

Eletroestimulação atenua alterações morfológicas e previne atrofia do músculo tibial cranial desnervado

Electrical stimulation attenuates morphological alterations and prevents atrophy of the denervated cranial tibial muscle

Cleuber Rodrigo de Souza Bueno¹, Mizael Pereira², Idvaldo Aparecido Favaretto Junior², Carlos Henrique Fachin Bortoluci¹, Thais Caroline Pereira dos Santos¹, Daniel Ventura Dias³, Letícia Rossi Daré³, Geraldo Marco Rosa Junior¹

RESUMO

Objetivo: Investigar se a estimulação elétrica pela corrente russa é capaz de manter a morfologia do músculo tibial cranial de ratos desnervados experimentalmente. **Métodos:** Foram utilizados 36 ratos Wistar, distribuídos em quatro grupos: Grupo Controle Inicial, Grupo Controle Final, Grupo Experimental Desnervado Tratado, Grupo Experimental Desnervado. A eletroestimulação foi realizada com um protocolo de corrente russa aplicada três vezes por semanas, durante 45 dias. Ao final, os animais foram eutanasiados e, em seguida, foram realizadas as análises histológica e morfométrica. Os dados foram submetidos à análise estatística, com nível de significância de $p < 0,05$. **Resultados:** Os Grupos Experimental Desnervado e o Grupo Experimental Desnervado Tratado apresentaram área de secção transversal da fibra menor quando comparados ao Grupo Controle Final. Entretanto, constatou-se diferença significativa entre o Grupo Experimental Desnervado e o Grupo Experimental Desnervado Tratado, mostrando que a estimulação elétrica minimizou atrofia muscular. Ainda, observou-se que o Grupo Experimental Desnervado Tratado apresentou resultados semelhantes ao Grupo Controle Inicial. **Conclusão:** A estimulação elétrica por meio da corrente russa foi favorável na manutenção da morfologia do músculo tibial cranial desnervado experimentalmente, minimizando a atrofia muscular.

Descritores: Estimulação elétrica/métodos; Músculo esquelético; Atrofia muscular; Denervação muscular; Ratos

ABSTRACT

Objective: To investigate if electrical stimulation through Russian current is able to maintain morphology of the cranial tibial muscle of experimentally denervated rats. **Methods:** Thirty-six Wistar rats

were divided into four groups: the Initial Control Group, Final Control Group, Experimental Denervated and Treated Group, Experimental Denervated Group. The electrostimulation was performed with a protocol of Russian current applied three times per week, for 45 days. At the end, the animals were euthanized and histological and morphometric analyses were performed. Data were submitted to statistical analysis with a significance level of $p < 0.05$. **Results:** The Experimental Denervated Group and the Experimental Denervated and Treated Group had cross-sectional area of smaller fiber compared to the Final Control Group. However, there was significant difference between the Experimental Denervated Group and Experimental Denervated and Treated Group, showing that electrical stimulation minimized muscle atrophy. The Experimental Denervated and Treated Group and Initial Control Group showed similar results. **Conclusion:** Electrical stimulation through Russian current acted favorably in maintaining morphology of the cranial tibial muscle that was experimentally denervated, minimizing muscle atrophy.

Keywords: Electric stimulation/methods; Muscle, skeletal; Muscular atrophy; Muscle denervation; Rats

INTRODUÇÃO

As lesões nervosas periféricas são frequentes na sociedade, tornando-se preocupação para a saúde pública e o sistema previdenciário. Suas causas mais prevalentes são as ocasionadas por projéteis de arma de fogo, quedas, traumas perfurocortantes e acidentes automotivos.⁽¹⁻⁴⁾

Sabe-se que a desnervação ocasiona a perda de massa muscular, a diminuição da secção transversal das

¹ Universidade do Sagrado Coração, Bauru, SP, Brasil.

² Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo, Bauru, SP, Brasil.

³ Universidade Federal do Pampa, Uruguaiana, RS, Brasil.

Autor correspondente: Geraldo Marco Rosa Junior – Rua Irmã Arminda, 10-50 – Jardim Brasil – CEP: 17011-160 – Bauru, SP, Brasil – Tel.: (14) 2107-7199 – E-mail: geraldomjr@yahoo.com.br

Data de submissão: 2/9/2016 – Data de aceite: 5/1/2017

Conflitos de interesse: não há.

DOI: 10.1590/S1679-45082017AO3808



fibras e a incapacidade de gerar força, acompanhada do aumento de tecido conjuntivo em nível de perimísio e endomísio.⁽⁵⁾ Esta fase é seguida por necrose progressiva e apoptose das fibras musculares, além de substituição do tecido muscular por tecido conectivo fibroso e tecido adiposo.⁽⁶⁻⁸⁾

A melhora da recuperação motora após a lesão e o reparo do nervo podem ser otimizados, acelerando a regeneração axonal e diminuindo a progressão da atrofia no músculo alvo, melhorando também, desta forma, sua capacidade funcional.⁽⁹⁾

Neste sentido, vários autores sugeriram que a estimulação elétrica feita no músculo após o reparo pode ser benéfica durante o período de regeneração nervosa. Sugere-se também que, durante o período de desnervação, o método mais direto para minimizar a atrofia no músculo é a estimulação elétrica.⁽¹⁰⁻¹²⁾

Caierão et al.⁽¹³⁾ relatam diminuição do tecido conjuntivo e aumento da área da fibra muscular por meio de um protocolo de estimulação elétrica no músculo desnervado. Matheus et al.⁽¹⁴⁾ mencionam melhora nas propriedades mecânicas do músculo.

Estudos do uso terapêutico da estimulação elétrica são controversos entre si, devido à falta de consenso na utilização de parâmetros, intensidade, duração e protocolos, necessitando de mais estudos para avaliar protocolos de estimulação elétrica, principalmente, em músculos desnervados. No entanto, há registros de que estimulação elétrica promoveu efeitos deletérios, retardando a recuperação funcional e acelerando a atrofia das fibras musculares de ratos submetidos à axonotmese.⁽¹⁵⁾

Nesse sentido, idealizamos o presente estudo experimental para avaliarmos os efeitos de um protocolo de estimulação elétrica direcionado para um músculo desnervado que é composto de fibras musculares mistas.

OBJETIVO

Investigar se a estimulação elétrica pela corrente russa é capaz de manter a morfologia do músculo tibial cranial de ratos desnervados experimentalmente.

MÉTODOS

Foram utilizados 36 ratos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Wistar, jovens, machos, com 80 dias de vida, pesando em média 250g. Os animais foram mantidos em caixas apropriadas, com água e ração *ad libitum*, sem restrições na movimentação, respeitando ciclos de 12 horas de luz, em temperatura média de 24°C. O trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade

do Sagrado Coração, com o protocolo 231/10 e realizado no período de 2011/2012.

Os animais foram distribuídos em quatro grupos com nove animais em cada, denominados assim: Grupo Controle Inicial (GCI), cujos animais foram eutanasiados com 80 dias de vida, ou seja, no início do experimento; Grupo Controle Final (GCF), cujos animais foram eutanasiados com 125 dias de vida, ou seja, no final do experimento; Grupo Experimental Desnervado (GED), cujos animais foram desnervados com 80 dias de vida, não receberam nenhum tipo de tratamento e após 45 dias foram eutanasiados; Grupo Experimental Desnervado Tratado (GEDT), cujos animais foram desnervados com 80 dias de vida, receberam o tratamento pós-cirúrgico de estimulação elétrica por 45 dias e foram eutanasiados.

Procedimentos cirúrgicos

Os animais foram pesados e submetidos à anestesia geral com injeção intramuscular de cloridrato de tiletamina associada a cloridrato de zolazepam (10mg/kg) na região dorsolateral da coxa esquerda. Eles foram considerados anestesiados quando o reflexo córneo-palpebral foi negativo e não demonstraram nenhuma reação motora imediatamente após a estimulação dolorosa do coxim adiposo de qualquer um dos membros.

Foi realizada tricotomia da face dorsolateral do membro pélvico direito, com os animais posicionados em decúbito ventral na placa de cortiça, as patas fixadas com fita adesiva. A antisepsia foi realizada com iodo-povidona com 1% de iodo ativo (Povidine Alcoólico®, VIC Pharma Ind. e Com. Ltda., Taquaritinga, SP, Brasil).

Foi feita uma incisão longitudinal na face dorsolateral da coxa direita com aproximadamente 2cm. A pele e a tela subcutânea foram rebatidas, e os músculos supra-jacentes, divulsionados, para exposição e secção total do nervo isquiático. Após a secção do nervo, a extremidade proximal foi retrovertida em 180° e suturada no músculo adjacente, enquanto a extremidade distal foi retrovertida 180° e suturada na tela subcutânea, para evitar a reinervação espontânea.⁽¹⁶⁾

Nos 2 dias consecutivos, foi administrada medicação analgésica de dipirona 150mg/kg (Analges V®, Agener União) via intraperitoneal a cada 12 horas.

Protocolo de eletroestimulação

O músculo tibial cranial foi escolhido por sua localização superficial, o que facilita o posicionamento dos eletrodos para a estimulação elétrica. Foi usado o aparelho da marca KLD Endophasys R Et 9701. Os eletrodos cutâneos, com dimensões de 2cm x 2cm, e gel

de acoplamento, foram posicionados sobre o músculo tibial cranial.

A eletroestimulação ocorreu em três sessões semanais, com dois ciclos de aplicação, durante os 45 dias. Os ratos receberam aplicações de estimulação elétrica com corrente russa.

O primeiro ciclo foi realizado por 10 minutos, com o objetivo de estimular as fibras vermelhas. Para isto, foi utilizada a frequência de ciclo de 2500Hz em período de 0,4ms; frequência de ativação de 30Hz; intervalos de 3/1, com 9 segundos de estimulação para 27 segundos de repouso. A percentagem de modulação foi de 50%.

O segundo ciclo foi realizado por 10 minutos, para estimular as fibras brancas. Para isso, foi utilizada a frequência de ciclo de 2500Hz, em período de 0,4ms; frequência de ativação de 100Hz; intervalos de 3/1, com 9 segundos de estimulação para 27 segundos de repouso. A percentagem de modulação foi de 50%.⁽¹⁷⁾

Eutanásia e coleta do músculo tibial cranial

Os animais foram eutanasiados após 45 dias decorridos da cirurgia com overdose anestésica. Após, foi coletado o músculo tibial cranial direito de todos os animais.

Processamento histológico e morfometria muscular

Para o tratamento histológico, foi retirado um fragmento da porção média do ventre muscular e posicionado no meio de inclusão Tissue-Tek® (O.C.T., Sakura Finetek, Torrance, EUA) para congelamento em nitrogênio líquido, obtenção de cortes histológicos de 10µm em criostato (Leica®, CM1850, Nussloch, Alemanha) a -20°C e confecção das lâminas histológicas em coloração de hematoxilina e eosina.⁽¹⁸⁾

A observação e a morfometria dos músculos foram realizadas utilizando-se o *software* de captura e análise de imagem Image-Pro Plus® 6.2 (Media Cybernetics, Bethesda, MD, EUA), acoplado ao microscópio óptico (Olympus®, BX50, Tóquio, Japão) e este acoplado a uma câmera fotográfica (Olympus® DP-71, Tóquio, Japão) com resolução de 12 *megapixels*. Foi realizada a morfometria de 220 fibras de cada animal, agrupadas em ordem crescente de valores; foram retiradas as dez maiores e as dez menores fibras musculares.⁽¹⁹⁾

Análise estatística

Aplicou-se o teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Posteriormente, os grupos foram comparados pela técnica da Análise de Variância *one-way* (*one-way* ANOVA) e foram aplicados testes de Tukey com nível de significância $p \leq 0,05$.

RESULTADOS

Observações macroscópicas

Em todos os animais do GCI e do GCF, foi observada morfologia normal do músculo, enquanto que, nos grupos GED e GEDT, nenhum animal apresentou sinais de reinervação espontânea por neurotização. Constatou-se autofagia na região lateral da pata operada nos animais do grupo GED, fato acontecido pela secção do nervo isquiático que, de forma indireta, lesiona o nervo sural, o qual tem a função de propiciar a inervação sensitiva da pata do animal. Desta forma, o animal julgava que a pata não o pertencia mais e praticava a automutilação. Estes achados não foram observados nos animais do grupo desnervado tratado com o protocolo da estimulação elétrica.

Observações histológicas

A histologia dos cortes transversais mostrou fibras musculares poligonais no GCF e no GCI, com núcleos periféricos, padrão fascicular normal, arquitetura histológica organizada pela presença de envoltórios conjuntivos, perimísio e endomísio, delimitando respectivamente cada fascículo e fibra muscular, e evidenciando a morfologia normal do tecido muscular estriado esquelético. Apenas uma característica diferente foi observada entre os grupos, comprovada na análise morfométrica e esperada naturalmente: fibras musculares visivelmente maiores no GCF, comparado ao GCI, devido ao desenvolvimento natural e sabidamente mais acelerado dos ratos quando comparado ao humano no período do estudo (Figura 1).

Já o GED apresentou grande aumento de tecido conjuntivo em nível de perimísio e endomísio, concomitantemente com desorganização fascicular, núcleos centralizados, fibras de pequena área, com morfologia angulada, caracterizando fibras musculares que sofreram a desnervação e estavam em processo de atrofia (Figura 1). Outro achado foi o aumento do número de fibras (intrafusais) no fuso muscular destes animais (Figura 2).

No grupo GEDT, observaram-se características inerentes tanto do GCF, quando do GED. Constatou-se a maioria das fibras musculares com núcleos periféricos; núcleos centrais também foram observados, mais em raras ocasiões. Outra característica encontrada foi uma discreta desorganização fascicular, principalmente no perimísio. A maioria das fibras apresentou morfologia poligonal, com presença de algumas fibras musculares anguladas e de pequena área. Além disso, não foi observado aumento de fibras intrafusais como visto no GED (Figuras 1 e 2).

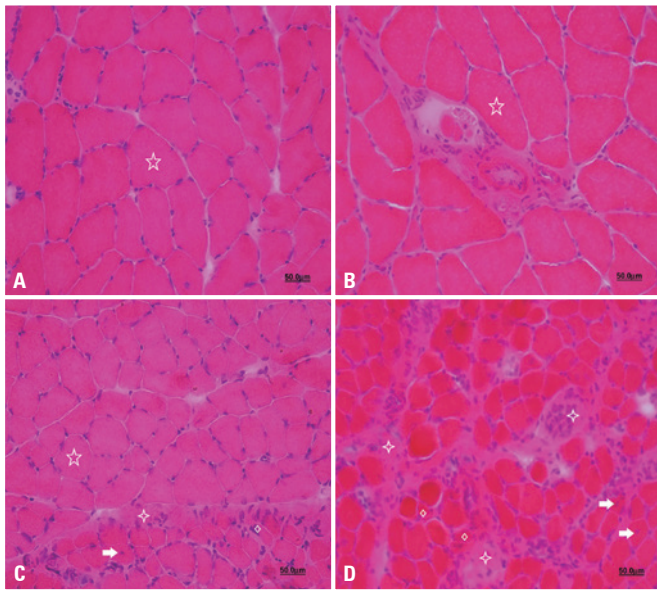


Figura 1. Fotomicrografia do músculo tibial cranial em corte transversal, sendo Grupo Controle Inicial (A), Grupo Controle Final (B), Grupo Experimental Desnervado Tratado (C), Grupo Experimental Desnervado (D). Observar fibras poligonais (estrela com cinco pontas), invasão de tecido conjuntivo (estrela com quatro pontas), núcleos centrais (seta branca), fibra muscular atrófica (losango). Coloração em hematoxilina e eosina. Aumento de 40x

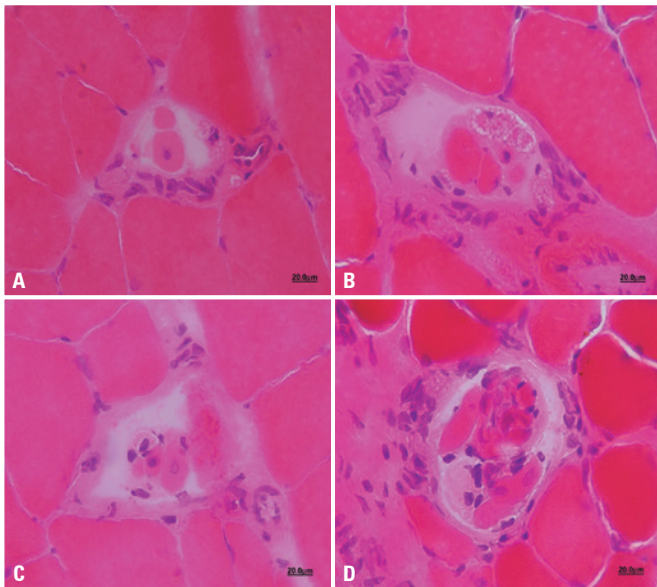
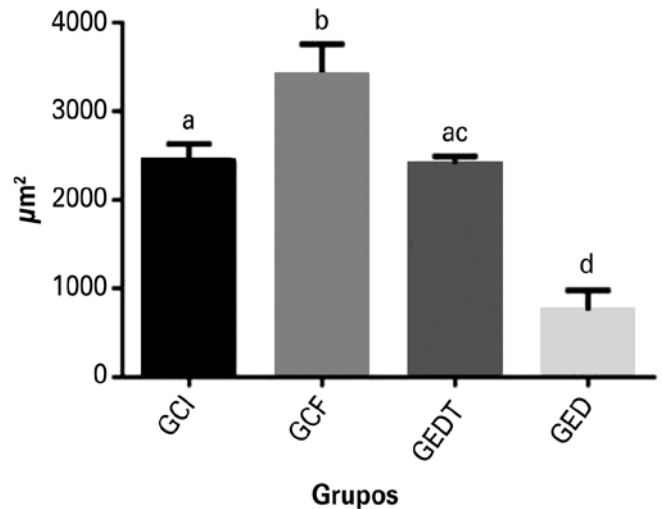


Figura 2. Fotomicrografia em corte transversal de destaque dos fusos musculares, sendo: Grupo Controle Inicial (A), Grupo Controle Final (B), Grupo Experimental Desnervado Tratado (C) e Grupo Experimental Desnervado (D). Observar a quantidade e a diferença de fibras intrafusais entre os grupos. Coloração em hematoxilina e eosina. Aumento de 100x

Análise morfométrica

Os dados morfométricos mostraram que houve diferença significativa entre o GEDT ($2402 \pm 94 \mu\text{m}^2$) comparado com o GED ($755 \pm 227 \mu\text{m}^2$). Já quando o GCI

($2441 \pm 193 \mu\text{m}^2$) foi comparado ao GEDT, não ocorreu diferença entre eles. Na comparação entre o GCF ($3414 \pm 342 \mu\text{m}^2$) e o GEDT, aquele obteve média significativa maior que este (Figura 3).



GCI: Grupo Controle Inicial; GCF: Grupo Controle Final; GED: Grupo Experimental Desnervado; GEDT: Grupo Experimental Desnervado Tratado.

Figura 3. Média e desvio padrão da área das fibras musculares dos grupos do experimento (letras diferentes representam diferença estatisticamente significante)

DISCUSSÃO

Neste estudo, foi utilizado o modelo de neurotmesa cirúrgica do nervo isquiático (secção total) e em nenhum dos animais desnervados GED e GEDT foi observada reinervação espontânea. Em estudos com desnervação, é necessária atenção especial ao procedimento cirúrgico empregado.

Em lesões classificadas como neurotmesa, a transecção do nervo é total, e a regeneração depende necessariamente da intervenção cirúrgica, sendo este o modelo mais adequado para o estudo do processo de desnervação,⁽¹³⁾ diferente de muitos autores que optam pela lesão do nervo por esmagamento em seu desenho experimental. Alguns autores enfatizam que este artifício pode preservar parcialmente a estrutura do nervo, o que facilitaria a regeneração.⁽²⁰⁻²³⁾

A morfologia nos revela o estado correspondente do músculo. Características histológicas inerentes ao músculo sadio e desnervado podem ser observadas. A presente análise histológica revela que a estimulação elétrica conseguiu atenuar as modificações morfológicas decorrentes do fenômeno da desnervação.

Neste sentido, Schmalbruch et al.,⁽²⁴⁾ descrevem a presença de núcleos centrais como um processo característico da desnervação. O GED apresentou diversos núcleos centrais, diferentemente do GEDT.

Viguie et al.,⁽²⁵⁾ relatam que, com o aumento do período de desnervação, há uma diminuição progressiva de mionúcleos por fibra muscular, além de aumento inicial com posterior queda no número de células satélite, estando estes eventos correlacionados com uma diminuição da capacidade reparadora do músculo.

A hiperplasia do tecido conjuntivo também é bastante evidente nos músculos desnervados, principalmente em nível de perimísio e endomísio.⁽²⁶⁾ Em nossos estudos, verificamos que o GEDT minimizou a proliferação do tecido conjuntivo, diferente do GED, no qual um grande espaçamento pode ser visto histologicamente entre as fibras com tecido conjuntivo interposto.

Järvinen et al.,⁽²⁷⁾ mencionam que a manutenção do equilíbrio do tecido conjuntivo proporciona a capacidade de alongamento das fibras e força de tração, e, conseqüentemente, melhor capacidade funcional.

Guo et al.,⁽²⁸⁾ observou que a estimulação elétrica proporcionou a manutenção do *pool* de células satélites por meio da regularização da sua proliferação e da apoptose durante o período da atrofia induzida por desuso, além de atenuar a perda de mionúcleos por fibra, área de secção transversal e massa muscular. Em nossa pesquisa, a análise histológica revelou que a estimulação elétrica atenuou também as modificações morfológicas decorrentes do fenômeno da desnervação.

Entretanto, os estudos realizados com estimulação elétrica ainda são controversos, como em casos em que ela retardou a regeneração neuromuscular.⁽²⁹⁾ Cavalcante et al.,⁽³⁰⁾ observaram que, quando aplicado um protocolo adequado, a estimulação elétrica pode retardar ou impedir a atrofia muscular. Tal fato corrobora o encontrado em nossa pesquisa, pois a estimulação elétrica impediu a atrofia muscular do GEDT quando comparado ao GED.

Diversas metodologias experimentais são utilizadas para a estimulação elétrica. As mais utilizadas são os eletrodos implantados e os cutâneos com gel de acoplamento. Aqui, foram usados os eletrodos cutâneos, devido ao custo reduzido e a não necessidade de outro procedimento cirúrgico, além da desnervação.⁽³⁰⁾ Também se optou pelo uso do eletrodo cutâneo, na tentativa de trazer o estudo mais próximo da prática clínica, pois se trata de um dos mais utilizados e eficientes.⁽³¹⁾ O protocolo de aplicação é de extrema relevância para o desenvolvimento e para que os resultados do experimento sejam fidedignos. O protocolo do presente estudo mostrou-se benéfico considerando a prática clínica, pois impediu a atrofia muscular por 45 dias, o que assegura um tempo maior, até que o músculo seja reinervado. O uso dos parâmetros foi baseada na literatura e em suas

aplicações clínicas. Foi escolhida a corrente russa por ser uma das mais utilizadas e por seus efeitos positivos na musculatura esquelética.⁽³²⁾

Neste sentido, a área de secção transversal foi estudada como um importante parâmetro para a avaliação da musculatura esquelética, pois está vinculada fortemente ao poder de contração da fibra muscular.

Cavalcante et al.,⁽³⁰⁾ concluem que deve se considerar a área de secção transversal como parâmetro para a avaliação do trofismo muscular. Em nosso estudo, utilizamos a área de secção transversal como parâmetro e verificamos que a estimulação elétrica com o protocolo utilizado foi capaz de impedir a atrofia do músculo tibial cranial quando comparamos o GEDT com o GCI, mostrando que a estimulação elétrica conseguiu manter o músculo em seu estado inicial quando sofreu a lesão. Deste modo, a estimulação elétrica foi capaz de impedir a atrofia subsequente, mas, quando comparamos o GEDT com o GCF, a estimulação elétrica não proporcionou o desenvolvimento natural do músculo. Uma explicação para tal fato pode ser de que a estimulação elétrica não possibilita o estímulo hipertrófico que o GEDT precisaria para chegar a resultados semelhantes ao GCF. Resultados similares foram encontrados por Caierão et al.,⁽¹³⁾ que relatam que talvez a estimulação elétrica não tenha um papel de estímulo hipertrófico, ou que a estimulação elétrica não tenha sido efetiva para a atenuação da queda da área de secção transversal do músculo, pois os grupos tratados com estimulação elétrica permaneceram semelhantes ao desnervado.

Outra justificativa pode ser o longo período de experimento. Polônio et al.,⁽²³⁾ analisando o efeito da estimulação elétrica no músculo tibial cranial desnervado em vários períodos, prorrogaram as alterações morfológicas características da desnervação por até 28 dias, mostrando que a eficácia da estimulação elétrica parece decair ao prolongamento do período de desnervação.

Em estudos futuros, seria interessante realizar testes quantitativos, utilizando proteínas estruturais do músculo, e estudando a constituição e os tipos de colágeno dos envoltórios musculares, além de associar a vários períodos pós-cirúrgicos. Assim, seria possível verificar as mudanças que a estimulação elétrica possivelmente modula em nível molecular, mapeando seus níveis de expressão em períodos variados e adaptando o protocolo de estimulação elétrica no músculo desnervado.

CONCLUSÃO

A eletroestimulação por corrente russa não proporcionou o desenvolvimento do músculo de forma se-

melhante ao que ocorreria em um músculo sadio, mas mostrou-se capaz de impedir a atrofia decorrente da desnervação, e atenuar as alterações morfológicas e estruturais que sucederiam um músculo desnervado não tratado.

REFERÊNCIAS

1. Isaacs J. Major peripheral nerve injuries. *Hand Clin.* 2013;29(3):371-82. Review.
2. Tos P, Ronchi G, Geuna S, Battiston B. Future perspectives in nerve repair and regeneration. *Int Rev Neurobiol.* 2013;109:165-92. Review.
3. Bekelis K, Missios S, Spinner R. Restraints and peripheral nerve injuries in adult victims of motor vehicle crashes. *J Neurotrauma.* 2014;31(12):1077-82.
4. Griffin MF, Malahias M, Hindocha S, Wasim SK. Peripheral nerve injury: principles for repair and regeneration. *Open Orthop J.* 2014;27(8):199-203.
5. Carlson BM. The biology of long-term denervated muscle. *Eur J Trans Myol.* 2014;24(1):5-11.
6. Ozawa J, Kurose T, Kawamata S, Kaneguchi A, Moriyama H, Kito N. Regulation of connective tissue remodeling in the early phase of denervation in a rat skeletal muscle. *Biomed Res.* 2013;34(5):251-8.
7. Mitchell AS, Smith IC, Gamu D, Donath S, Tupling AR, Quadrilatero J. Functional, morphological, and apoptotic alterations in skeletal muscle of ARC deficient mice. *Apoptosis.* 2015;20(3):310-26.
8. Schiaffino S, Dyar KA, Ciciliot S, Blaauw B, Sandri M. Mechanisms regulating skeletal muscle growth and atrophy. *FEBS J.* 2013;280(17):4294-314. Review.
9. Moimas S, Novati F, Ronchi G, Zacchigna S, Fregnan F, Zentilin L, et al. Effect of vascular endothelial growth factor gene therapy on post-traumatic peripheral nerve regeneration and denervation-related muscle atrophy. *Gene Ther.* 2013;20(10):1014-21.
10. Willand MP, Chiang CD, Zhang JJ, Kemp SW, Borschel GH, Gordon T. Daily electrical muscle stimulation enhances functional recovery following nerve transection and repair in rats. *Neurorehabil Neural Repair.* 2015;29(7):690-700.
11. Avramidis K, Karachalios T, Popotonasios K, Sacorafas D, Papathanasiades AA, Malizos KN. Does electric stimulation of the vastus medialis muscle influence rehabilitation after total knee replacement? *Orthopedics.* 2011;34(3):175.
12. Liu Y, Grumbles RM, Thomas CK. Electrical stimulation of embryonic neurons for 1 hour improves axon regeneration and the number of reinnervated muscles that function. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2013;72(7):697-707.
13. Caierão QM, Betini J, Teodori RM, Minamoto VB. O efeito do intervalo da estimulação elétrica no músculo desnervado de rato. *Rev Bras Fisioter.* 2008;12(2):143-8.
14. Matheus JP, Gomide LB, Oliveira JG, Volpon JB, Shimano AC. Efeitos da estimulação elétrica neuromuscular durante a imobilização nas propriedades mecânicas do músculo esquelético. *Rev Bras Med Esporte.* 2007;13(1):47e-50e.
15. Gigo-Benato D, Russo TL, Geuna S, Domingues NR, Salvini TF, Parizotto NA. Electrical stimulation impairs early functional recovery and accentuates skeletal muscle atrophy after sciatic nerve crush injury in rats. *Muscle Nerve.* 2010;41(5):685-93.
16. Maciel FO, Viterbo F, Chinaque Lde F, Souza BM. Effect of electrical stimulation of the cranial tibial muscle after end-to-side neurotomy of the peroneal nerve in rats. *Acta Cir Bras.* 2013;28(1):39-47.
17. Rosa Junior GM, Bueno CR, Heubel A, Bortoluci CH, Simionato LH, Daré LR, et al. Efeito da corrente alternada simétrica sinusoidal na musculatura estriada esquelética desnervada experimentalmente. *Salusvita.* 2013;33(3):211-25.
18. Pullen AH. The distribution and relative sized of fibre types in the extensor digitorum longus and soleus muscles of the adult rat. *J Anat.* 1977;123(Pt 2):467-86.
19. Daré LR, Dias DV, Rosa Junior GM, Bueno CR, Buchaim RL, Rodrigues Ade C, et al. Effect of β -hydroxy- β -methylbutyrate in masticatory muscles of rats. *J Anat.* 2015;226(1):40-6.
20. Sunderland S. Nerves and nerve injuries. *J Anat.* 1969;105(1):179-81.
21. Câmara CN, Brito MV, Silveira EL, Silva DS, Simões VR, Pontes RW. Histological analysis of low-intensity laser therapy effects in peripheral nerve regeneration in Wistar rats. *Acta Cir Bras.* 2011;26(1):12-8.
22. Monte-Raso VV, Barbieri CH, Mazzer N, Fazan VP. Os efeitos do ultra-som terapêutico nas lesões por esmagamento do nervo ciático de ratos: análise funcional da marcha. *Rev Bras Fisioter.* 2006;10(1):113-9.
23. Polônio JT, Mazzer N, Barbieri CH, Mattiello-Sverzut AC. Eletroestimulação seletiva mantém estrutura e função do tibial anterior desnervado de ratos. *Acta Ortop Bras.* 2010;18(2):85-9.
24. Schmalbruch H, Lewis DM. Dynamics of nuclei of muscle fibers and connective tissue cells in normal and denervated rat muscles. *Muscle Nerve.* 2000;23(4):617-26.
25. Viguie CA, Lu DX, Huang SK, Rengen H, Carlson BM. Quantitative study of the effects of long-term denervation on the extensor digitorum longus muscle of the rat. *Anat Rec.* 1997;248(3):346-54.
26. Wu P, Chawla A, Spinner RJ, Yu C, Yaszemski MJ, Windebank AJ, et al. Key changes in denervated muscles and their impact on regeneration and reinnervation. *Neural Regen Res.* 2014; 9(20):1796-809. Review.
27. 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.
28. Guo BS, Cheung KK, Yeung SS, Zhang BT, Yeung EW. Electrical stimulation influences satellite cell proliferation and apoptosis in unloading-induced muscle atrophy in mice. *PLoS One.* 2012;7(1):e30348.
29. Salvini TF, Durigan JL, Peviani SM, Russo TL. Efeitos da eletroestimulação e do alongamento muscular sobre a adaptação do músculo desnervado – implicações para a fisioterapia. *Rev Bras Fisioter.* 2012;16(3):175-83. Review.
30. Cavalcante EV, da Silva LG, Montenegro EJ, Pontes NT. Efeito da eletroestimulação no músculo desnervado de animais: revisão sistemática. *Fisioter Mov.* 2012;25(3):669-78.
31. Nolan MF. Conductive differences in electrodes used with transcutaneous electrical nerve stimulation devices. *Phys Ther.* 1991;71(10):746-51.
32. Lima EP, Rodrigues GB. A estimulação russa no fortalecimento da musculatura abdominal. *Arq Bras Cir Dig.* 2012;25(2):125-8. Review.