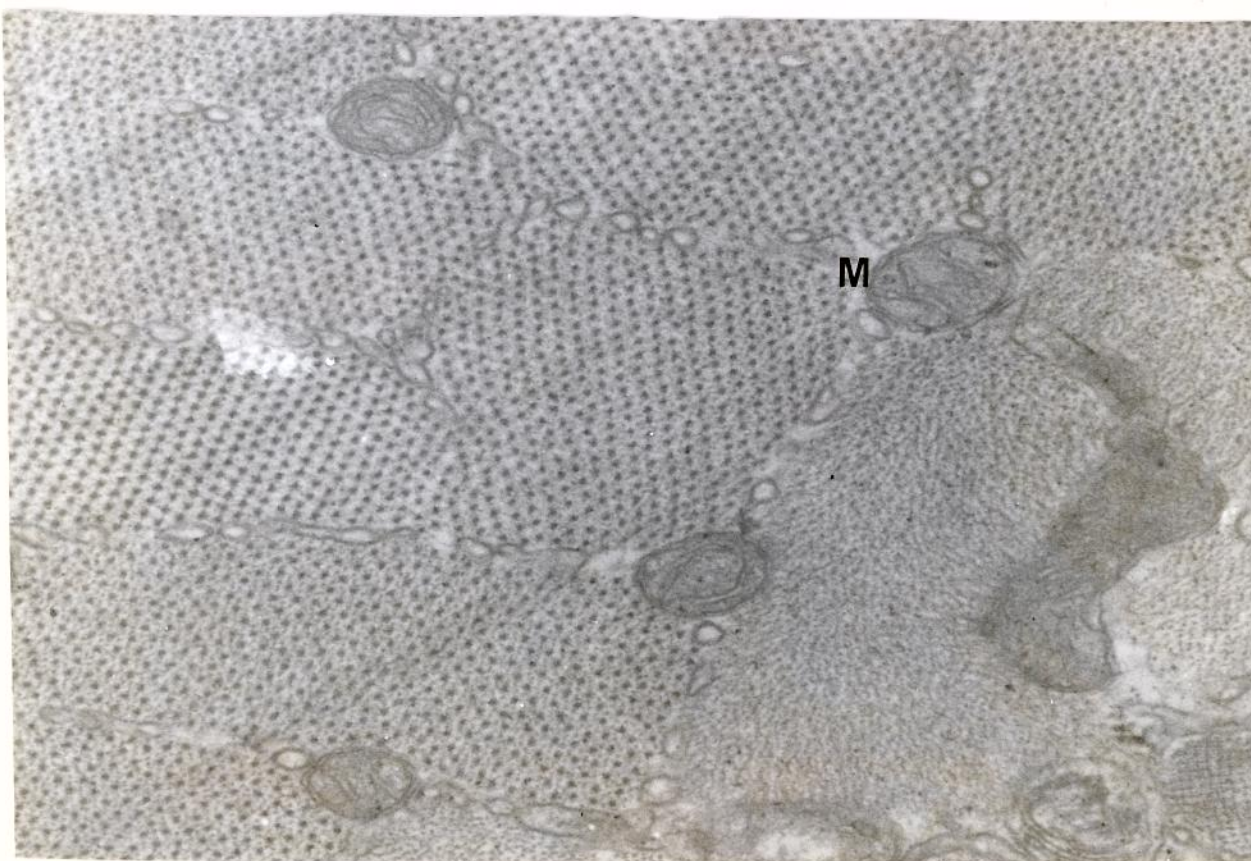
Observamos fibras musculares com sarcolema íntegro em toda extensão e sarcoplasma sem evidências de alterações patológicas. Os núcleos, localizados na periferia da fibra, mostravam estrutura íntegra. O retículo sarcoplasmático e as triades não apresentavam dilatações. As mitocôndrias com membrana dupla e criptas evidentes mostravam formas variadas.

4.3.2.2 Músculos desnervados não estimulados

Os músculos desnervados não estimulados das duas séries apresentaram mitocôndrias predominantemente de forma arredondada e com menor quantidade de criptas (figuras 10 e 11). Observamos regiões onde as mitocôndrias apresentavam-se arredondadas e com as criptas espaçadas, sugerindo dilatação desta organela (figura 12). Foi comum o aparecimento de agrupamentos de mitocôndrias próximo ao sarcolema (figura 13) e frequentemente observaram-se áreas onde as cisternas do retículo sarcoplasmático e das triades se mostravam dilatadas (figura 14).

FIGURA 10: MÚSCULO EXTENSOR LONGO DOS DEDOS DO GRUPO
DESNERVADO E ESTIMULADO APRESENTANDO MITOCÔNDRIAS COM
CRIPTAS BEM EVIDENTES. AUMENTO: 52000 X

FIGURA 11: MÚSCULO EXTENSOR LONGO DOS DEDOS DO GRUPO
DESNERVADO NÃO ESTIMULADO APRESENTANDO MITOCÔNDRIAS
ARREDONDADAS E CRIPTAS MENOS EVIDENTES. AUMENTO: 52000X



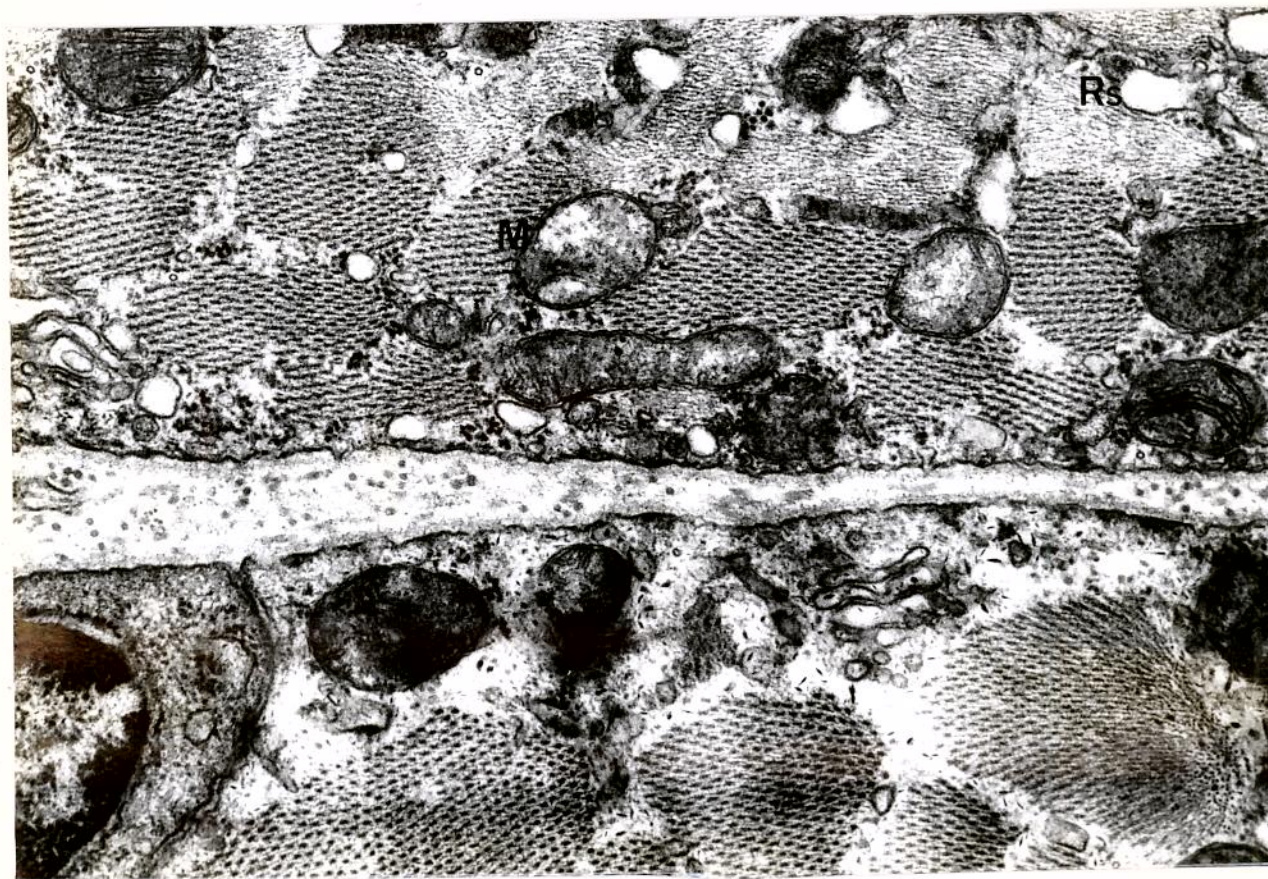


FIGURA 12: MÚSCULO EXTENSOR LONGO DOS DEDOS DO GRUPO
DESNERVADO NÃO ESTIMULADO; MITOCÔNDRIAS (M) E RETÍCULO
SARCOPLASMÁTICO (RS) DILATADOS. AUMENTO:36000X

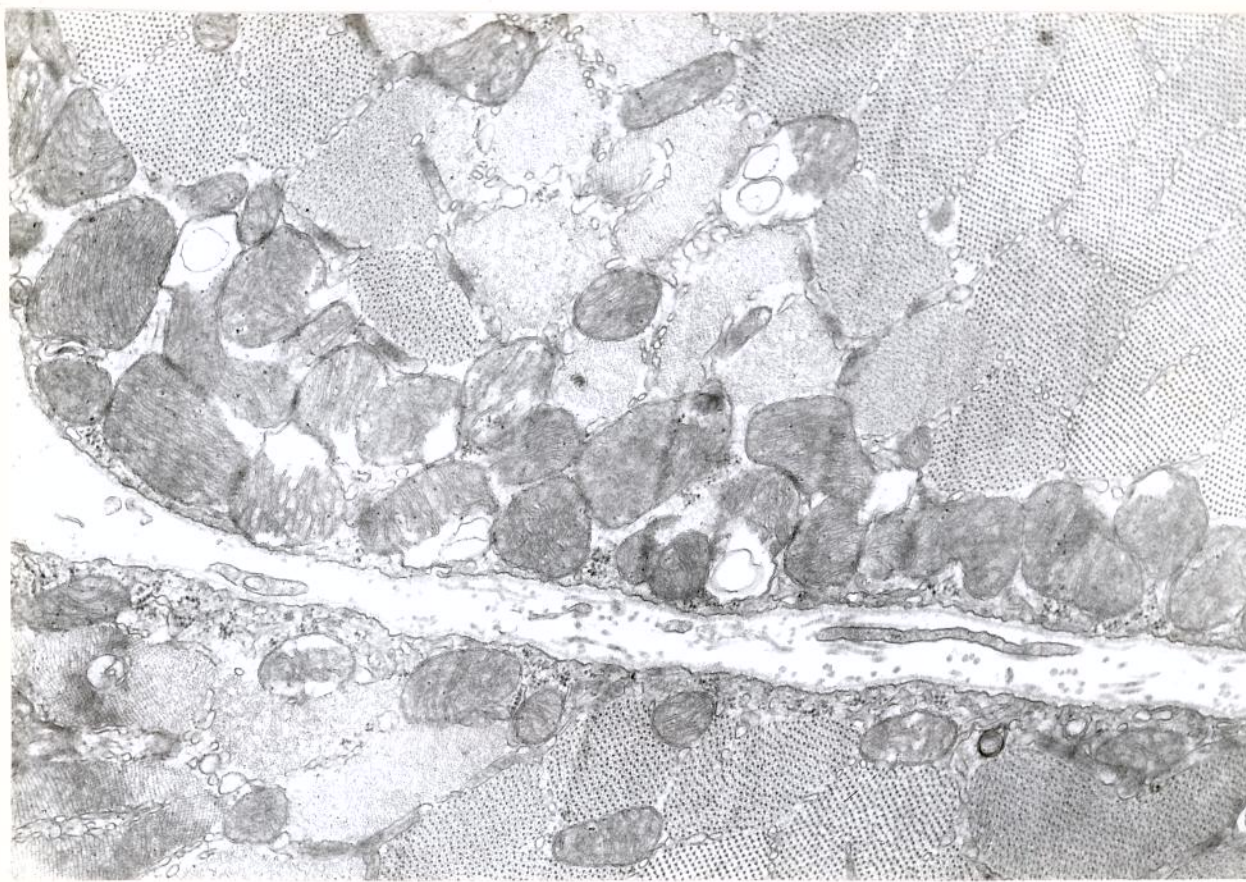


FIGURA 13: MÚSCULO DESNERVADO NÃO ESTIMULADO;
AGRUPAMENTO DE MITOCÔNDRIAS PRÓXIMO AO SARCOLEMA.
AUMENTO: 19000 X

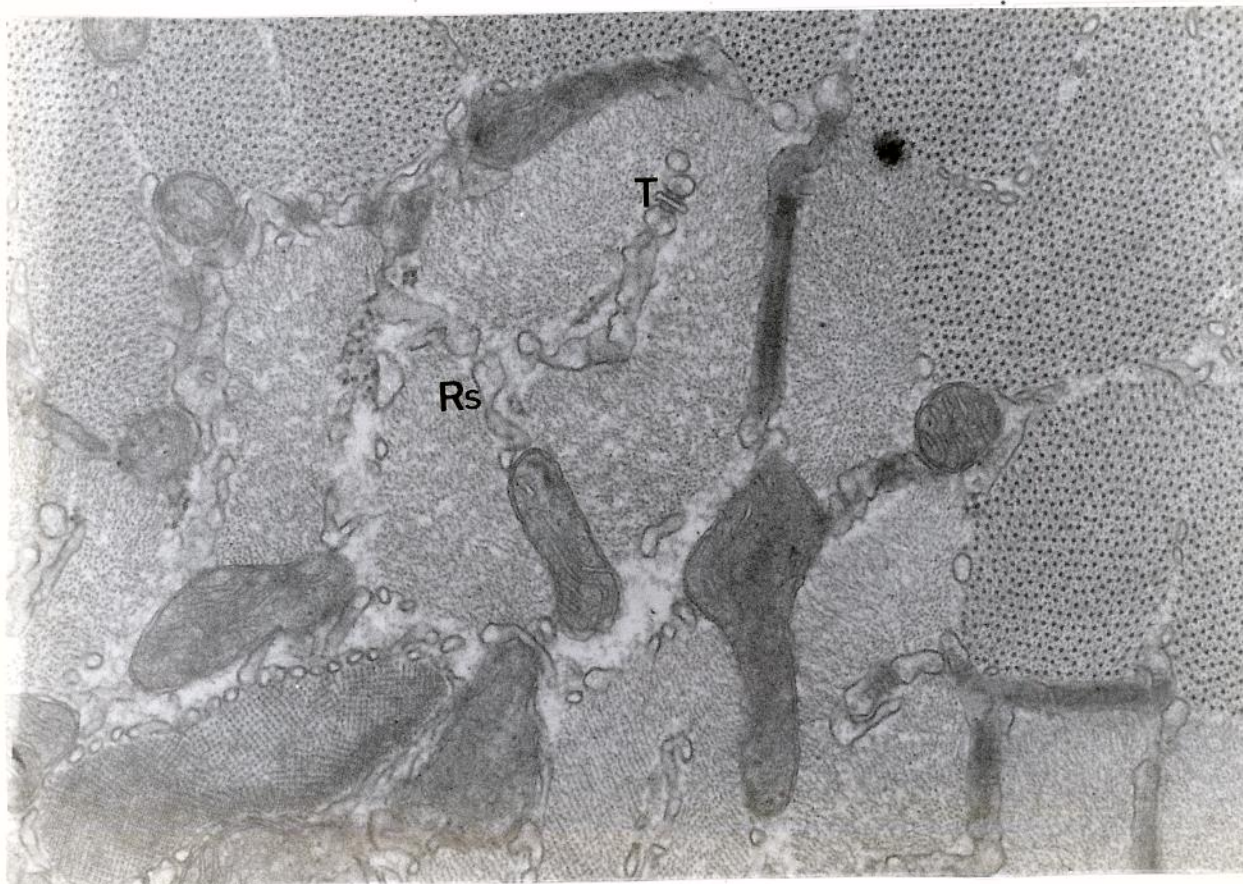


FIGURA 14: MÚSCULO DESNERVADO NÃO ESTIMULADO: TRIÁDES (T) E RETÍCULO SARCOPLAMÁTICO (RS) LIGEIRAMENTE DILATADOS. AUMENTO: 32000 X

4.3.2.3 Músculos desnervados e estimulados

Os músculos desnervados estimulados das duas séries apresentaram a ultraestrutura semelhante aos grupos controle.

Observamos, em cortes transversais, fibras musculares com sarcolema contínuo em toda extensão e sarcoplasma sem evidências de alterações. Os núcleos apresentaram estrutura íntegra, localizando-se na periferia da fibra (figura 15). A membrana plasmática e a membrana basal apresentaram-se íntegras e com a aparência normal (figura 16). Não observamos mionecrose. O retículo sarcoplasmático estendeu-se entre as miofibrilas delimitando compartimentos no sarcoplasma. Visualizamos tríades com a estrutura bem preservada (figura 17) e mitocôndrias de forma variada apresentando membrana dupla e criptas evidentes.



FIGURA 15: MÚSCULO EXTENSOR LONGO DOS DEDOS DO GRUPO
DESNERVADO E ESTIMULADO. SARCOLEMA CONTÍNUO COM NÚCLEO
NA PERIFERIA. AUMENTO:3000 X

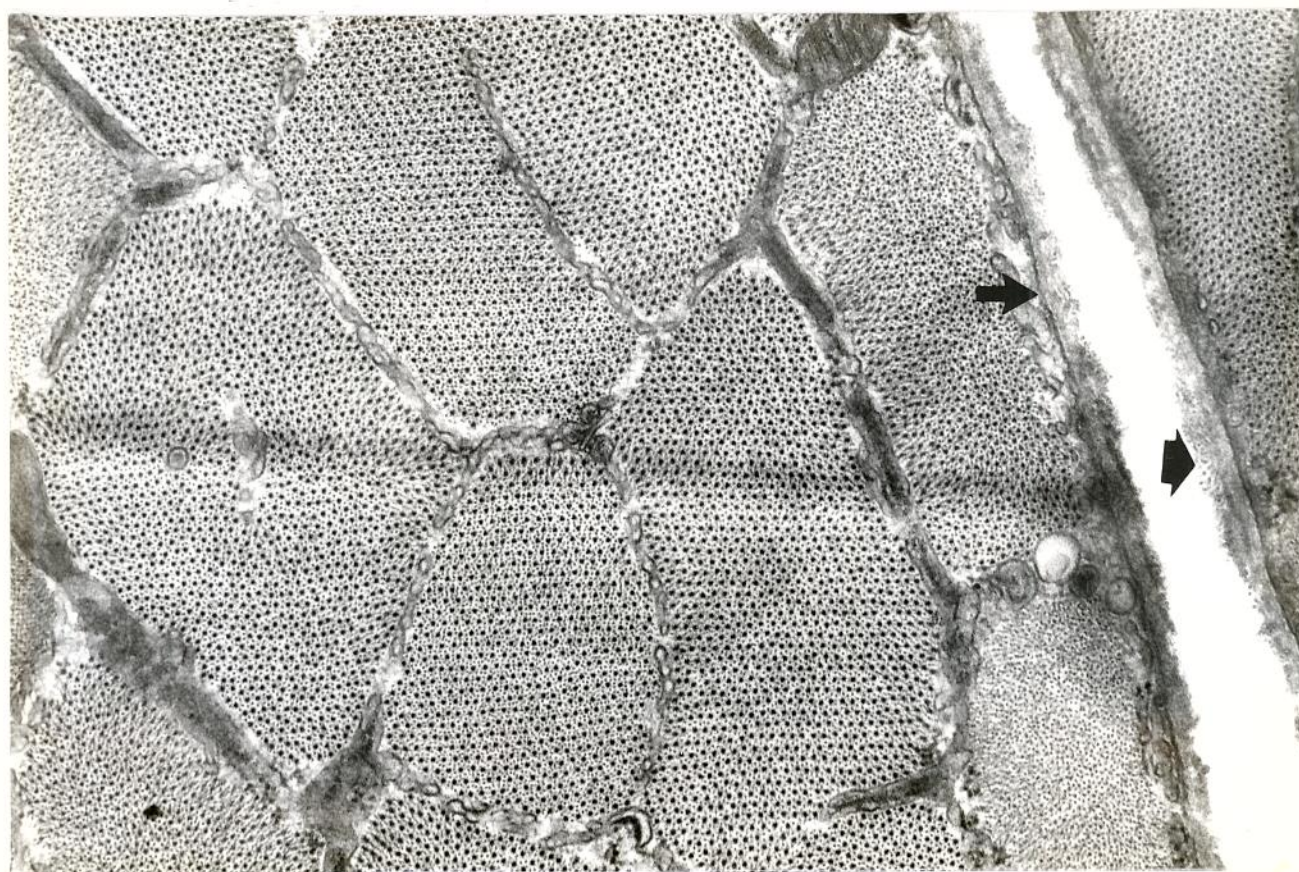


FIGURA 16: MÚSCULO EXTENSOR LONGO DOS DEDOS DO GRUPO DESNERVADO ESTIMULADO. MEMBRANA PLASMÁTICA E MEMBRANA BASAL ÍNTEGRAS. AUMENTO: 36000 X

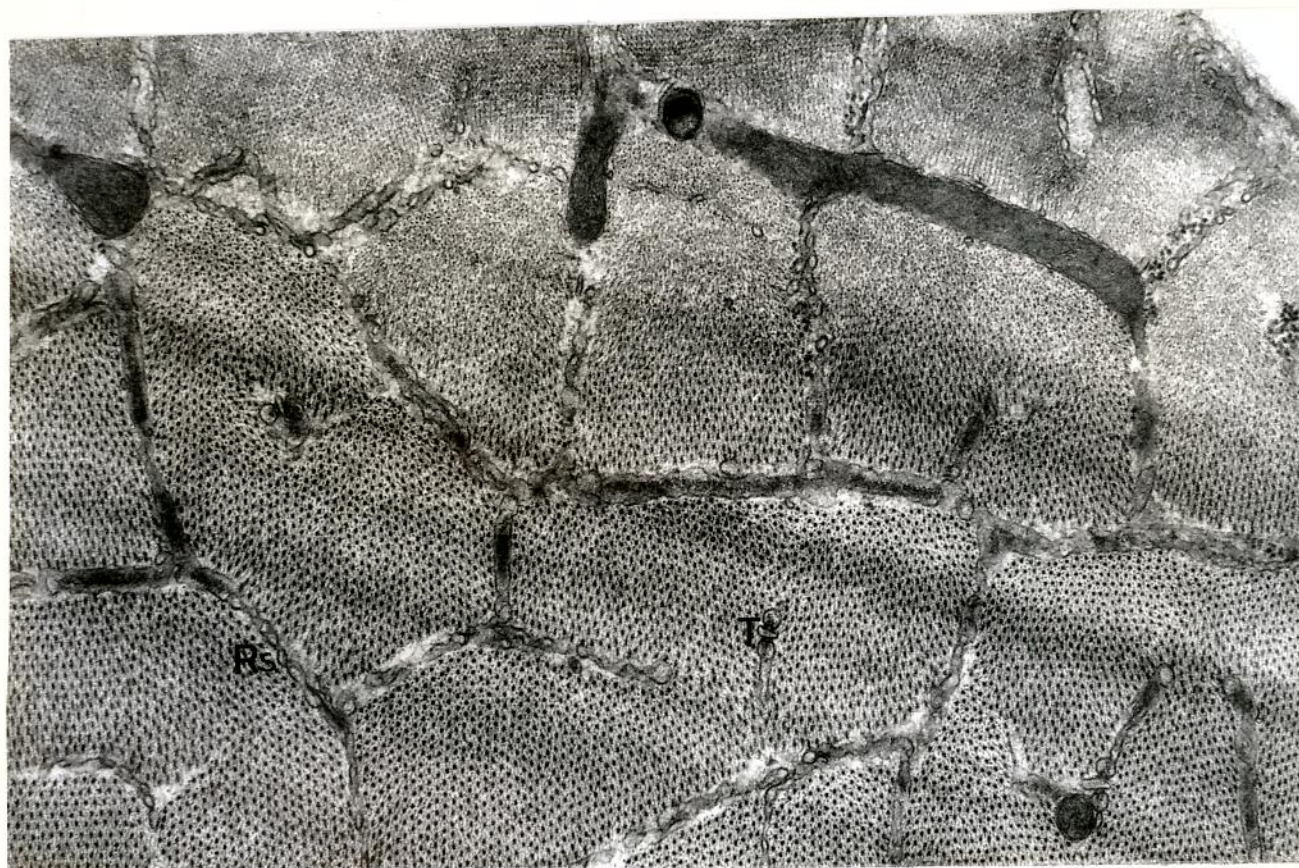


FIGURA 17: MÚSCULO DESNERVADO E ESTIMULADO; RETÍCULO SARCOPLASMÁTICO (RS) E TRIADES (T) COM ESTRUTURA BEM PRESERVADA. AUMENTO: 27000 X

4.4 Análise estatística dos dados morfométricos

Visando a verificação de diferenças significativas quanto às áreas transversais das fibras musculares entre os vários grupos procedemos a um teste de significância a partir das diferenças das médias entre os grupos. Consideramos que os grupos seriam diferentes a um nível de significância de 0.05 , ou seja, $z=1.645$.

As tabelas II e III mostram os dados obtidos a partir das medidas realizadas nas amostras das duas séries. Comparando os três grupos da primeira série, constata-se que há uma diferença significativa entre os três grupos, sendo esta diferença mais acentuada entre o grupo controle e o grupo desnervado não estimulado. Entre os grupos desnervado estimulado e desnervado não estimulado constata-se diferenças significativas onde $p=2.69 \exp -4$ (tabelas IV). A comparação entre os grupos controle e desnervado estimulado da primeira série é apresentado na tabela V onde constata-se diferenças significativas com $p=4.50 \exp -10$.

TABELA II

MÉDIAS DAS ÁREAS TRANSVERSAIS DE FIBRAS MUSCULARES DA
PRIMEIRA SÉRIE

GRUPO	MÉDIA	NÚMERO DE MEDIDAS
CONTROLE	763,41	100
DESNERVADO NÃO ESTIMULADO	384,11	100
DESNERVADO E ESTIMULADO	487,42	100

TABELA III

MÉDIAS DAS ÁREAS TRANSVERSAIS DE FIBRAS MUSCULARES DA
SEGUNDA SÉRIE

GRUPO	MÉDIA	NÚMERO DE MEDIDAS
CONTROLE	1293,54	100
DESNERVADO NÃO ESTIMULADO	712,17	100
DESNERVADO E ESTIMULADO (A PARTIR DO PRIMEIRO DIA)	884,97	100
DESNERVADO E ESTIMULADO (A PARTIR DO QUINTO DIA)	899,77	100
DESNERVADO E ESTIMULADO (A PARTIR DO DÉCIMO-PRIMEIRO DIA)	816,30	100

TABELA IV

ÁREAS TRANSVERSAIS DAS FIBRAS MUSCULARES DOS GRUPOS
NÃO-ESTIMULADO E ESTIMULADO DA PRIMEIRA SÉRIE

	GRUPO DESNERVADO NÃO ESTIMULADO	GRUPO DESNERVADO ESTIMULADO
ÁREA MÉDIA	384,11	487,42
DESVIO PADRÃO	221,40	192,87
NÚMERO DE MEDIDAS	100	100

TABELA V

ÁREAS TRANSVERSAIS DAS FIBRAS MUSCULARES DOS GRUPOS
CONTROLE E DESNERVADO ESTIMULADO DA PRIMEIRA SÉRIE

	GRUPO CONTROLE	GRUPO DESNERVADO ESTIMULADO
ÁREA MÉDIA	763,41	487,42
DESVIO PADRÃO	336,75	192,87
NÚMERO DE MEDIDAS	100	100

Analisando-se os dados do terceiro grupo da segunda série, constata-se que não houve diferenças significativas entre os animais desnervados e estimulados a partir do primeiro, quinto e décimo primeiro dia.

A comparação dos grupos controle e desnervado estimulado da segunda série mostrou diferenças significativas entre eles onde $p=4.50 \times 10^{-10}$. Entre os grupos não estimulados e estimulados da segunda série encontramos também diferença significativa entre os dados obtidos com $p=1.32 \times 10^{-5}$ (tabelas VI e VII).

TABELA VI

ÁREAS TRANSVERSAIS DAS FIBRAS MUSCULARES DOS GRUPOS CONTROLE E DESNERVADO ESTIMULADO DA SEGUNDA SÉRIE

	GRUPO CONTROLE	GRUPO DESNERVADO ESTIMULADO
ÁREA MÉDIA	1293,54	867,01
DESVIO PADRÃO	1027,68	342,11
NÚMERO DE MEDIDAS	100	300

TABELA VII

AREAS TRANSVERSAIS DAS FIBRAS MUSCULARES DOS GRUPOS NÃO
ESTIMULADO E ESTIMULADO DA SEGUNDA SÉRIE

	GRUPO DESNERVADO NÃO ESTIMULADO	GRUPO DESNERVADO ESTIMULADO
AREA MÉDIA	712,18	867,01
DESVIO PADRÃO	215,26	342,11
NÚMERO DE MEDIDAS	100	300

5. Discussão

A atrofia que ocorre no músculo desnervado é, invariavelmente, um processo progressivo. Por meio da estimulação elétrica, a atrofia pode ser retardada mas não prevenida [49]. Portanto, a eletroterapia de músculos desnervados deve ser indicada somente quando provavelmente ocorrerá reinervação [65]. Na maioria das desordens neurogênicas a desnervação não é total nem abrupta. Há portanto uma grande variação no grau de comprometimento da inervação e no estágio do processo atrofico de cada músculo individualmente [1,9,61]. Devemos considerar que em nosso trabalho, utilizando técnicas rotineiras para microscopia óptica e microscopia eletrônica pretendemos avaliar, nas duas séries de animais, o efeito da estimulação elétrica no músculo extensor longo dos dedos de ratos no trigésimo dia de desnervação. Isto significa que observamos apenas um momento de um processo dinâmico, onde diversas variáveis interferem nos resultados, tais como a espécie do animal, músculo considerado, estado nutricional, tempo decorrido após desnervação, número de sessões de eletroestimulação, etc...

Muitos estudos experimentais, realizados em

animais, têm sido feitos para verificar o efeito da eletroterapia no músculo desnervado. A maioria destes estudos tem mostrado a eficácia desta forma de terapia em alterar a progressão das alterações morfológicas e propriedades de membrana, esperadas no músculo desnervado [13,21,37,42,49,51,55,65,67] . Considerando que grande parte destes estudos foram realizados em ratos Wistar , optamos por esta espécie para o desenvolvimento do nosso trabalho, admitindo condições mais concretas para estabelecer comparações entre os resultados obtidos e aqueles já registrados na literatura . Além disto, o referido animal é de fácil manipulação e disponível no biotério central da Unicamp.

O músculo esquelético sofre alterações morfológicas em consequência da desnervação, mas a intensidade em que estes processos ocorrem, varia de músculo para músculo e nas várias espécies [2,11,49,55] . Segundo Engel et al (1974) , a maior susceptibilidade de alguns músculos à desnervação não foi ainda explicada. Escolhemos o músculo extensor longo dos dedos de ratos Wistar para o nosso estudo, por se tratar de um músculo que apresenta reação bastante evidente à desnervação [70] e por ser pequeno e rico em fusos neuromusculares [32] , permitindo-nos também a observação destes receptores. Estando situado logo abaixo do músculo tibial anterior, é de fácil acesso e fica protegido de possíveis lesões mecânicas que

eventualmente poderiam ocorrer . Além desses aspectos, o músculo extensor longo dos dedos é inervado pelo nervo fibular superficial, ramo do nervo ciático. A cirurgia de desnervação torna-se assim facilitada, pois o nervo ciático é de fácil acesso ao nível da extremidade proximal do membro inferior. [19,64].

Os animais apresentavam desnutrição moderada, mais acentuada nos exemplares da primeira série , em consequência da ração utilizada e da superpopulação de ratos em cada gaiola .Os animais, no entanto, além do baixo peso corporal não apresentavam outros sinais de desnutrição, tais como queda de pelo, diminuição do tônus muscular, etc. Procuramos minimizar este problema escolhendo animais de peso corporal semelhante e agrupando-os aleatoriamente.

Estudos têm demonstrado[18,23] um aumento de peso do músculo em decorrência de alteração na quantidade das proteínas miofibrilar e sarcoplasmática,consequente à sobrecarga de exercício. Por isso achamos importante que durante todo o experimento, os animais fossem colocados em gaiolas de mesmas dimensões e em condições ambientais semelhantes. Utilizamos animais distintos para servir de controle e não a pata contralateral. Com isto procuramos evitar o erro de interpretação que poderia ocorrer devido a hipertrofia da musculatura contralateral em consequência à sobrecarga a ela imposta , na execução de funções

antes desempenhada por ambos os lados. Sabemos também, de estudos já realizados, que a desnervação unilateral induz alterações similares, embora em menor proporção, no músculo intacto do lado oposto do animal [5,25].

Na cirurgia de desnervação, seccionamos o nervo ciático, retiramos um segmento de aproximadamente 2 cm de comprimento conforme Engel et al (1974) e esmagamos o coto proximal para evitar possível reinervação. Antes de sacrificarmos os animais, fizemos teste de força muscular e não observamos sinais de quaisquer ações por parte dos músculos extensor longo dos dedos e tibial anterior. Embora este teste de força muscular possa nos indicar um comprometimento da inervação do músculo em estudo, consideramos esta avaliação insuficiente para afastar a possibilidade de um processo inicial de reinervação [22]. Por isso, após a retirada do material para estudo e colocadas as amostras no fixador, dissecamos as estruturas de interesse em alguns ratos e observamos que o nervo ciático havia crescido em alguns deles, mas em nenhum o crescimento foi suficiente para alcançar as imediações do músculo extensor longo dos dedos.

As correntes elétricas provocam uma variedade de efeitos sensoriais e padrões de contração muscular [3,47,71]. Estas respostas ao estímulo elétrico dependem do tipo de corrente empregada, (intensidade, duração e forma de onda) e das características individuais do

organismo que está recebendo o tratamento (resistência da pele, limiar de disparo, etc). Por isto, torna-se difícil o uso de dosagem padrão fixa para todos os animais e em experimentos diferentes [59]. Usamos um aparelho no qual a corrente poderia ser ajustada e mantida constante durante as sessões de tratamento, a despeito das variações esperadas (movimentação, variação da resistência da pele e limiar de disparo, etc). Padronizamos a forma, frequência e largura do pulso: pulsos retangulares de 1 ms de duração, frequência de 10 Hz com períodos de estimulação e repouso alternados de 10 segundos. A amplitude do sinal foi ajustada para valores capazes de provocar vigorosa contração muscular. Estes valores eram ajustados de acordo com as características individuais de cada animal (aproximadamente 15mA).

Quando aplicamos estimulação elétrica no músculo desnervado, o objetivo é produzir uma contração tão semelhante à fisiológica quanto possível [54,57,59]. A corrente direta interrompida (corrente galvânica), é utilizada quando o músculo desnervado não responde a outras correntes. Utilizamos conjuntos de pulsos retangulares de 1 ms de duração que têm a vantagem de dissipar menos calor e com isto possibilitar o uso de corrente de maior amplitude com conseqüente acréscimo da tensão muscular por despolarização de grande número de fibras, condição importante para a eficácia do

tratamento [68].

A estimulação elétrica tem se mostrado mais efetiva para prevenir atrofia no músculo desnervado, quando aplicada sob condições de produzir estresse fisiológico máximo, isto é, a contração deve encontrar uma resistência, sendo também mais efetiva quando a contração é isométrica [42,68]. Durante a estimulação mantínhamos a pata do rato estirada, colocando assim alguma resistência. Deste modo, a contração obtida, não pode ser considerada isométrica pois a pata não ficava perfeitamente imobilizada. Tem sido demonstrado que a prevenção da atrofia do músculo desnervado é proporcional à intensidade e duração da corrente utilizada e do número de sessões [29]. Segundo outros estudos [68] a eficácia da eletroterapia parece ser independente da forma de corrente utilizada e da duração de cada período de estimulação (o músculo desnervado fadiga facilmente) porém mostra-se proporcional à frequência do tratamento.

A alteração da pele observada no local de aplicação dos eletrodos, durante as sessões de tratamento, parece relacionar-se à vasodilatação, hiperemia e aumento do metabolismo local, registradas nas áreas percorridas pela corrente [16]. Admitimos que a crosta, descamação e alteração "permanente" de cor, devam ser consequentes à queimadura provocada pela liberação de calor ocorrida pela passagem de corrente

pela pele.

É descrito que a aplicação de pulsos tetanizantes provoca dor nos primeiros minutos, levando posteriormente à elevação do umbral de dor, até à analgesia [16]. Os estímulos aplicados não apresentaram frequência suficiente para produzir contração tetânica, havendo entre os pulsos individuais uma breve pausa, suficiente para possibilitar um período de relaxamento muscular. Observamos que durante as sessões de tratamento, sob as condições que padronizamos, os animais demonstraram sempre sinais de desconforto como emissão de guinchos e tentativas de fuga da caixa de contenção.

Os pulsos tetanizantes induzem também à ocorrência de contraturas por uma grande proliferação de tecido conjuntivo, presumivelmente causada por microtraumas. Postula-se que um fator químico liberado pelas fibras musculares, induz crescimento de tecido conjuntivo no músculo desnervado e que a estimulação elétrica pode aumentar este processo [48]. Através da aplicação destas sequências rápidas de pulsos, nossas observações foram diferentes. Nenhum dos nossos animais apresentou limitação de amplitude de movimento e macroscopicamente não observamos área de hemorragia, aderências ou sinais de rompimento de fibras. Em nossas observações microscópicas no entanto, não focalizamos nossa atenção para este aspecto.

Acredita-se que os eletrodos implantados são mais eficientes em estimular as fibras musculares em sua totalidade, e por isto apenas eles deveriam ser utilizados em condições práticas [48,63] . Usamos eletrodos superficiais. Testamos sua eficiência em despolarizar as fibras musculares com o uso de eletromiógrafo TEKA TE-4 e observamos, com eletrodo de captação de agulha ,o potencial evocado à nível do músculo extensor longo dos dedos , após eletroestimulação. A amplitude do potencial evocado foi proporcional à intensidade do estímulo aplicado. Além disto, nossos resultados foram aproximados daqueles obtidos por experimento semelhante com o uso de eletrodo de agulha [49]. Nosso estudo mostrou então que a eletroterapia aplicada com eletrodos superficiais, apresentou resultados semelhantes àqueles já observados com a utilização de eletrodos de agulha . Considerando o desconforto do uso do eletrodo de agulha no paciente , somado à facilidade do uso do eletrodo superficial, admitimos que a indicação de eletroestimulação com eletrodos de agulha deve ser questionada.

A efetividade de várias correntes elétricas em prevenir a atrofia, tem sido demonstrada em animais de laboratório [13,37,42,65] . Embora experimentalmente possamos utilizar um padrão de estimulação de corrente de grande intensidade e/ou longa duração repetidas várias vezes ao dia, devemos reconhecer que do ponto de

vista prático esta dosagem seria dispendiosa e não seria bem tolerada pelo paciente.

Em fisioterapia, têm sido utilizadas dosagens tais como 10-30 estímulos de corrente contínua interrompida, 5 vezes por semana. O paciente vai ao centro de reabilitação para tomar estas aplicações. Ao que parece, esta dosagem é ineficaz na prevenção de atrofia embora outros efeitos como melhora do metabolismo e prevenção de aderências possam ser obtidos [4,6,7,16,38]. Estudos realizados por Nix & Dahm (1987), mostram a evidência de que a estimulação elétrica de baixa frequência e curta duração do músculo desnervado, tem efeito de retardar a atrofia muscular, mas em menor proporção (10%).

Em estudos experimentais a neuropatia é geralmente aguda, completa e sem reinervação, enquanto nas doenças humanas de desnervação, frequentemente observamos um processo parcial, crônico e com concomitante reinervação [12]. A estimulação elétrica parece retardar a atrofia por desnervação mas não fortalece o músculo normal [42]. Sendo assim, a dosagem dos estímulos elétricos deve ser baseada nas determinações repetidas de valores de reobase e cronaxia e a cinesioterapia deve ser iniciada tão logo se evidencie alguma força muscular [27,28].

Para superar os problemas práticos de possível subdosagem além do alto custo, talvez a melhor

solução seja o uso de aparelhos portáteis simples, de confecção adequada para ser utilizado pelo paciente, com controle da dosagem com base na determinação da reobase e cronaxia, feita semanalmente pelo médico. Desta forma, com custo relativamente baixo o paciente pode fazer a domicílio, três a cinco aplicações diárias de aproximadamente cinco minutos para cada grupo muscular o que equivaleria provavelmente a uma dosagem satisfatória. Torna-se desta forma possível o tratamento do músculo desnervado com várias aplicações diárias de curta duração, que parecem mais adequados, pois o músculo desnervado entra em fadiga mais rapidamente [38].

A atrofia muscular consequente à desnervação, parece ocorrer devido, entre outras causas, à interrupção do fluxo axoplasmático, à falta de impulsos de atividade e à liberação precoce de produtos consequentes à degeneração do nervo [5,10,17,20,26]. Em nosso trabalho, comparamos os grupos desnervados estimulados com os desnervados não estimulados e observamos atrofia em ambos, embora mais evidente no grupo desnervado não estimulado. Esta diferença foi significativa e disto podemos admitir que os impulsos de atividade são fatores importantes em retardar o processo de atrofia muscular consequente à desnervação.

Vários estudos já foram feitos mostrando as alterações da fibra muscular em decorrência da desnervação, tais como: atrofia miofibrilar, diminuição

da massa mitocondrial, reorientação espacial das mitocôndrias, etc [12,13,31]. Não fizemos tipagem das fibras musculares, nem usamos técnicas especiais em nosso trabalho. Registramos as alterações mais evidentes, observadas através da microscopia óptica e eletrônica de transmissão.

Com a desnervação as mitocôndrias reorientam-se com o eixo maior paralelo ao eixo maior das fibras musculares. Assim, secções transversais mostram mitocôndrias arredondadas. Parece que a disposição da mitocôndria é afetada pela atividade contrátil das miofibrilas [13]. Observa-se ainda redução no tamanho das secções transversais e longitudinais das mitocôndrias. As mitocôndrias alteram também o seu padrão de distribuição uniforme, tendendo a reunir-se em pequenos grupos. Estas observações foram evidentes nos grupos desnervados não estimulados e não apresentaram-se de forma significativa no grupo desnervado estimulado. É possível admitir então que a estimulação elétrica é eficaz em limitar o aparecimento destas alterações. Observamos mais intensa diminuição da quantidade de criptas mitocondriais no grupo desnervado não estimulado. Este achado sugere uma maior atividade oxidativa nas fibras musculares desnervadas e estimuladas, devido provavelmente à exigência de uma demanda maior de energia em consequência ao processo das contrações musculares.

No músculo desnervado ocorrem dilatações focais de túbulos transversos e retículo sarcoplasmático [13] . Em nosso trabalho a estimulação elétrica mostrou-se eficaz em diminuir a ocorrência desta alteração.

Embora inclusões filamentosas consideradas decorrentes de desorganização miofibrilar, tenham sido descritas a partir do décimo oitavo dia de desnervação do gastrocnêmio de camundongos, [45], nós não observamos estas inclusões em nosso material.

Tendo nossas observações sido feitas sempre no trigésimo dia após a cirurgia , vale ressaltar que os aspectos detectados representam um momento do processo que se desencadeou em consequência à desnervação. Pretendemos fazer estudos mais detalhados com maior número de animais e realizar observações em várias fases do processo de atrofia com utilização de técnicas histoquímicas para tipagem das fibras e assim detectarmos o efeito da eletroterapia nas várias etapas da atrofia de desnervação.

A estimulação elétrica direta do músculo, parece compensar completamente a ausência de influências neurais com respeito às propriedades da membrana [10,30,44,69]. Este efeito pode interferir negativamente com o processo de brotamento de colaterais do nervo e deve ser pensado e melhor estudado para indicação correta desta terapêutica na prática médica [51] . Além

do mais , como a estimulação mecânica tem se mostrado útil em prevenir a atrofia de desnervação são necessários mais estudos para verificar se os efeitos benéficos da eletroterapia não estariam relacionados com o aumento do metabolismo local, fator este que pode ser obtido quando se emprega várias outras técnicas como estímulo mecânico ou calor.

O músculo extensor longo dos dedos de ratos é pequeno em tamanho e rico em fusos neuromusculares, [32], sendo ideal para o seu estudo morfológico e em particular, de suas fibras intrafusais. No músculo extensor longo do dedos os fusos neuromusculares encontram-se dispostos principalmente nas fibras mais superficiais do músculo, exceto nas extremidades proximais dos tendões, e são encontrados em maior concentração nas regiões próximas à entrada dos três ramos principais do nervo que supre o músculo [32,72] . Os fusos neuromusculares ocorrem na proporção de um fuso por 3-7.5 miligramas deste músculo, ou seja, há aproximadamente 30 fusos musculares em cada músculo extensor longo dos dedos de ratos Wistar. O significado da concentração de fusos neuromusculares em determinada parte do músculo não está bem claro, podendo estar relacionado aos diferentes tipos de suprimento nervoso ou à intensidade de estiramento que o músculo ou uma porção particular dele, são submetidos [32,56,72]. Atualmente a morfologia do fuso neuromuscular de vários

animais já está bem definida [33].

O diâmetro dos fusos neuromusculares no músculo extensor longo dos dedos de ratos não é uniforme e varia de acordo com o número de fibras intrafusais [32,70]. Encontramos quatro ou cinco fibras intrafusais na maioria dos fusos observados, registro este que coincide completamente com os dados da literatura.

Os fusos neuromusculares sofrem processos atróficos consequentes à desnervação, que diferem conforme o tipo de desnervação, ou seja, motora, sensorial ou sensoriomotora [34]. Estas alterações são melhor observadas em processos crônicos embora observe-se que em menor grau, as fibras intrafusais sofrem o processo atrófico concomitante com as fibras extrafusais.

Seguindo longos períodos de desnervação, após três, seis e doze meses, observa-se diminuição da área transversal das fibras intrafusais, das mitocôndrias e dos núcleos, diminuição do número de mitocôndrias e aumento do número de fibras intrafusais e seus núcleos [58]. No nosso trabalho não houve tempo para ocorrerem estas mudanças e observações quantitativas necessitariam de melhores condições técnicas para serem detectadas, tais como: possibilidade de medição automática das áreas das fibras musculares, inclusão do material em araldite, utilização de navalha de diamante na ultramicrotomia, etc.

Acredita-se que a estimulação elétrica no tratamento de músculos desnervados, para prevenir atrofia, precisa ser iniciada o mais precocemente possível. Pouco estudo tem sido feito para avaliação deste aspecto. Esta crença fundamenta-se em observações experimentais realizadas em animais, onde verifica-se alterações mais pronunciadas no músculo, nas primeiras semanas após desnervação [13] e uma menor perda de peso do músculo e menor redução de áreas transversais de fibras musculares nos animais submetidos à estimulação galvânica mais precocemente [21]. Na segunda série de nosso trabalho, nos animais do terceiro grupo, a estimulação elétrica foi iniciada no primeiro, quinto ou décimo primeiro dia após desnervação. Os resultados não mostraram diferenças significativas entre estes animais. No entanto, o número de animais foi pequeno e por isso não permitimo-nos tirar conclusões quanto a este aspecto.

Nas duas séries, comparamos os grupos de animais desnervados estimulados com os desnervados não estimulados. Observamos diferenças significativas entre eles. Não fizemos tipagem das fibras musculares e isto pode explicar em parte os altos desvios padrões obtidos.

6. CONCLUSÃO

Das observações realizadas durante este experimento podemos concluir que :

1-Houve diferença , estatisticamente significativa, entre as áreas das fibras musculares desnervadas estimuladas e desnervadas não estimuladas.

2-Eletrodos superficiais podem ser empregados no tratamento do músculo desnervado em substituição aos eletrodos implantados sem prejuízo dos efeitos benéficos da estimulação elétrica.

3-Na dosagem padronizada para este experimento, a eletroterapia não mostrou ser capaz de provocar lesões macroscópicas significativas ou alteração na estrutura microscópica do músculo estudado.

4-A estimulação elétrica mostrou-se eficaz em limitar alterações morfológicas decorrentes da desnervação, tais como redução da quantidade de criptas mitocondriais , rearranjo espacial das mitocôndrias, etc.

7. BIBLIOGRAFIA

- 1- Adams, R.D. Experimental pathology : denervation atrophy. In:_____ Diseases of muscle in pathology: A study in pathology. 3a.ed. Philadelphia, Harper and Row ,1975. p. 112-37.
- 2- Bajusz Eors: "Red" skeletal muscle fibers: relative independence of neural control. Science,145:938-39, 1964..
- 3- Bates, J.A.V.: Therapeutic electrical stimulation. the transistorized placebo?. Contemporary Clinical Neurophysiology (Suppl), 34:329-34, 1978.
- 4- Cash, J.E. Efectos de las lesiones nerviosas perifericas. In:_____Fisioterapia.Recuperación Postoperatoria. Barcelona, Jims,1969. p.289-305.
- 5- Cangiano, A. L.L.: Partial denervation affects both denervated and innervated fibers in the mammalian skeletal muscle. Science ,194:542-45 ,1977.

6- Carneiro, A.P. et al Lesão Nervosa Periférica
In: Lianza, S. Medicina de Reabilitação.
1a. ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1985.
p.314-34.

7- Cole, B.G. and Gardiner P.F.: Does electrical
stimulation of denervated muscle, continued after
reinnervation, influence recovering of
contractile function?, Exp. Neurol., 85: 52-62,
1984.

8- Cotta, H. et al Electroterapia .In:_____.
Tratado de Rehabilitación. 3a.ed. Labor SA, 1975.

9- Daniel, P.M. et al Reaction of muscle to
denervation. In:_____. Systemic pathology.
Edinburgh, Churchill, 1979. p.2371-2375.

10- Drachman, D.B. and Witzke, F.: Trophic regulation of
acetylcholine sensitivity of muscle: effect of
electrical stimulation. Science, 176: 514-16, 1972.

11- Elliot, D.R. and Thomson, J.D.: Dynamic properties
of denervated rat muscle treated with
electrotherapy. Am. J. Physiol., 205: 173-76, 1963.

12-Engel, A.G. et al: Histochemical studies of denervated or tenotomized car muscle: illustrating difficulties in relating experimental animal conditions to human neuromuscular diseases. *Ann. NY Acad. Sci.*, 138:10-185, 1966.

13-Engel, A.G. et al: Morphological effects of denervation of muscle. A quantitative ultrastructural study. *Ann. NY Acad. Sci.*, 228:68-88 1974.

14-Fischer, E.:Effect of faradic and galvanic stimulation upon course of atrophy in denervated skeletal muscles. *Am. J. Physiol.*, 127:,605-19 1939.

15-Fischer, E. and Ramsey, V.W.: Effect of daily electrical stimulation of normal and denervated muscles upon their protein content and upon some of the physicochemical properties of protein. *Am. J. Physiol.*, 145:583-86, 1946.

16-Forcade, A.F. and Castellet, F: Las corrientes pulsantes In:_____. *Fisiatria: Semicologia, Fisioterapia, Rehabilitación*. Delta, 1973. p.142-50.

17-Girlanda, P. et al:Effect of electrotherapy on

- denervated muscles in rabbits: an electrophysiological and morphological study. Exp. Neurol., 77:483-91, 1982.
- 18-Gordon, E.E. et al: Adaptations of muscle to various exercises. JAMA, 199: 139-44 , 1967.
- 19-Greene, E.C.: Anatomy of the cat. London, Hafner, 1963
- 20-Guttmann, A.Z.: Electroterapia In:_____. Fisioterapia Actual . Barcelona, Jims, 1971. p.9-27.
- 21-Guttmann E. and Guttmann L.: Effect of galvanic exercise on denervated and reinnervated muscles in rabbit J.Neurol.Neurosurg.Psychiatry, 7: 7-17, 1944.
- 22-Herbert, W.L. et al: Regenerative process in peripheral nerve injury : A new method for their evaluation. Arch.Phys.Med.Rehabil, 63:124-29, 1982.
- 23-Herbison, G.J. et al: Reinnervating rat skeletal muscle: effect of 35% grade treadmill exercise. Arch. Phy. Med.Rehabil., 63:313-16 , 1982.
- 24-Herbison, G.J. et al:Electrical stimulation of sciatic nerve of rats after partial denervation of soleus muscle. Arch.Phys.Med.Rehabil., 67:79-83 ,

1966.

25-Herbison, G.J. et al: Contractile properties of reinnervating skeletal muscle in the rat. Arch. Phys. Med. Rehabil., 62: 35-9, 1981.

26-Herbison, G.J. et al: Acetylcholine sensitivity and fibrillation potentials in electrically stimulated crush-denervated rat skeletal muscle. Arch. Phys. Med. Rehabil., 64: 217-20, 1983.

27-Herbison, G.J. et al: Exercise therapies in peripheral neuropathies. Arch. Phys. Med. Rehabil., 64: 201-05, 1983.

28-Herbinson, G.J. et al: Contractile properties of reinnervating skeletal in the rat. Arch. Phys. Med. Rehabil., 62: 35-9, 1981.

29-Herbison, G.J. : Effect of electrical Stimulation on Denervated Muscle of Rat. Arch. Phys. Med. Rehabil. 52: 516-22 , 1971.

30-Hines, H.M. et al: Effect of electrical stimulation on neuromuscular regeneration. Amer. J. Physiol., 144: 278-83, 1945.

31-Hines, H.M. and Thompson, J.D. :Changes in muscle and nerve following motor neuron denervation-special review In: International Review of Physical Medicine and Rehabilitation, 1956. p.35-57.

32-Huik P. and Zelena, J. : Atypical spindle in reinnervated rat muscle. Embryol. Exp. Morph., 9:456-67 ,1961.

33-Hulliger, M.: The mammalian muscle spindle and its central control. Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol., 101:1-110, 1984.

34-Imash M. et al : The pathology of the human muscle spindle. Effect of denervation. J. Neurolog. Sci., 22: 1-24 ,1974

35-Jaweed, M.M. et al: Direct electrical stimulation of rat soleus during denervation , Reinnervation. Exp. Neurol., 75: 589-99, 1982.

36-Karnovsky, M.J.: A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. J. Cell Biol., 27 :137-38,1965.

37-Kosman A.J. et al: The comparative effectiveness of

- various electrical currentes in preventing muscle atrophy in the rat. Arch. Phys. Med.,28: 7-12,1947.
- (a).
- 38-Kosman A.J. et al : The influence of duration and frequency of treatment in electrical stimulation of paralyzed muscle. Arch. Phys. Med.,28: 12-17, 1947
- (b).
- 39-Kosman, A.J. et al: Importance of current form and frequency in electrical stimulation of muscles:Studies in retardation of muscle atropphy in dogs. Arch.Phys.Med.,:29: 559-62,1948.
- 40-Lane-Petter,W.: The laboratory Rat. In:_____. UFAW Handbook on the care and management of laboratory animals. Sa. ed. Edinburgh, Churchill, 1976 p. 210.
- 41-Leitão, A.: Eletroterapia: Correntes exitomotoras. In:_____ Fisiatria Clínica. Rio de Janeiro, Atheneu,1979. p.212-40.
- 42-Lieber, R.L.: Skeletal muscle adaptability III:muscle properties following chronic electrical stimulation Dev.Med. Child Neurol., 28:662-70,1986.
- 43-Merletti, R and Pinelli, P. : A critical appraisal of

- neuromuscular stimulation and electrotherapy in neurorehabilitation. Eur. Neurol., 19:30-2, 1980.
- 44-Lomo, T. and Rosenthal, J.: Control of ACH sensitivity by muscle activity in the rat. J.Physiol., 221:493-513, 1972.
- 45-Nakashima, N.:Inclusion bodies in denervated skeletal muscles of mice. Nagoya J.Med. Sci., 33:189-202, 1970.
- 46-Nemeth ,P.M. :Electrical stimulation of denervated muscle prevents decreases in oxidative enzymes. Muscle Nerve,5: 134-39, 1982.
- 47-Nichols,P.J.R.: Electrotherapy. In:-----
Rehabilitation Medicine. London, Butterworths, 1976.
p.20-21.
- 48-Nix,W.A and Dahm, M.: The effect of isometric short-term eletrical stimulation on denervated muscle. Muscle Nerve, 10:136-43,1987.
- 49-Pachter, B.R. et al :Electrical stimulatiuon effect on denervated skeletal myofibers in rats: A light and electron microscopic study. Arch. Phys. Med. Rehabil., 63:427-30, 1982.

50-Pena, M. et al: Princípios de medicina física.

In:Lianza, S. Medicina de reabilitação. Rio de Janeiro, Guanabara , 1985. p.70-98.

51-Pinelli, P:Workshop on the electroteraphy of denervated muscles,Riv. Patol. Nerv. Ment., 90:87-9, 1978.

52-Pollock L.J. et al: Electrotherapy in experimentally produced lesions of ppheripheral nerves. Arch.Phys.Med., 32: 377-87, 1951.

53-Reynolds, B.S.:The use of lead citrate at hight ph as an eletron opaque stain in electron microscopy. J.Cell.Biol., 17:208-12, 1963.

54-Rusk, H.A.: Electroterapia In:_____ Medicina de Rehabilitation. 2a. ed. Interamericana , 1966. p. 71-2.

55-Sahgal V. and Hast, M.H. :Effect of denervation on primate laryngeal muscles: a morphologic and morphometric study. J. Laryngol. Otol., 100:553-60, 1986.

56-Schiaffino , S. et al: Relations between structure

and function in rat skeletal muscle fibers. J. Cell Biol., 47:107-19, 1970.

57-Schimrigk, K. et al: The effect of electrical stimulation on the experimentally denervated rat muscle. Scand.J.Rehabil. Med., 9: 55-60 ,1977.

58-Schroder, M.J. et al.: The fine structure of denervated and reinnervated muscle spindles:morphometric study of intrafusal muscle fibers. Acta Neuropathol. 4: 95-100, 1979.

59-Scott, P.M.: Electroterapia y actinoterapia - Barcelona , Jims, 1972. 381 p.

60-Shaffer, D.V. et al: Influence of electrical stimulation on course of denervation atrophy. Arch.Phys.Med., 35:491-99 1954.

61-Swash, M. and Fox, K.P. : Histological features of denervation. In:_____ Biopsy pathology of muscle New York,Chapman, 1984,p.66-75.

62-Stillwell, G.K. , and Wakim, K.G.: Effect of varying interval between sessions of electric stimulation of denervated rat muscle. Arch.Phys.Med., 43:95-98, 1962.

63-Steinberger, W.W. and Smith, E. M. :Maintenance of denervated rabbit muscle with direct electrostimulation. Arch. Phys. Med. Rehabil., 49:573-77, 1968.

64-Stromberg, M.W. et al: Nervous system In: Anatomy of the laboratory rat. Baltimore, Williams & Wilkins , 1976.

65-Valencic, V. et al: Improved motor response due to chronic electrical stimulation of denervated tibialis anterior muscle in humans. Muscle Nerve, 9: 612-17, 1986.

66-Wakim, K.G. et al: Influence of electrical stimulation on work output and endurance of Denervated Muscle : Arch. Phys. Med., 36:370-76 , 1955.

67-Wehrmacher, W.H. et al. Effects of electrical stimulation on denervated skeletal muscle. Arch. Phys. Med. ,5: 221-66, 1945.

68-Wehrmacher, W.H.:Light and electron microscopy. Arch. Phys. Med. Rehabil., 64: 188,1983.

69-Westgaard, R.H.:Influence of activity on the passive electrical properties of denervated soleus muscle fibres in the rat . J. Physiol.,251 :683-97, 1975.

70-Yellin, H.:A histochemical study of muscle spindles and their relationship to extrafusal fiber types in the rat. Am. J. Anat., 125 :31-46, 1969.

71-Zebo, T.J.:Factors affecting skeletal muscle contraction by electrical stimulation . Engineering Design Center. Case Institute of Technology. 1967. p.53-5.

72-Zelena, J. et al: Absence of muscle spindles in regenerated muscles of the rat. Physiologie Bohemoslovaca, 20 : 433-39 ,1971.

Referências bibliográficas: Segundo a Associação Brasileira de Normas Técnicas , 1978.

ANEXOS

ANEXO 1

Ração Probiotério G-49

Níveis de garantia

umidade (máximo).....	12%
proteína bruta(mínimo).....	23%
extrato etéreo(mínimo).....	3.5%
matéria fibrosa (máximo)	10%
matéria mineral (máximo).....	7.5%
cálcio (máximo).....	1.4%
fósforo(mínimo).....	0.7%

Composição básica: Milho, lecitina de soja, farelo de soja, concentrado proteínoso de milho, farinha de carne, farinha de peixe, farelinho de trigo, farelo de arroz, solvente, farelo proteínoso de milho, carbonato de cálcio, fosfato bicálcio, farinha de ossos calcinados.

enriquecimento por Kg do produto

vitamina A.....	1200 U.I.
vitamina D3.....	300 U.I.

vitamina E.....	18 U.I.
vitamina K.....	1.4 mg
vitamina B2.....	4.5 mg
ácido nicotínico	30 mg
ácido pantotênico.....	6.5 mg
ferro.....	19 mg
cobalto.....	0.1 mg
cobre.....	5 mg
manganês.....	40 mg
zinco.....	80 mg
iodo.....	0.25 mg

ANEXO 2

Programa para geração de pulsos retangulares
utilizados nas sessões de eletroestimulação

```
                org      00000h

cont            defb     0

rb              defb     0

rc              defb     0

rd              defb     0

re              defb     0


stack          equ      0ffffh


in0:            ld        sp,stack

inicio:         ld        a,100

                ld        (cont),a

ini:            ld        a,01

                out        (0ffh),a

                ld        a,02

                ld        (re),a

                ld        a,01

                ld        (rd),a
```

```

ld      (rc),a
ld      a,14
ld      (rb),a
call    temp
ld      a,02
out      (Offh),a
ld      a,05
ld      (re),a
ld      a,0ch
ld      (rd),a
ld      (rc),a
ld      a,14
ld      (rb),a
call    temp
ld      a,(cont)
dec     a
ld      (cont),a
jp      nz,in1
ld      a,30
ld      (re),a
ld      a,20
ld      (rc),a
ld      (rd),a
ld      a,100
ld      (rb),a
call    temp
jp      inicio

```

```

temp:    ld    a, (rb)
         ld    b, a
temp1:   ld    a, (rc)
         ld    c, a
temp2:   ld    a, (rd)
         ld    d, a
temp3:   ld    a, (re)
         ld    e, a
temp4:   dec    e
         jp    nz, temp4
         dec    d
         jp    nz, temp3
         dec    c
         jp    nz, temp2
         dec    b
         jp    nz, temp1
         ret

```

ANEXO 3

Programa para cálculo da área

```
1 REM
2 REM
3 REM
4 REM
5 DIM X(10):DIM Y1(10):DIM Y2(10)
10 CLS:LOCATE 2,10,0
20 INPUT "QUAL É A IDENTIFICAÇÃO DA FOTO";NMS
30 CLS:LOCATE 2,10,0:INPUT "QUAL É O DIAMETRO DA FOTO (C
M) ";DI:CLS
40 LOCATA 2,10,0:PRINT "FAREMOS MEDIDAS DE ";DI/10;"EM";
DI/10;" CM"
50 FOR N=0 TO 10
55 CLS:LOCATE 2,10,0
60 PRINT "QUAL O VALOR DE Y1 PARA X= ";DI/10*N
70 INPUT Y1(N)
80 PRINT "QUAL O VALOR DE Y2 PARA X=";DI/10*N
90 INPUT Y2(N):Y2(N)=Y2(N)-Y1(N)
100 NEXT N
110 CLS
```

```

120 D4=0:D2=0:I1=0:I2=0
130 FOR N=1 TO 9 STEP 2
140 D4=D4+Y1(N)
150 NEXT N
160 FOR N=2 TO 8 STEP 2
170 D2=D2+Y1(N)
180 NEXT N
190 I1=Y1(0) + 4*D4+2*D2+Y1(10)
195 D4=0:D2=0
200 FOR N=1 TO 9 STEP 2
210 D4=D4+Y2(N)
220 NEXT N
230 FOR N=2 TO 8 STEP 2
240 D2=D2+Y2(N)
250 NEXT N
260 I2=Y2(0) +4*D4+2*D2+Y2(10)
270 I=(I1+I2)*BI/30:CLS:LOCATE 2,10,10
275 A=I*1000000000
290 K=500
300 LOCATE 2,10,0:PRINT "AREA EM MICROMETROS ";A/K/K
310 PRINT:PRINT:LOCATE 2,15,0:GOTO 360
320 PRINT "VOCE DESEJA IMPRIMIR OS RESULTADOS (S/N)":
330 R$=INKEY$
340 IF R$="N" OR R$="n" THEN GOTO 10
350 LPRINT "FOTO # ";NM$
370 LPRINT
375 LPRINT "X","Y1","Y2"

```

```
380 FOR N=0 TO 10
390 LPRINT DI/10*N, Y1(N),Y2(N)
400 NEXT N
410 LPRINT:LPRINT
420 LPRINT "AREA : "
425 LPRINT USING "#####.## "; A/K/K
426 LPRINT "MICROMETROS QUADRADO "
427 LPRINT:LPRINT:LPRINT
430 GOTO 10
```