

HUGO ALVES DE SOUSA

**EFEITOS DA ELETROELETROESTIMULAÇÃO NA MORFOMETRIA TECIDUAL
DA PELVE E PERÍNEO DE RATAS WISTAR**

Brasília, Distrito Federal

2017

Hugo Alves de Sousa

**EFEITOS DA ELETROELETROESTIMULAÇÃO NA MORFOMETRIA TECIDUAL
DA PELVE E PERÍNEO DE RATAS WISTAR**

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa Pós-Graduação em Ciências
Médicas da Universidade de Brasília,
como requisito para obtenção do título
de Doutor em Ciências Médicas.

Orientador: Profa. Dra. Selma Aparecida Souza Kuchelhaus

Co-orientador: Prof. Dr. José Roberto Pimenta de Godoy

Brasília, Distrito Federal

2017

Ae Alves de Sousa, Hugo
 EFEITOS DA ELETROELETROESTIMULAÇÃO NA MORFOMETRIA
 TECIDUAL DE PELVE E PERÍNEO DE RATAS WISTAR / Hugo
 Alves de Sousa; orientador Selma Aparecida Souza
 Kuchelhaus; co-orientador Jose Roberto Pimenta de
 Godoy. -- Brasília, 2017.
 121 p.

 Tese (Doutorado - Doutorado em Ciências Médicas)
 - Universidade de Brasília, 2017.

 1. Eletroestimulação. 2. Manometria intra-anal. 3.
 Força muscular. 4. Morfometria. 5. Órgãos pélvicos. I.
 Aparecida Souza Kuchelhaus, Selma, orient. II.
 Pimenta de Godoy, Jose Roberto, co-orient. III.
 Título.

TERMO DE APROVAÇÃO

Hugo Alves de Sousa

**EFEITOS DA ELETROELETROESTIMULAÇÃO NA MORFOMETRIA TECIDUAL
DA PELVE E PERÍNEO RATAS WISTAR**

Tese aprovada em 08 de junho de 2017 como requisito para a obtenção do grau de doutor no Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, pela seguinte banca examinadora:

Orientadora: Profa. Dra. Selma Aparecida de Souza Kückelhaus

Universidade de Brasília
Presidente da banca

Dr. José Carlos de Almeida

Secretaria de Saúde do Distrito Federal
Membro efetivo

Prof. Dr. Carlos Nogueira Aucélio

Universidade de Brasília
Membro efetivo

Profa. Dra. Verônica Moreira Amado

Universidade de Brasília
Membro efetivo

Prof. Dr. Carlos dos Santos Kuckelhaus

Secretaria de Saúde do Distrito Federal
Membro suplente

Brasília, 08 de junho de 2017

Este trabalho é dedicado a Deus, que me agraciou com a vida; a minha família, que sempre me apoia e incentiva; aos fisioterapeutas uroginecológicos, que almejam a cada dia proporcionar uma condição de vida funcional melhor aos seus pacientes.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela inspiração, paz, alegria, bondade, fidelidade, direção, fé e amor demonstrado a cada dia.

À minha esposa, Aline Marcato Terr de Sousa, pelo seu sorriso, pelo incentivo constante, pelo cuidado diário, pela compreensão nas ausências, pela alegria de um lar edificado em Deus e pelo exemplo de estar buscando sempre melhorar em tudo.

Ao meu filho, Bernardo Terr de Sousa, que chegou no início de 2015 e transformou a minha vida e da minha esposa para melhor.

Ao meu pai, Manoel Francisco de Sousa, pelas muitas oportunidades ofertadas, pela amizade, pelo incentivo, pelos conselhos, pelo amor e carinho sempre expressados.

À minha mãe, Noemi Alves da Costa de Sousa, pela paciência, pela perseverança, pela manutenção de um lar equilibrado, pela educação Cristã, pelos muitos conselhos, pelo carinho e pelo bom hábito de estudar.

Ao meu irmão Rui Alves, pela cooperação técnica em engenharia biomédica, que tornou possível a produção do manômetro intranal e adaptação da sonda de eletroestimulação para o eletroestimulador Dualpex® 961.

À minha família - meus pais, meus irmãos, Rui Alves, Bruno Alves, Daniel Reis e Felipe Reis, minhas cunhadas, Cleide Néia, Cristinane, Gerline e Andrea, meus tios e tias, Charles e Nádia Louzada, João e Marcilei Costa, Nildo e Zenilde Costa, meu sogro, Wandir Terr "Bigode" - pelo apoio, pela paciência, pelo encorajamento, pelos ensinamentos, pela alegria e, acima de tudo, pelo contínuo exemplo de vida.

À minha orientadora, professora Dra. Selma Aparecida Souza Kuchelhaus, pela devoção, pela paciência, pela visão empreendedora e pela maestria dos ensinamentos que levarei comigo por toda a vida.

Ao meu co-orientador, professor Dr. José Roberto Pimenta de Godoy, que me encorajou desde a graduação, passando pelo mestrado e, por fim, no doutorado, a aproveitar as oportunidades com muito trabalho e empenho.

A cada um dos servidores e professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da FM-UnB, em especial ao Alessandro, que muito me ajudou durante esta jornada.

A cada um dos servidores, alunos, professores, coordenadores e diretores do Centro Universitário de Brasília - UniCEUB, por todo carinho e apoio prestado por anos, em especial às alunas Keyla de Paula, Úrsula Limongi, Marília Soares, Laura Kruchak, Luisa Kruchak, Nataly Moriya e Gabriela Corassa; aos servidores Everton da Sila, Josete, Nilo e Marcos da Conceição, às professoras MsC. Monique Azevedo e Dra. Mara Cláudia Ribeiro; às coordenadoras professoras MsC. Renata Rebouças, MsC. Valéria Sovat, Dra. Fernanda Vinhais e MsC. Magda Verçosa.

À professora Dra. Yolanda Galindo Pacheco pela colaboração com seus ensinamentos e com sua experiência em dissecação de peças anatômicas.

À professora Dra. Leonora Maciel pela colaboração com seus ensinamentos e com sua experiência em análise histopatológica.

Aos amigos professores da área de morfologia da Faculdade de Medicina MsC. Fábio da Costa Sales, Dra. Jussara Rocha, Dr. José Roberto Leite e MsC. Ana Lúcia Carneiro pelo apoio e companheirismo.

À Maria da Glória Silva pela dedicação, pela colaboração, e pelos valiosos ensinamentos em técnicas histológicas.

Aos servidores técnicos da área de morfologia Abel, Abimael, MsC. Arlysson, Daniel e Natalino pelo apoio e disponibilidade.

Aos amigos Fábio e Raquel Gomes, Alexandre e Eneida Berbet, Gerson e Regina Berbet, Robson e Elevin Berbet, Junior e Haline Berbet, Wendel e Thais Luna, Eduardo e Ester Oliveira, Carlos e Claudiane Sato, Carlos e Eulise Brandão,

João Alberto e Telma Mendes, Patrícia Liberato, Guilherme Castro e Andrew Rodrigues pelo companheirismo e amizade demonstrados.

A todos que de alguma forma me ajudaram no desenvolvimento deste trabalho.

Prefácio

Em 2009, admiți na minha clínica de fisioterapia, uma paciente encaminhada por um urologista, com queixas de perda de urina aos esforços e flatos vaginais durante o coito. Após a anamnese e exame físico, constatei por meio dos marcadores cinéticos-funcionais, que a paciente tinha fraqueza do músculo esfíncter anal externo e dos diafragmas pélvico e urogenital, apresentando grau 3 na escala de Ortiz. A paciente também apresentava a incapacidade de contrair os músculos voluntários da pelve e períneo ao comando verbal, além de aparentar certa lassidão vaginal à palpação.

Após analisar os achados cinéticos-funcionais aferidos, resolvi instituir a conduta fisioterapêutica em três vertentes. A primeira consistia em conscientização corporal, por meio de técnicas de imagem corporal e, explicação da estrutura e função da pelve e períneo. A segunda compreendia em utilizar recursos eletroterápicos, visto que a corrente elétrica pode estimular os nervos da região tanto no nível sensitivo, promovendo uma experiência sensitiva nos locais estimulados, como no nível motor, com recrutamento de fibras musculares e contração passiva dos grupos musculares. A terceira consistia em prescrever exercícios de resistência e força para os músculos voluntário da pelve e períneo. Decorrido três meses de atendimento reavaliei a paciente e notei mudança na força, no recrutamento voluntário do grupo muscular e na resistência do tecido vaginal. Esse último achado foi percebido pelo aumento da resistência a sonda de eletroestimulação intravaginal durante o atendimento eletroterapêutico, o que me inspirou a pesquisar o efeito da eletroestimulação nos tecidos associados à pelve e períneo. Pelo que a busca revelou escassos estudos sobre o tema, especialmente sobre o efeito da eletroestimulação no parênquima e estroma da vagina e reto-ânus, vias de administração intracavitária de eletroestimulação neuromuscular.

Depois de conversar com muitos colegas a respeito das minhas dúvidas, encontrei a Profa. Selma, que sugeriu que organizasse as informações coletadas na revisão de literatura e reparasse qual o melhor modelo animal para investigar os efeitos da eletroestimulação nos tecidos da pelve e períneo. Passados três anos,

consegui levantar os meios para viabilizar o estudo e, finalmente, entrei como aluno no programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas. Hoje, depois de oito anos de trabalho árduo e de receber dezenas de colaborações de colegas e alunos de diferentes áreas de conhecimento, dou fim ao processo de doutoramento com a certeza de que contribui para o preenchimento de algumas lacunas no conhecimento a respeito do efeito da corrente elétrica nos tecidos da pelve e períneo. De modo geral, nossos achados demonstraram que a eletroestimulação induz modificações no parênquima e estroma das estruturas da região pélvica positivamente, aumentando a espessura da parede dos órgãos pélvicos e hipertrofiando os músculos voluntários relacionados com a continência e sexualidade.

Por fim, o presente trabalho inaugurou uma linha de pesquisa em morfofisiologia aplicada à pelve e períneo na Área de Morfologia da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília. O grupo tem como objetivo investigar questões relativas aos efeitos dos recursos eletrotermofototerápicos nos tecidos da pelve e períneo, bem como as implicações que o envelhecimento, a paridade, as práticas desportivas e entre outros fenômenos modificam a estrutura e função dos órgãos dessa região anatômica. Diante do que foi exposto, entendo que a pesquisa possibilitou o desenvolvimento de novas tecnologias para o estudo das repercussões dos agentes eletroterapêuticos nos órgãos da pelve e períneo, além de devolver a sociedade, em especial, aos pacientes que padecem de afecções nessas regiões, a expectativa de promoção de novas metodologias e aprimoramento de outras, para o enfretamento das disfunções pélvicas e perineais.

"Não é a quantidade de dados que formam o pensador, mas a capacidade que os reorganiza".

Augusto Cury

"E não nos cansemos de fazer o bem, pois no tempo próprio colheremos, se não desanimamos".

Gálatas 6:9

"Tudo tem o seu tempo determinado, e há tempo para todo o propósito debaixo do céu".

Eclesiastes 3:1

"E tudo quanto fizerdes, fazei-o de todo o coração, como ao Senhor".

Colossenses 3:23

RESUMO

A eletroestimulação (EE) é amplamente utilizada em diversas afecções dos sistemas orgânicos, sobretudo na hipotonia, incontínências e desnervações. Os tecidos da pelve e períneo podem apresentar disfunções em função do envelhecimento e mecanismo de parto, se manifestando nas incontínências urinária e fecal, além de prolapsos de órgãos pélvicos. Nesses casos, a EE promove melhoria funcional, no entanto, seus efeitos nos tecidos são desconhecidos. O modelo murino tem sido proposto para elucidar os aspectos fisiológicos e morfológicos da continência e como a EE melhora função dos órgãos pélvicos e perineais. Considerando que é fundamental elucidar os efeitos e os mecanismos da EE, nosso objetivo foi avaliar o efeito da eletroestimulação intravaginal e intra-anal nos tecidos associados aos órgãos da pelve e períneo de ratas Wistar. Assim, foi conduzido com cinco animais/grupo. No estudo pareado avaliou-se a pressão intra-anal em repouso e EE intravaginal, enquanto que no estudo não pareado, formado por três grupos (Controle, EE intravaginal e EE intra-anal), determinou-se o efeito de 30 sessões de EE durante três semanas consecutivas (frequência = 50 Hz; largura de pulso = 700 μ s; intensidade = 2 a 4 mA). Depois, os animais foram eutanaziados e os segmentos pélvicos foram dissecados e processados segundo protocolo padrão para microscopia óptica. Os resultados mostraram que: **1)** a sonda apresentou as dimensões adequadas para as ratas, sendo capaz de induzir a EE efetiva dos tecidos da pelve e períneo; **2)** o manômetro permitiu o registro adequado dos dados pressóricos; **3)** a pressão intra-anal aumentou com a passagem da corrente elétrica, indicando a contração muscular; **4)** Ambas as vias de EE (intravaginal ou intra-anal) aumentaram as larguras das camadas mucosa, submucosa e muscular da uretra, vagina, reto e ânus, no entanto, a via intravaginal reduziu a largura da mucosa da vagina; **5)** ambas as vias aumentaram o diâmetro das fibras esqueléticas e reduziram o número delas nos músculos do assoalho pélvico (MAPs) e do esfíncter anal externo (EAE), aumentaram o número de mionúcleos das fibras esqueléticas dos MAPs, aumentaram o total de fibras musculares lisas nos músculos da uretra, vagina, reto e do esfíncter anal interno, além de causar aumento na largura da fáscia endopélvica parietal e visceral; **6)** a EE intravaginal aumentou a largura da mucosa e submucosa, bem como o total de fibras musculares lisas e o diâmetro das fibras estriadas do esfíncter uretral externo na comparação com a via intra-anal; **7)** a via intra-anal foi mais efetiva do que a intravaginal para aumentar a largura da mucosa e o total de fibras musculares da vagina; **8)** não houve diferenças entre as vias de EE, intravaginal e intra-anal, nos tecidos do reto. Em conjunto, os resultados demonstraram a eficácia da sonda de EE na transmissão do sinal elétrico para estimular as fibras musculares e ativar as células satélites quiescentes, resultando em hipertrofia celular, além de ativar fibroblastos resultando na maior largura da fáscia endopélvica. Assim, nossos resultados apontam para a efetividade da EE no ganho funcional mediado pela melhora estrutural dos tecidos dos órgãos pélvicos.

Palavras-chaves: Eletroestimulação; manometria intra-anal; força muscular; morfometria; órgãos pélvicos; músculos do assoalho pélvico.

ABSTRACT

Electrical stimulation (EE) is widely used in several disorders of organic systems, especially in clinical hypotonia, incontinence and denervation. Pelvic and perineal tissues may present dysfunctions due to aging and mechanism of delivery, manifesting in urinary and fecal incontinence, as well as pelvic organ prolapses. In these cases, EE promotes functional improvement; however, its effects on tissues are unknown. The murine model has been proposed to elucidate the physiology and the morphological aspects of the continence and how EE improves the function of the pelvic and perineal organs. Considering that, it is fundamental to elucidate the effects and mechanisms of the EE, our objective was to produce a probe to EE and a manometer, both adapted to the vaginal and anorectal dimensions of nulliparous Wistar rats, as well as to evaluate the effects of EE on the tissues of the pelvis and perineum. Thus, the study was performed with groups of five animals/group. In the paired study was evaluate the intra-anal pressure, in the resting and in the intravaginal EE, while, the unpaired study consisting of three groups (Control, intravaginal EE and intra-anal EE) it was determined the effect of 30 EE sessions, during three consecutive weeks (frequency = 50 Hz; pulse width = 700 μ s; intensity = 2 to 4 mA. Afterwards, the animals were euthanized and the pelvic segments were dissected and processed according to standard protocol for optical microscopy. The results showed that: 1) the probe presented adequate dimensions for the rats, being able to induce the effective EE of the pelvic and perineal tissues; 2) the manometer allowed adequate recording of pressure data; 3) intra-anal pressure increased with the electric current indicating muscle contraction; 4) Both EE routes (intravaginal or intra-anal) increased the widths of the mucosa, submucosa and muscular layers of the urethra, vagina, rectum and anus; however, the intravaginal route reduced the width of the mucosa of the vagina; 5) both routes increased the diameter of the skeletal fibers and reduced their number in the pelvic floor muscles (MAPS) and in the external anal sphincter (EAE), increased the number of myonuclei of the skeletal fibers of the MAPs, increased the number of smooth fibers in the urethral, vagina, rectum and in the internal anal sphincter, increased the width of the parietal and visceral endopelvic fascia; 6) intravaginal EE increased the width of mucosal and submucosal, as well, the number of smooth muscle and the diameter of the striated fibers of the external urethral sphincter, when compared to the intra-anal route; 7) the intra-anal route was more effective than the intravaginal route to increase the width of the mucosa and the total muscle fibers of the vagina; 8) there were no differences between intravaginal and intra-anal EE routes in the rectum tissues. Our results have demonstrated the efficacy of the EE probe in transmitting the electrical signal to stimulate the muscle fibers and to activate the quiescent satellite cells, resulting in cellular hypertrophy, in addition to activating fibroblasts resulting in the widest width of the endopelvic fascia. Thus, our results point to the effectiveness of EE in the functional gain mediated by the structural improvement of the tissues of the pelvic organs.

Keywords: Electrostimulation; Intra-anal manometry; Muscle strength; Morphometry; Pelvic organs; Muscles of the pelvic floor.

SUMÁRIO

Prefácio	VII
Resumo	X
Abstract	XI
Lista de figuras	XV
Lista de tabelas	XVII
Lista de siglas	XVIII
1. Introdução	1
1.1. Músculos do assoalho pélvico e períneo	2
1.2. Principais afecções musculares da pelve e períneo	4
1.3. Adaptações morfológicas promovidas na pelve e períneo pela paridade	5
1.4. Eletroestimulação muscular aplicada a pelve e períneo	6
2. Objetivos	8
2.1. Objetivo geral	9
2.2. Objetivos específicos	9
3. Material e métodos	10
3.1. Delineamento experimental	11
3.2. Tipo de estudo	12
3.3. Animais	12
3.4. Grupos de estudo	12
3.5. Obtenção e padronização da sonda do eletroestimulador e do manômetro	13
3.6. Determinação da força de contração muscular	14
3.7. Avaliação da efetividade da eletroestimulação	15
3.8. Obtenção do bloco pélvico	16

3.9.	Processamento histológico	16
3.10.	Avaliação morfológica dos tecidos pélvicos	17
3.11.	Análise histopatológica	18
3.12.	Análise estatística	18
4.	Resultados	19
4.1.	Construção, adaptação e calibração da sonda de eletroestimulação e do manômetro	20
4.2.	Avaliação da efetividade da sonda de eletroestimulação neuromuscular nos tecidos da pelve e períneo	25
4.2.1.	Determinação do efeito da eletroestimulação na força de contração dos músculos do assoalho pélvico	25
4.2.2.	Determinação do efeito da eletroestimulação nos músculos do assoalho pélvico	27
4.2.3.	Determinação do efeito da eletroestimulação na fáscia endopélvica parietal e visceral	31
4.2.4.	Determinação da largura das camadas teciduais associadas à uretra, vagina e reto	34
4.2.5.	Avaliação das células migratórias nos tecidos associados aos órgãos da pelve e períneo	48
4.3.	Sumário dos resultados	50
5.	Discussão	52
5.1.	Considerações sobre o desenvolvimento da sonda adaptada ao eletroestimulador dualpex® 961 e do manômetro anal	53
5.2.	Considerações sobre as adaptações da sonda do eletroestimulador e sobre a aplicação da eletroterapia	55
5.3.	Considerações sobre manometria e a força dos músculos do assoalho pélvico	57
5.4.	Aspectos translacionais do efeito da eletroestimulação sobre a força dos músculos do assoalho pélvico	58
5.5.	Considerações sobre o efeito da eletroestimulação nos tecidos da pelve e períneo	59
6.	Conclusão	74

7.	Perspectivas e limitações	77
8.	Referências bibliográficas	81
9.	Anexos	98

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Organograma do estudo	11
Figura 2.	Projeto da sonda de eletroestimulação anal e vaginal para ratas Wistar	13
Figura 3.	Componentes do manômetro anal e suas conexões	14
Figura 4.	Desenho esquemático do tratamento com a eletroestimulação e o registro da força muscular no momento basal	15
Figura 5.	Fotografia da sonda de eletroestimulação produzida e adaptada às dimensões do canal anal e vaginal de ratas Wistar	20
Figura 6.	Fotografias do ensaio para avaliar a efetividade da sonda de eletroestimulação	21
Figura 7.	Registro do ruído e da amplitude do sinal elétrico captados pelas sondas	22
Figura 8.	Comparação da amplitude do sinal das sondas do eletroestimulador comercial e adaptada	23
Figura 9.	Fotografia do monômetro produzido	24
Figura 10.	Sequência de imagens demonstrando a insuflação da sonda de Foley	24
Figura 11.	Curva de calibração do protótipo da sonda e do manômetro anal de ratas Wistar	25
Figura 12.	Força de contração/manometria dos músculos do assoalho pélvico	27
Figura 13.	Dados morfométricos dos músculos do assoalho pélvico	29
Figura 14.	Fotomicrografias das fibras musculares esqueléticas dos músculos do assoalho pélvico	30
Figura 15.	Dados morfométricos da fáschia endopélvica	31
Figura 16.	Fotomicrografias da pelve de ratas Wistar	32
Figura 17.	Dados morfométricos dos tecidos associados à uretra	34

Figura 18.	Fotomicrografias da uretra de ratas dos grupos controle e eletroestimuladas pelas vias intravaginal e intra-anal	35
Figura 19.	Dados morfométricos dos tecidos associados à vagina	37
Figura 20.	Fotomicrografias da vagina de ratas dos grupos controle e eletroestimuladas pelas vias intravaginal e intra-anal	38
Figura 21.	Dados morfométricos dos tecidos associados ao reto	40
Figura 22.	Fotomicrografias do reto de ratas de ratas dos grupos controle e eletroestimuladas pelas vias intravaginal e intra-anal	41
Figura 23.	Dados morfométricos dos tecidos associados ao ânus	44
Figura 24.	Fotomicrografias do ânus de ratas dos grupos controle e eletroestimuladas pelas vias intravaginal e intra-anal	45
Figura 25.	Fotomicrografias do esfíncter anal externo de ratas dos grupos controle e eletroestimuladas pelas vias intravaginal e intra-anal	46
Figura 26.	Fotomicrografias de secções histológicas da uretra e da vagina de ratas dos grupos controle e eletroestimuladas	48
Figura 27.	Fotomicrografias de secções histológicas do reto e do ânus	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Força de contração muscular/manometria dos músculos do assoalho pélvico	26
Tabela 2.	Largura das camadas musculares e total de fibras dos músculos associados ao assoalho pélvico	28
Tabela 3.	Largura das porções parietal e visceral da fáscia endopélvica	31
Tabela 4.	Largura das camadas teciduais da uretra, total de fibras musculares lisas e largura do esfíncter uretral externo	33
Tabela 5.	Largura das camadas teciduais da vagina e total de fibras musculares lisas	36
Tabela 6.	Largura das camadas teciduais do reto e total de fibras musculares lisas	39
Tabela 7.	Largura das camadas teciduais do ânus	43
Tabela 8.	Parâmetros morfológicos avaliados dos animais eletroestimulados por via intravaginal	50
Tabela 9.	Parâmetros morfológicos avaliados dos animais eletroestimulados por via intra-anal	50

LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

- C** – Controle de Nulíparas
- COBEA** – Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
- EAE** – Esfíncter anal externo
- EAI** – Esfíncter anal interno
- EE** – Eletroestimulação
- EEIA** – Eletroestimulação pela via intra-anal
- EEIV** – Eletroestimulação pela via intravaginal
- EUE** – Esfíncter uretral externo
- EENM** – Eletroestimulação neuromuscular
- IA** – Incontinência anal
- IU** – Incontinência urinária
- IUE** – Incontinência urinária de esforço
- IUM** – Incontinência urinária mista
- IUU** – Incontinência urinária de urgência
- LABOCIEN** – Laboratório de Ciências
- MAPs** – Músculos do assoalho pélvico
- N** – Nulíparas
- POP** – Prolapso de órgão pélvico
- SNC** – Sistema Nervoso Central
- µs** – Microssegundos
- Hz** – Frequência em Hertz
- mA** – Miliampere
- On** – Ligado
- Off** – Desligado

1. INTRODUÇÃO

A eletroestimulação (EE) é amplamente utilizada em diversas afecções dos sistemas orgânicos, sobretudo no aparelho locomotor (Gobbo et al. 2014). Sua indicação geralmente envolve quadros clínicos como hipotonia ou hipertonia muscular, hipotrofia, paresia, plegia, dor aguda e crônica, restrições na amplitude de movimento, cicatrização de feridas, incontinências, desnervações, edema, entre outros (Maffiuletti 2010). Esses quadros podem estar presentes em uma determinada afecção de forma única ou composta. Assim, observa-se que a EE pode ser aplicada em diferentes condições clínicas, em diversas regiões do corpo, mostrando-se como um recurso terapêutico polivalente.

As estruturas presentes nas regiões da pelve e períneo podem se beneficiar com a EE (Zhang et al. 2010). A prescrição desse método na região da pelve e períneo destina-se a promover a conscientização sensorial e motora dos músculos do assoalho pélvico, o fortalecimento e a dessensibilização, quando em condições hipertônicas, mas conforme estudos recentes, a EE na região da pelve e períneo tem sido utilizada no tratamento conservador para incontinência urinária e fecal (Wright 2014; Abrams et al. 2009). Apesar de a EE ser amplamente utilizada no tratamento das afecções que acometem a pelve e períneo, seus efeitos sobre o parênquima muscular (liso e esquelético) e sobre o estroma dessa região ainda não foram esclarecidos.

1.1. MÚSCULOS DO ASSOALHO PÉLVICO E PERÍNEO

O assoalho ou diafragma pélvico é constituído pelos músculos levantador do ânus, coccígeo e pela fáscia endopélvica que cobre as faces superior e inferior desses músculos; esse assoalho/diafragma se estende entre o púbis anteriormente e o cóccix posteriormente, de uma parede da pelve a outra e tem no levantador do ânus o seu principal músculo. Anatomicamente, esse diafragma apresenta-se como uma lâmina muscular larga cujas partes são designadas de acordo com a direção e a fixação de suas fibras (Elbadawi 1996; Haibe 2000). Os componentes passivos dos músculos do assoalho pélvico (MAPs), feixes vasculonervosos e tendões, formam a fáscia endopélvica que, macroscopicamente, é formada por ligamentos que atuam na fixação e na estabilização dos órgãos relacionados

(uretra, bexiga, vagina, útero e reto) e, microscopicamente, é constituída predominantemente por fibras de colágeno e elastina. Dada a sua constituição, a fáscia endopélvica, possui a propriedade de resistir, juntamente com os feixes musculares, à força tênsil gerada pelo aumento da pressão intra-abdominal a cada ciclo respiratório ou subitamente durante a tosse, espirro e manobras de Valsalva (Elbadawi 1996).

Fisiologicamente, os MAPs são fundamentais para a manutenção dos mecanismos de continência urinária e fecal, para a sustentação dos órgãos pélvicos e para a sexualidade humana (Strohbehn 1998). Os MAPs exercem suas funções de forma sinérgica com os músculos perineais do diafragma urogenital que constitui o trígono urogenital, que são os músculos esfíncter uretral externo, transverso profundo, transverso superficial do períneo, bulboesponjoso e ísquiocavernoso (Moore & Dalley 2011). É importante ressaltar que durante os aumentos abruptos da pressão intra-abdominal, ou perante necessidades urgentes de evacuar e expelir flatos, o esfíncter anal externo (EAE) exerce ação principal na garantia da continência anal. Logo, sua função é predominantemente fásica, ou seja, de contração rápida e de alta pressão, enquanto o esfíncter anal interno (EAI) possui função tônica, caracterizando-se por contração lenta e de baixa pressão (Rao 2004).

Embora não faça parte dos músculos que compõem o assoalho pélvico, o esfíncter anal interno (EAI), que é constituído por fibras musculares lisas relacionadas ao canal anal, atua sinergicamente como coadjuvante na função da continência anal e pode ser afetado pela eletroestimulação (Rao 2004). Esse sinergismo deve-se ao fato da inervação presente na região da pelve e períneo possuir conexões com diversas regiões do sistema nervoso central (medula espinhal, tronco encefálico/ponte e córtex sensorial e motor).

Dado o sinergismo entre os músculos pélvicos e perineais, torna-se imperativa a observação das propriedades anatofisiológicas (Messelink et al. 2005) de todo esse complexo funcional nos estados hígidos e ao longo de condições potencialmente lesivas, para otimizar as medidas preventivas e terapêuticas desta região.

1.2. PRINCIPAIS AFECÇÕES MUSCULARES DA PELVE E PERÍNEO

As entidades clínicas mais prevalentes do assoalho pélvico são a incontinência urinária (IU), incontinência anal (IA) e o prolapso de órgão pélvico (POP) (Abrams et al. 2009).

Segundo a Associação Internacional de Uroginecologia e a Sociedade Internacional de Continência, a IU pode ser definida como perda involuntária de urina (Haylen et al. 2010) e pode ser caracterizada em três tipos principais: a IU de Urgência (IUU), IU de Esforço (IUE) e a IU Mista (IUM). A prevalência da IU feminina varia de acordo com a população alvo estudada, ou seja, mulheres de meia idade e idosas institucionalizadas ou não, gestantes e puérperas (Hvidman et al. 2002). Considerando mulheres de meia idade e idosas não institucionalizadas, estima-se que a prevalência de IU varie entre 20% a 36% (Myers 2014). Dessa forma, a IU atinge uma grande parcela da população feminina, resultando em impacto considerável para a percepção da qualidade de vida e também no orçamento público-privado (Thom et al. 2005). O custo estimado anual da IU é de aproximadamente U\$76 bilhões (Coyne et al. 2014).

A IA que é descrita como a incapacidade de manter o controle fisiológico do conteúdo intestinal em local e tempo socialmente adequados (Barbosa et al. 2007) é uma afecção que gera transtornos à qualidade de vida de pacientes incontinentes. Os estudos mostram que na população feminina com idade compreendida entre 15 a 60 anos a prevalência da incontinência anal é de 1,2%, enquanto para as mulheres acima de 60 anos foi de 6,2% (Pretlove et al. 2006); o custo anual da IA nos Estados Unidos é de aproximadamente U\$ 2,4 bilhões (Xu et al. 2012).

O POP pode ser categorizado em dois tipos: o prolapso urogenital e o retal (Persu et al. 2011), que clinicamente pode se manifestar acima do intróito, no intróito ou para além do intróito vaginal, na presença ou ausência da manobra de Valsalva (Persu et al. 2011). Essa afecção ocorre pela disfunção dos elementos de estabilização dinâmica e estática da pelve e do períneo (Bharucha et al. 2005). Cabe aos músculos, fáscias e ligamentos a tarefa de exercerem a função de sustentação do assoalho pélvico (Bharucha et al. 2005). A prevalência dessa

afecção está entre 31% a 50% das mulheres acima dos 50 anos (Samuelsson et al. 1999). O gasto estimado anual com o POP é de aproximadamente U\$5,7 bilhões (Cheon & Maher 2013).

Diante do exposto, percebe-se que as afecções acima referidas geram impacto de grande monta no orçamento da saúde. Embora não haja dados epidemiológicos nem de custos assistenciais destas entidades clínicas no Brasil, o cenário para os próximos anos aponta para o crescimento da incidência e dos gastos com estas afecções em todo o mundo (Herschorn et al. 2007; Kopp et al. 2008). Além da importância dos estudos epidemiológicos para compreender o crescimento das afecções de pelve e períneo, os estudos translacionais e experimentais ajudam a compreender o efeito das intervenções terapêuticas utilizadas no enfrentamento das limitações impostas por estas entidades clínicas.

1.3. ADAPTAÇÕES MORFOLÓGICAS PROMOVIDAS NA PELVE E PERÍNEO PELA PARIDADE

Durante o período gestacional acontecem várias adaptações morfológicas nos tecidos que compõem os órgãos abdominais pélvicos da mulher. Observa-se, dentre outras mudanças, o aumento no tamanho e volume do útero que acarreta modificações na disposição dos órgãos abdominopélvicos (O'Boyle et al. 2005). Em consequência dessas adaptações ocorre aumento de sobrecarga nos elementos de estabilização pélvicos, que pode gerar disfunções nos tecidos do assoalho pélvico, bem como alterações no posicionamento dos órgãos pélvicos após o parto; disso, decorre que múltiplas gestações/múltiplos partos constituem um fator de risco para todas as afecções musculoesqueléticas apresentadas acima (Abrams et al. 2009).

Semelhante às múltiparas, mulheres nulíparas podem apresentar as mesmas entidades clínicas reportadas acima, o que demonstra que a multiparidade não é o único fator determinante para tais afecções. No entanto, a proporção de mulheres múltiparas com IU, IA e POP é destacadamente maior em relação às nulíparas (Abrams et al. 2009), sobretudo, quando relacionado ao tipo de parto (normal ou cesáreo), ao uso de fórceps, aplicação de episiotomia,

presença de incontinências antes e durante a gestação. Assume-se que em relação ao parto cesáreo, o parto normal acarreta aumento de risco, especialmente no que tange a manifestação das incontinências (Zetterstrom et al. 1999). De uma forma geral, os estudos apontam para uma forte indicação de que a multiparidade contribui para a ocorrência da IU, IA e POP (Handa et al. 2007; NIH 2007). Assim, a observação do efeito da multiparidade sobre os elementos de estabilização estática e dinâmica da pelve e períneo precisam de melhor esclarecimento, sendo o modelo animal uma alternativa para esse objetivo. Conforme Wieslander et al. (2009), o estudo de modelos animais como ratas, tem sido sugerido na tentativa de transpor o conhecimento acerca da morfologia do assoalho pélvico e das variações/disfunções relacionadas a múltiplos partos e/ou processo de envelhecimento.

1.4. ELETROESTIMULAÇÃO MUSCULAR APLICADA A PELVE E PERÍNEO

Dentre os efeitos principais da eletroestimulação (EE) destaca-se o aumento da força muscular e da resistência à fadiga, hipertrofia, estimulação trófica e angiogênese (Watson 2000; Brown & Hudlicka 2003; Cavalcante et al. 2012; Dirks et al. 2014). A EE apresenta como vantagens o baixo custo e a ausência de efeitos colaterais (Francine 2009).

A EE da pelve e períneo feminino permite duas vias para inserção da sonda do eletroestimulador. A via intravaginal é mais utilizada para o fortalecimento dos MAPs e no tratamento da IU (Correia et al. 2011); isto se deve ao fato de as paredes da vagina estabelecerem contato com todos os órgãos pélvicos e com os planos musculares adjacentes (EAE, diafragmas pélvico e urogenital). A sonda intra-anal é empregada especificamente para o tratamento da IA pelo fato de o canal anal possuir relação anatômica apenas com um órgão pélvico, a parede posterior da vagina (Vonthein et al. 2013); mas, ressalta-se que esse canal tem relação com praticamente todos os planos musculares da pelve e períneo.

A recomendação da EE como modalidade de tratamento para as afecções musculoesqueléticas da pelve e períneo são diversas. Holzer et al. (2007) e Jung et al. (2013), observaram que EE da região ano-retal modula a sensibilidade do

canal anal, favorecendo a homeostase do reflexo defecatório, bem como aumento do mecanismo de continência fecal e de flatos em sujeitos com IA. Também, a EE contribui para a neuromodulação vesical (Zhang et al. 2010), o aumento da pressão de fechamento uretral e o fortalecimento dos MAPs (Bo et al. 1999). Similarmente, outros estudos apontam para a indicação da EE no tratamento conservador das três entidades clínicas descritas anteriormente (Worsoe et al. 2013; Rosenbaum 2011; Guralnick et al. 2015). Por mais que a indicação da EE esteja usualmente vinculada como recurso terapêutico para uma determinada afecção, é importante ressaltar que a mesma pode ser aplicada como medida educadora, em sujeitos saudáveis, para conscientização dos músculos da região da pelve e períneo (Pedraza et al. 2014). Embora a EE seja largamente utilizada como agente terapêutico para as afecções de pelve e períneo, Bo et al. (1999) e Wyndaele & Poortmans (2006) ressaltam que há uma evidente falta de coerência nos protocolos utilizados. Uma razão para isso reside no fato de que as informações básicas sobre o efeito da EE na musculatura da pelve e períneo seja baseada em pressuposições teóricas e não embasadas nos achados histológicos.

Dados os achados clínicos do tratamento das incontinências com a eletroestimulação (Bo et al. 1999; Abrams et al. 2009; Vonthein et al. 2013) e o potencial desse método na reparação de músculo estriado esquelético (hiperplasia e/ou hipertrofia) e liso (Brown & Hudlicka, 2003; Zhang et al. 2010; Dirks et al. 2014), é fundamental elucidar os efeitos desse método no parênquima e no estroma do assoalho pélvico, uma vez que a sua indicação tem aumentado no ambiente terapêutico de diversas entidades clínicas, especialmente na urologia, ginecologia e proctologia. Dessa forma, esse estudo pode contribuir para a compreensão dos efeitos morfofuncionais da eletroestimulação nos tecidos associados à pelve e períneo pelas vias intravaginal e intra-anal.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar o efeito da eletroestimulação intravaginal e intra-anal nos tecidos associados aos órgãos da pelve e períneo de ratas Wistar.

2.2. Objetivos específicos

- Desenvolver a sonda de eletroestimulação adaptada às dimensões vaginais das ratas Wistar;
- Adaptar a sonda ao eletroestimulador clínico;
- Testar a efetividade do sinal da sonda produzida e compará-lo ao da sonda comercial;
- Desenvolver e calibrar um manômetro intra-anal adaptado às dimensões de ratas Wistar;
- Determinar o efeito da eletroestimulação na força de contração dos músculos do assoalho pélvico;
- Quantificar as fibras musculares presentes na musculatura lisa e esquelética;
- Determinar por morfometria o diâmetro das fibras musculares esqueléticas dos MAPs e EAE;
- Quantificar o número de mionúcleos por fibra dos músculos do assoalho pélvico MAPs;
- Determinar a largura das camadas mucosa, submucosa e muscular associadas à uretra, vagina, reto, ânus e fáscia endopélvica;
- Identificar e descrever as células migratórias (análise histopatológica) nos tecidos associados aos órgãos da pelve e períneo.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

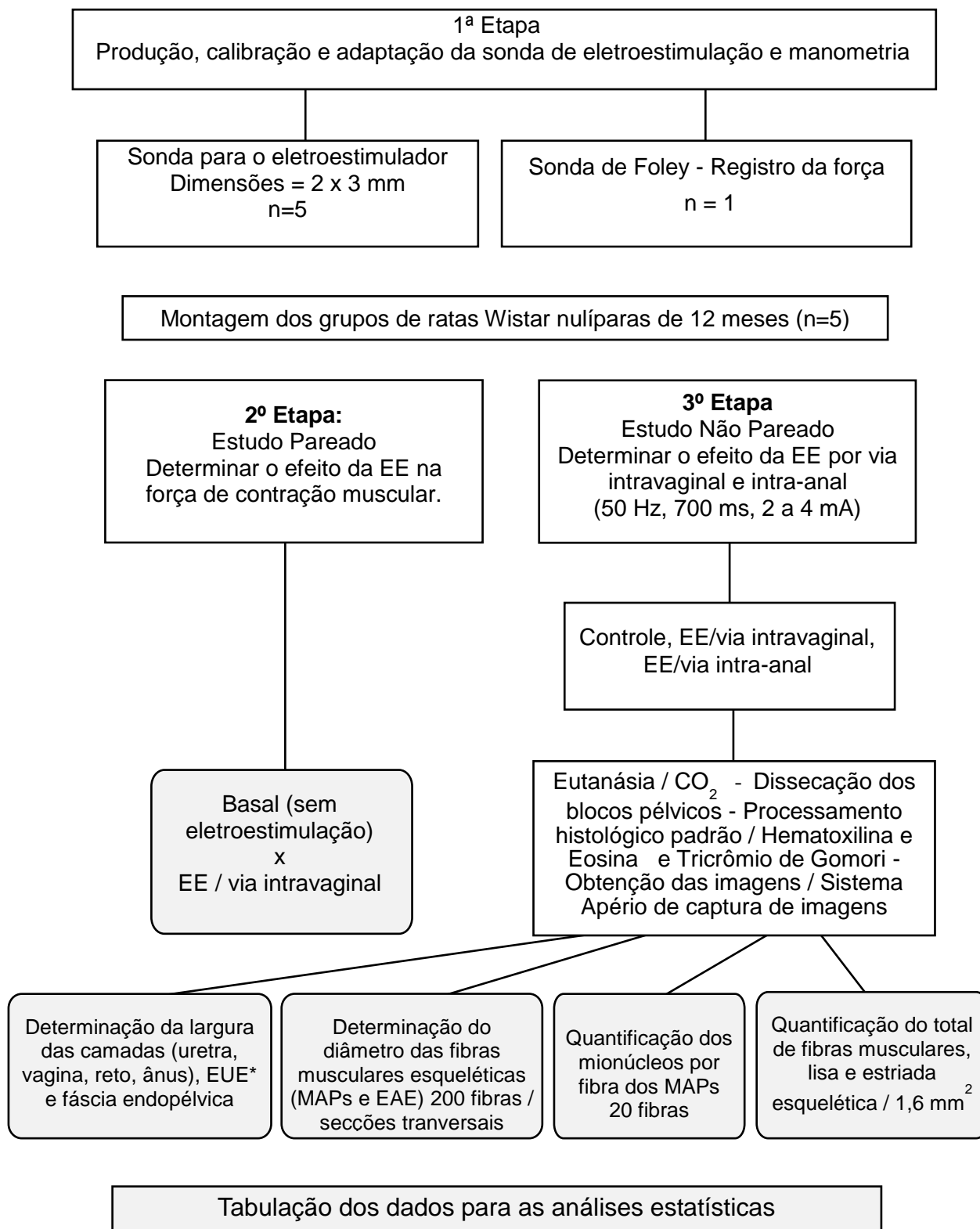


Figura 1. Organograma do estudo.

3.2. TIPO DE ESTUDO

Trata-se de um estudo descritivo, analítico, comparativo e experimental realizado no Laboratório de Ciências (LABOCIEN) do Centro Universitário de Brasília (UniCEUB) e no Laboratório de Histologia da Área de Morfologia da Faculdade de Medicina - Universidade de Brasília (UnB).

Durante a realização deste estudo, as normas éticas para a pesquisa científica com animais de laboratório foram rigorosamente obedecidas, conforme determina a lei número 6.638 de 8/05/1979 dos princípios éticos para experimentação com animais de laboratório, definidas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal. O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no uso de Animais do UniCEUB em 19/04/2013 (nº 01/2013).

3.3. ANIMAIS

Os animais neste trabalho foram ratas fêmeas adultas nulíparas da linhagem Wistar, heterogênicos, com 12 meses de idade (n=5), que equivale a 36 anos no ser humano (Sengupta 2011). As ratas eram provenientes do biotério do UniCEUB. Durante a fase experimental, os animais eram mantidos no alojamento de animais no biotério do UniCEUB, com temperatura controlada (23°C), ciclo claro/escuro de 12 horas e alimentados com ração balanceada e água potável *ad libitum*. O cálculo amostral do presente estudo e os critérios adotados para a experimentação e manutenção dos animais estiveram rigorosamente dentro das normas estabelecidas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

3.4. GRUPOS DE ESTUDO

De forma a permitir a análise estatística adequada, foram compostos os grupos de animais (n=5) alocados aleatoriamente (Jung et al. 1999). Os grupos foram constituídos de ratas adultas nulíparas tratadas ou não por via intravaginal ou intra-anal para determinar o efeito da EE no parênquima e estroma da pelve e períneo (estudo não pareado), além de um grupo de ratas nulíparas eletroestimuladas por via intravaginal para determinar a força de contração muscular (grupo pareado), conforme mostrado abaixo:

Estudo pareado

- *Nulíparas (N)*;

Estudo não pareado

- *Controle Nulíparas (C);*
- *Nulíparas Eletroestimulada Intravaginal (EEIV);*
- *Nulíparas Eletroestimulada Intra-Anal (EEIA).*

3.5. OBTENÇÃO E PADRONIZAÇÃO DA SONDA DO ELETROESTIMULADOR E DO MANÔMETRO

Considerando a inexistência de sonda de eletroestimulação adaptada às dimensões da vagina e canal anal de ratas Wistar e evitar possíveis sofrimentos e desconfortos aos animais procedeu-se estudo para a produção de sondas adaptadas ao eletroestimulador Dualpex 961 QUARK[®] modelo URO. Para viabilizar a obtenção, a adaptação e padronização da sonda contou-se com o auxílio de um engenheiro biomédico da Faculdade de Engenharia Elétrica da Universidade de Brasília. Depois de produzidas, as sondas eram higienizadas com sabonete antisséptico e água corrente e, em seguida, eram armazenadas em lugar seco para serem testadas.

Para a produção da sonda optou-se por uma corrente bifásica simétrica retangular com largura de pulso de 700- μ s e frequência de 50 Hz, em que a intensidade foi padronizada inicialmente entre 2 a 4 mA ou até a contração muscular visível ao observador, mas sem causar sofrimento ao animal, de acordo com os estudos de (Bo et al. 1999; Wyndaele & Poortmans 2006), conforme esquematizado na figura 2. O tempo decorrido entre a passagem da corrente/contração muscular e sua interrupção/repouso muscular (*On/off*) foi de 5 e 10 segundos, respectivamente.

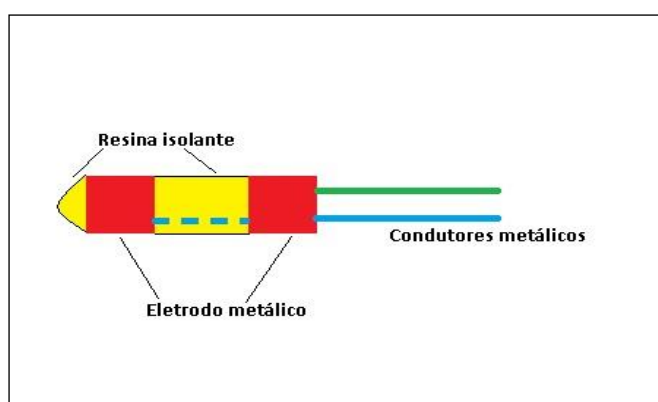


Figura 2. Representação da sonda de eletroestimulação anal e vaginal para ratas Wistar.

Para a obtenção dos registros da força muscular, foi fabricado e calibrado um manômetro de pressão adaptado ao modelo animal, utilizando-se para o projeto um transdutor de pressão (Honeywell®, Phoenix, United States) acoplado a um amplificador com ganho de 11 vezes (Honeywell®, Phoenix, United States), um osciloscópio digital (Diligent®, Pullman, United States) com interface gráfica pelo programa de computador da Diligent® e uma sonda de Foley (Solidor®, Diadema, Brasil) e uma seringa de 20 mL, com 21,25 mm de diâmetro e êmbolo de 11 cm, conforme esquematizado na figura 3.

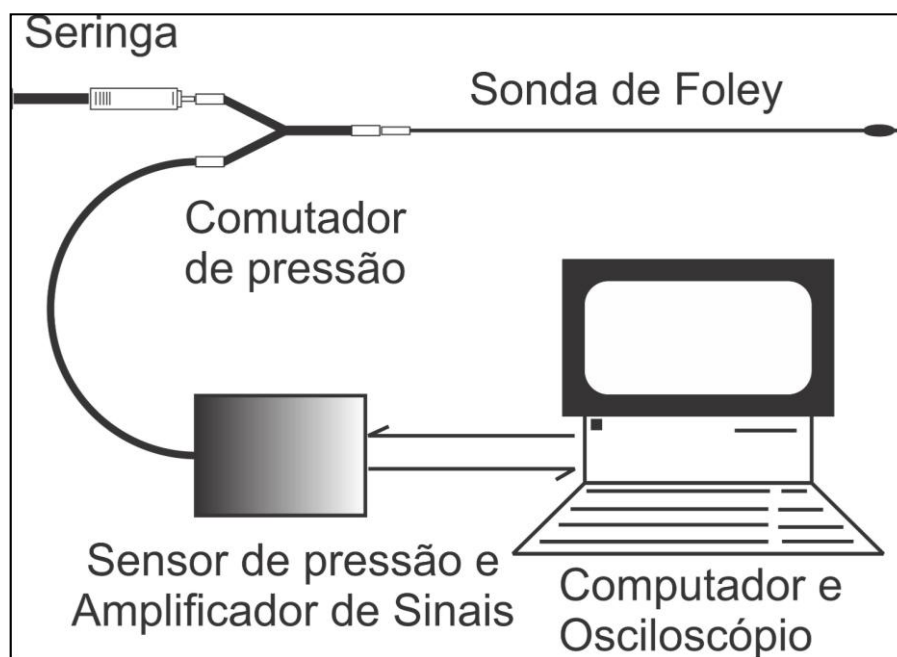


Figura 3. Componentes do manômetro anal e suas conexões.

3.6. DETERMINAÇÃO DA FORÇA DE CONTRAÇÃO MUSCULAR

Para a avaliação da força dos músculos da pelve e períneo, foi introduzida no ânus das ratas nulíparas (estudo pareado) a sonda do manômetro elaborada conforme descrito acima (item 3.5). Os passos para o registro da pressão intra-anal foram os seguintes:

1. introdução da sonda no reto-ânus;
2. insuflação da sonda intra-anal;
3. observação e registro da pressão intra-anal durante 120 segundos.

Os registros da força ocorreram em três momentos durante a sessão de eletroestimulação: o primeiro registrou o tônus basal intra-anal sem a inserção da sonda de eletroestimulação, o segundo capturou a contração reflexa no momento da inserção da sonda da eletroestimulação por via intravaginal, porém sem passagem de corrente elétrica, o terceiro registrou a contração evocada no momento da passagem da corrente elétrica pela via intravaginal durante cinco segundos (Figura 3). A avaliação da força de contração do assoalho pélvico ocorreu concomitantemente à sessão de EE. Os parâmetros utilizados para a EE foram os mesmos descritos no item 3.5.

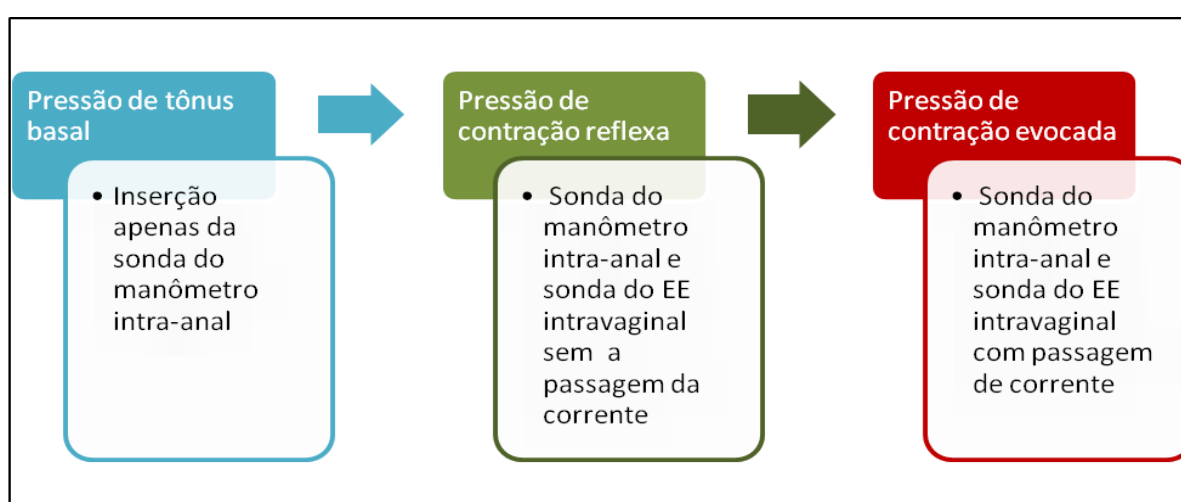


Figura 4. Desenho esquemático do tratamento com a eletroestimulação e o registro da força muscular no momento basal, após a inserção da sonda de EE e durante a passagem de corrente de eletroestimulação.

3.7. AVALIAÇÃO DA EFETIVIDADE DA ELETROESTIMULAÇÃO

Para avaliar a efetividade e o efeito da eletroestimulação as ratas foram submetidas a 30 sessões, em conformidade com o protocolo de tratamento prescrito para o fortalecimento dos músculos do assoalho pélvico e anorretais (BO et al. 1999). As sessões aconteciam 5 vezes por semana (dias úteis) e durante 3 semanas consecutivas; especificamente, a eletroestimulação acontecia em 2 vezes consecutivas à cada dia, sendo que cada sessão durava 6 minutos com intervalo de 5 minutos de repouso entre elas.

Os parâmetros utilizados na eletroestimulação deste estudo foram baseados no método idealizado por Wyndaele & Poortmans (2006), com algumas modificações, como a contenção manual e não sedação dos animais. O

procedimento consistia do posicionamento do animal sobre a palma de uma das mãos tracionando-se a pele da nuca com uma preensão bidigital entre os dedos indicador e polegar, enquanto com a outra mão tracionava a cauda, de modo a permitir a respiração facilitada e pequenos movimentos isométricos do corpo. Logo após a contenção do animal e seu posicionamento em decúbito dorsal, outro pesquisador procedia à introdução da sonda do eletroestimulador previamente lubrificada por gel condutor no canal anal (EEIA/electroestimulação intra-anal) e vaginal (EEIV/electroestimulação intravaginal), sempre de modo a evitar dor e sofrimento aos animais. Para isso, foi observado durante a sessão de electroestimulação os seguintes aspectos comportamentais do animal, como rangidos, enrijecimento da cauda ou movimentos corporais abruptos. Além disso, com intuito de minimizar o estresse gerado pelo procedimento de inserção de sonda do eletroestimulador, estabeleceu-se um período de uma semana para familiarização com os animais, gerando condicionamento com a conduta de rotina do estudo.

3.8. OBTENÇÃO DO BLOCO PÉLVICO

No primeiro dia após a última sessão da electroestimulação os animais eram colocados em câmara com concentração de 40% de CO₂, resultando em morte pela depressão excessiva do SNC e hipóxia, devido ao deslocamento do oxigênio durante a troca gasosa alveolar; o emprego desse método sobressai aos demais por ser rápido, indolor, de baixo custo e por manter os tecidos sem resíduos químicos. Após a eutanásia, os animais foram submetidos à dissecação para a remoção dos blocos pélvicos em que, especificamente, eram removidos os segmentos da pelve e períneo. O segmento reto-anal foi removido da pelve, preservando-se a pele perianal, com intuito de não danificar nenhuma porção do músculo esfíncter anal externo (EAE); os MAPs eram mantidos com suas inserções no anel pélvico, bem como a uretra, vagina e reto. Todos os espécimes foram fixados em solução de formol a 10% e depois submetidos ao processamento para a obtenção das secções histológicas.

3.9. PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO

Os blocos de pelve e períneo removidos conforme descrito acima foram processados para as análises histopatológicas por microscopia de luz. Inicialmente

os espécimes depois de fixados, eram desidratados em soluções com concentrações crescente de álcool (70%, 80%, 90% e 3x 100%), diafanizados em xilol por 30 minutos (2 banhos) e impregnados em parafina a 60 graus (3 banhos) e, em seguida, emblocados em parafina. Posteriormente, os espécimes foram seccionados em secções de 5 µm de espessura e corados. Para o estudo histopatológico, nos tecidos associados aos órgãos da pelve e períneo, as secções histológicas foram coradas com hematoxilina e eosina para avaliar possíveis infiltrados inflamatórios, e com tricrômio de Gomori para avaliar as fibras de colágeno e células musculares. Depois de coradas, as secções histológicas foram digitalizadas e capturadas com o equipamento Aperio ScanScope® e avaliadas no programa ImageScope version 11.2.0.780 (Aperio Technologies Inc, Vista, CA, USA) e, posteriormente, analisadas por um único observador (200x e 400x).

3.10. AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA DOS TECIDOS PÉLVICOS

O estudo morfológico foi realizado nas secções histológicas dos blocos pélvico e perineal para determinar: a) a largura das camadas epitelial, conjuntiva e musculares da uretra, vagina, reto e ânus, além da largura do esfíncter uretral externo e da fáscia endopélvica; b) o total de fibras musculares lisas da uretra, vagina e reto; c) o total e o diâmetro das fibras do músculo esfíncter anal externo (EAE) e dos músculos do assoalho pélvico (MAPs); d) o total das fibras e a largura do músculo esfíncter anal interno; e) o total de mionúcleos das fibras dos MAPs; f) avaliação qualitativa das células migratórias do tecido conjuntivo.

Para determinar a largura das camadas teciduais da uretra, vagina, reto, ânus, EUE e fáscia endopélvica foi utilizada a ferramenta de medida de comprimento do programa ImageScope Leica® (versão 12.0) nas imagens das secções histológicas digitalizadas. Para quantificar o total de fibras musculares, foram delimitadas quatro áreas equidistantes de 400 µm² (1.6 mm²) nas secções transversais representativas da uretra, vagina, reto, esfíncter anal interno (EAI), esfíncter anal externo (EAE) e dos músculos do assoalho pélvico (MAPs). Para determinar o diâmetro médio (produto da soma do diâmetro maior e menor dividido por dois) das fibras musculares esqueléticas dos MAPs e EAE, mediu-se os diâmetros de 200 fibras com o formato poligonal. Para quantificar o número de mionúcleos por fibra muscular dos MAPs, contou-se a quantidade de 20 fibras por amostra dos animais dos grupos não pareado (C, EEIV e EEIA).

3.11. ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

As análises qualitativas (análise histopatológica) dos tecidos associados a uretra, vagina, reto-ânus e MAPs foram realizadas por um único observador em 4 campos equidistantes (200 μm^2 /campo) das secções histológicas coradas com hematoxilina e eosina. Foram considerados o tipo de infiltrado inflamatório (tecido conjuntivo e epitélio), possíveis alterações morfológicas nos tecidos (epitelial, conjuntivo e muscular), e a presença ou não de hemorragia, degeneração celular e necrose.

3.12. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A normalidade das variáveis foi analisada empregando-se o teste de Kolmogorov-Smirnov e a homogeneidade das variâncias, empregando-se o teste de Bartlett. Para as múltiplas comparações de dados paramétricos foi utilizado o teste de ANOVA seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls ou para dados não paramétricos o teste de Kruskal-Wallis seguido pelo método de Dunn. Quando o objetivo era comparar dois grupos independentes e paramétricos foi usado o teste t, enquanto que para dados não paramétricos foi usado o teste de Mann-Whitney. Para as comparações entre grupos dependentes (estudo pareado) foi usado os testes t pareado uma vez que os dados eram paramétricos. Para as comparações de dados paramétricos foram utilizadas as médias \pm DP e para os não paramétricos a mediana. As análises foram realizadas empregando-se o programa Prism® 5 Software Package (GraphPad, USA, 2005) e diferenças de $p < 0,05$ foram consideradas significantes

4. RESULTADOS

4.1. CONSTRUÇÃO, ADAPTAÇÃO E CALIBRAÇÃO DA SONDA DE ELETROESTIMULAÇÃO E DO MANÔMETRO

Considerando as dimensões da vagina e canal anal de ratas Wistar e para evitar possíveis sofrimentos e desconfortos aos animais foram produzidas, adaptadas e calibradas 5 (cinco) sondas de eletroestimulação.

As sondas foram produzidas conforme demonstrado na figura 5. Em cada uma delas foi utilizado 2 anéis de aço inoxidável com 2.0 mm de diâmetro e 3.0 mm de comprimento conectados a fios elétricos por meio de soldas de estanho e isolados entre si por 3.0 mm de resina acrílica não condutora e autopolimerizável, aplicada também acima e abaixo dos anéis metálicos. O comprimento total da sonda foi de 12.0 mm.



Figura 5. Fotografia da sonda de eletroestimulação produzida e adaptada às dimensões do canal anal e vaginal de ratas Wistar.

Depois de produzidas, as sondas foram acopladas ao eletroestimulador para avaliar sua efetividade na eletroestimulação. Os resultados desse ensaio mostraram que a transmissão do sinal elétrico gerado pelo eletroestimulador foi conduzida de maneira efetiva, sendo capaz de induzir a contração muscular nos músculos da pelve, períneo e dos adutores da coxa, conforme demonstrado na figura 6.

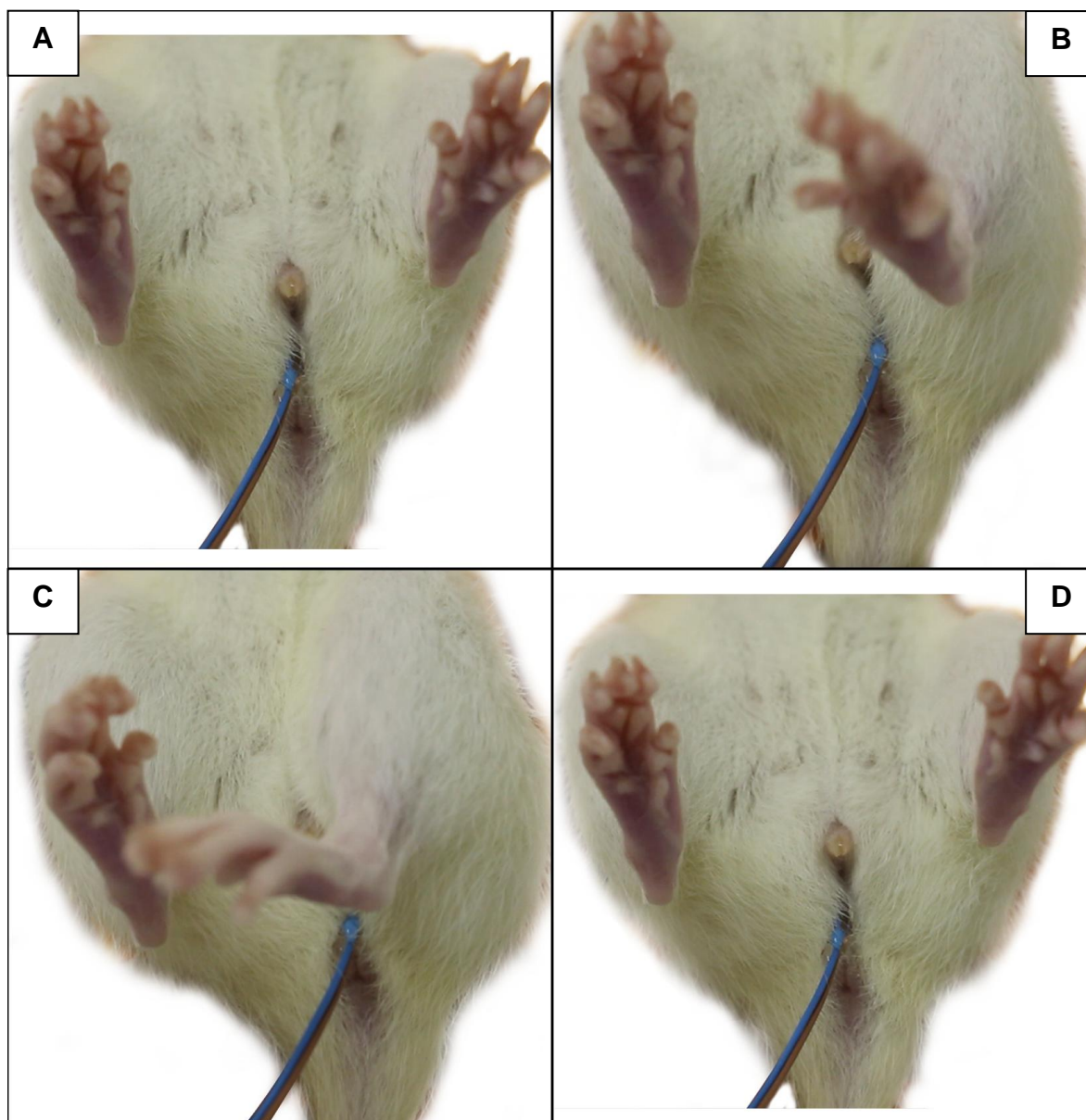


Figura 6. Fotografias do ensaio para avaliar a efetividade da sonda de eletroestimulação. As imagens demonstram a contração efetiva dos músculos da pelve, períneo e adutores da coxa de ratas Wistar por meio da sonda protótipo acoplada ao eletroestimulador Dualpex® 961. Em A e D, observa-se o animal com a sonda introduzida no ânus e sem evidências de contração muscular, enquanto que em B observa-se a contração inicial e em C a máxima contração.

Para avaliar se a transmissão do sinal elétrico pelas sondas produzidas nesse estudo era comparável à sonda comercial foram realizados ensaios de automação biomédica com o auxílio de um osciloscópio. Os resultados mostraram que a sonda comercial gerou uma amplitude efetiva de sinal de 80 mV durante 10 segundos, enquanto que as sondas confeccionadas para este estudo geraram uma amplitude efetiva de 72,5 mV durante 10 segundos (Mann-Whitney, $p > 0,05$) (figura

4 e 5). A amplitude efetiva do sinal foi calculada a partir da seguinte operação matemática: $AS - R = AES$, onde AS é a amplitude do sinal, R é o ruído e AES é a amplitude efetiva do sinal (figura 5).

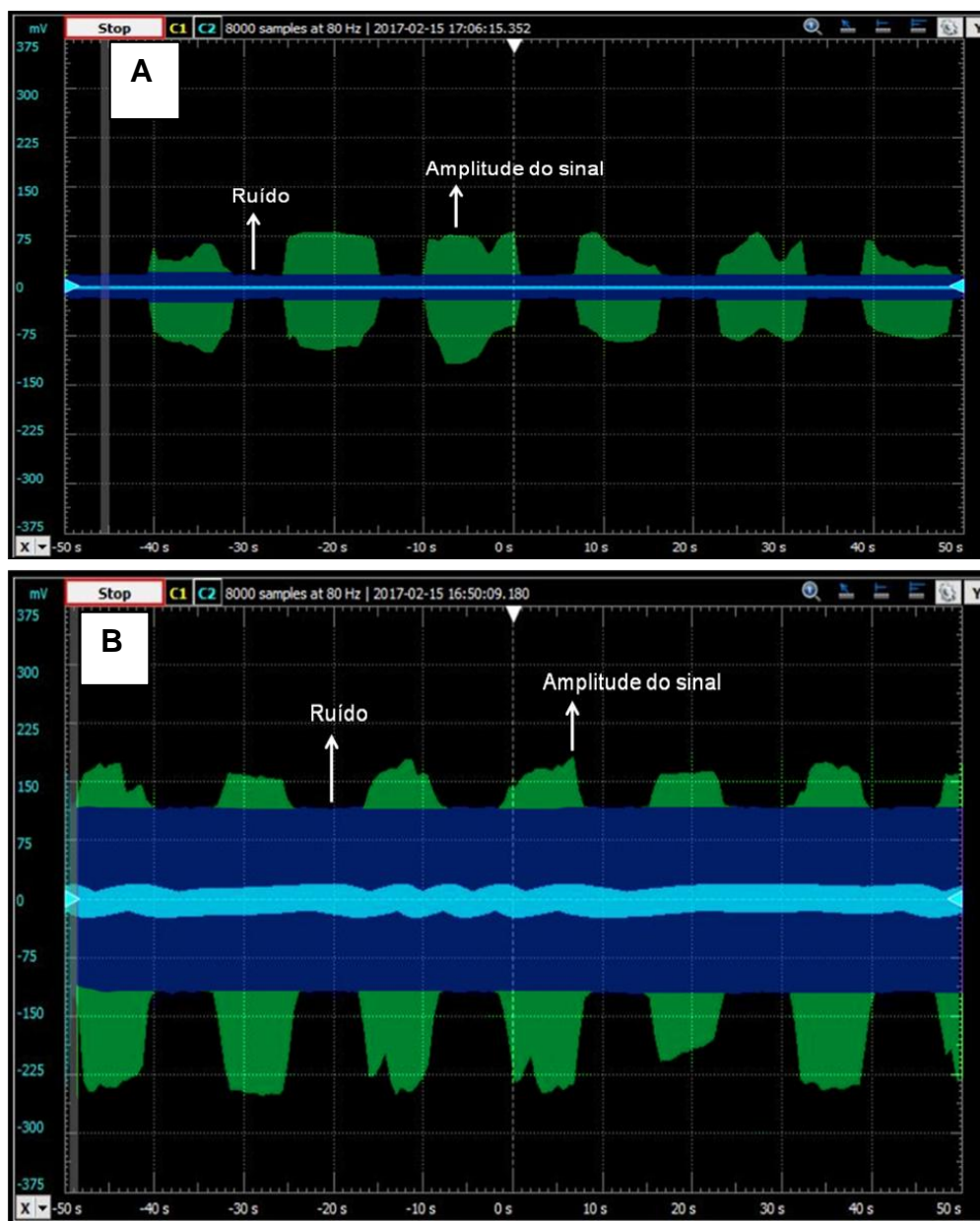


Figura 7. Registro do ruído e da amplitude do sinal elétrico captados nas sondas utilizadas na prática clínica em mulheres (A) e em ratas Wistar (B). Em ambas as figuras (A e B) observa-se em azul o ruído da corrente elétrica e em verde a amplitude efetiva do sinal. Os resultados analisados pelo teste de Mann-Whitney não mostraram diferenças na amplitude e no tempo de sinal entre a sonda convencional e a produzida nesse estudo ($p = 0,580$).

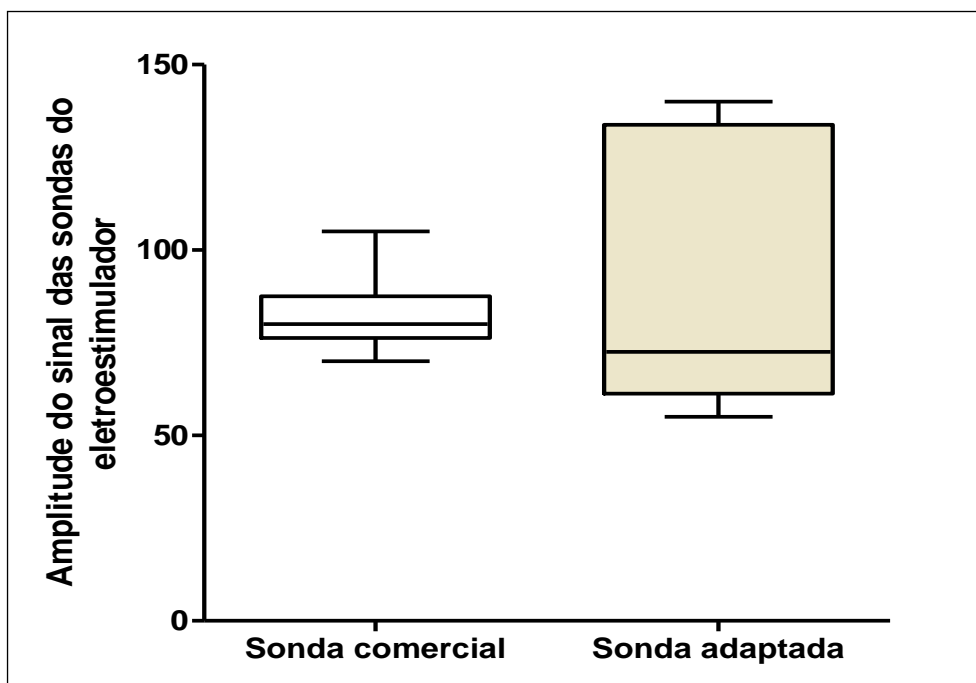


Figura 8. Comparação da amplitude do sinal das sondas do eletroestimulador comercial (prática clínica) e adaptada para ratas Wistar. Os resultados analisados pelo teste de Mann-Whitney não mostraram diferenças na amplitude e no tempo de sinal entre a sonda convencional e a produzida nesse estudo ($p = 0,580$). Estão representados as médias e os desvios padrão.

O instrumento para a manometria foi produzido e montado em conformidade com projeto apresentado no item 3.5 da metodologia (figura 9). Para a calibração do instrumento de manometria a sonda de Foley foi insuflada até a tensão limítrofe de 4 a 5 psi (1,29V a 2,15V) (4 a 5 psi), enquanto a pressão de decaimento, após o fechamento do sistema por 120 segundos, foi de 1,29V (3 psi) (Figura 10).

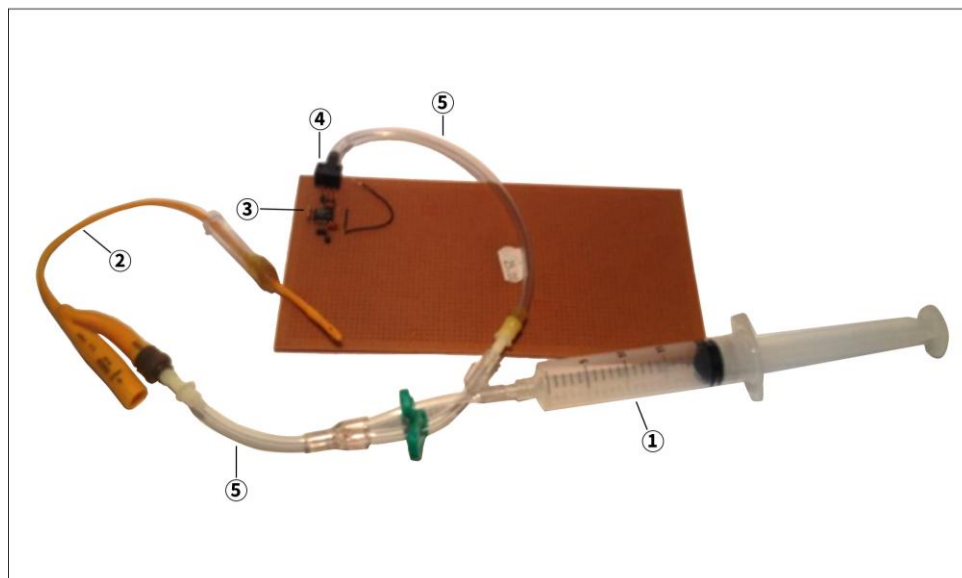


Figura 9. Fotografia do monômetro produzido para a presente pesquisa. Em 1, seringa; em 2 sonda de Foley; em 3 amplificador; em 4 sensor de pressão e; em 5 mangueira de condução de ar.

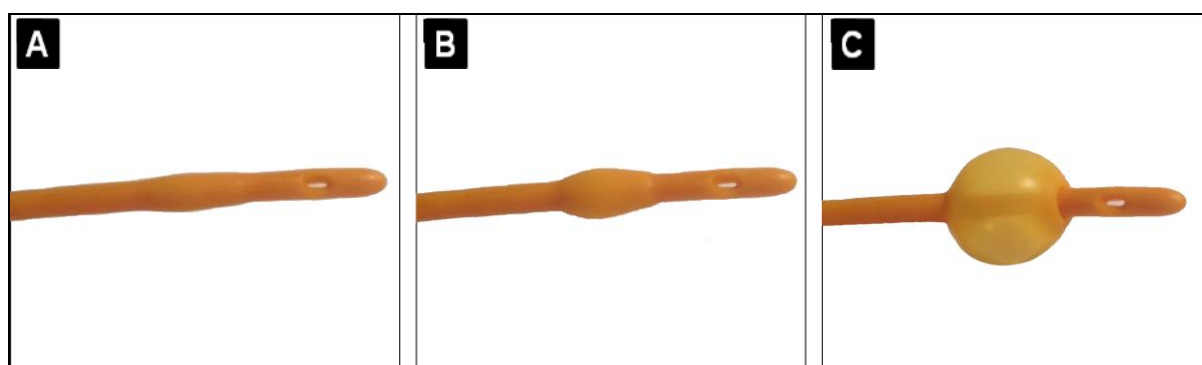


Figura 10. Sequência de imagens demonstrando a insuflação da sonda de Foley. Em A observa-se a sonda desinsuflada, em B a sonda insuflada na pressão limítrofe e em C a sonda em máxima insuflação.

A pressão existente no interior do sistema do manômetro gerou uma curva de tensão elétrica, sem amplificação, que ao passar pelo amplificador obteve uma ampliação de 11 vezes na aquisição dos dados, configurando uma curva de tensão ampliada que passou a ser a curva de calibração da manometria (Figura 11). Os valores obtidos foram monitorados pelo osciloscópio digital e gravados no programa de computador (Diligent®).

Com o intuito de facilitar a leitura, interpretação e comparação dos registros de pressão intra-anal, obtidos no presente estudo, com os dados publicados na literatura, optou-se por transformar os registros de pressão intra-anal captados em

tensão elétrica para centímetros de água (cmH₂O). Portanto, os valores de manometria, nesta pesquisa, foram representados em centímetros de água.

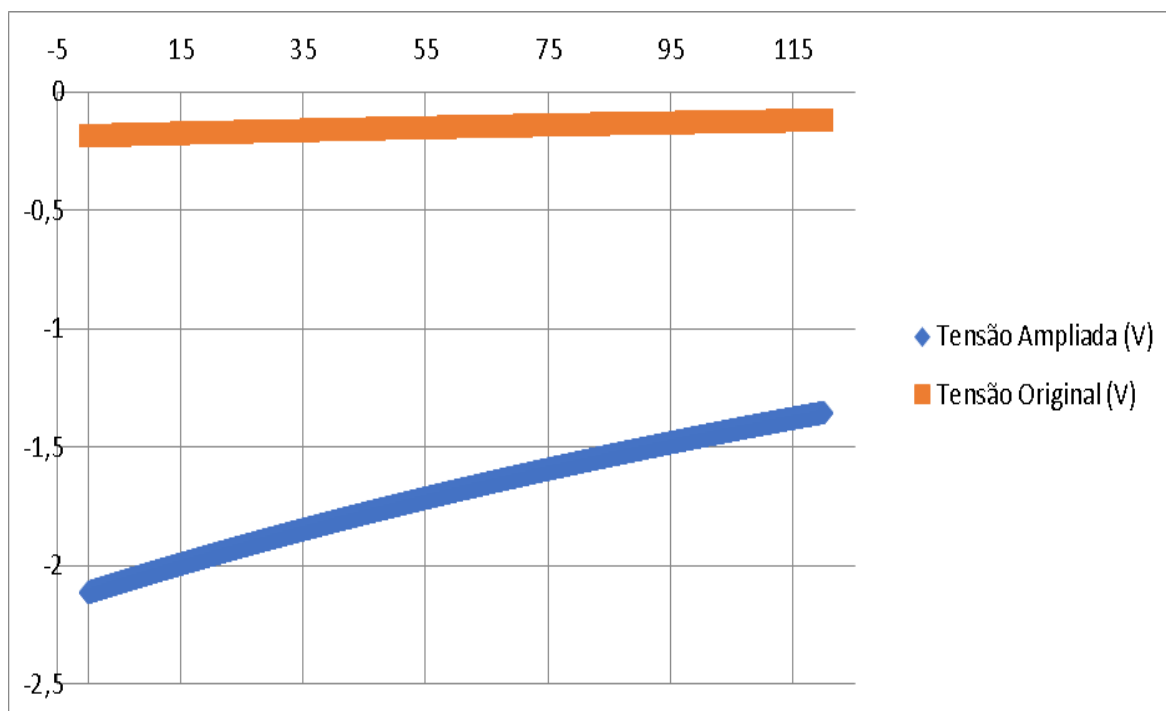


Figura 11. Curva de calibração do protótipo da sonda e do manômetro anal de ratas Wistar. Na linha laranja observa-se a tensão elétrica na sonda sem amplificação e na linha azul com amplificação.

4.2. AVALIAÇÃO DA EFETIVIDADE DA SONDA DE ELETROESTIMULAÇÃO NEUROMUSCULAR NOS TECIDOS DA PELVE E PERÍNEO

Para avaliar se a sonda adaptada era capaz de conduzir a eletroestimulação efetiva, primeiramente foi obtido o registro da força de contração muscular por manometria em um grupo de ratas e, posteriormente, foi avaliados os parâmetros morfológicos em outro grupo, em que as ratas foram submetidas a 30 sessões de eletroestimulação.

4.2.1. DETERMINAÇÃO DO EFEITO DA ELETROESTIMULAÇÃO NA FORÇA DE CONTRAÇÃO DOS MÚSCULOS DO ASSOALHO PÉLVICO

Para avaliar o efeito da eletroestimulação na força muscular/manometria do assoalho pélvico, ratas nulíparas foram eletroestimuladas pela via intravaginal. O registro da força de contração pela introdução da sonda de pressão intra-anal

ocorreu antes da inserção intravaginal da sonda do eletroestimulador e após a inserção desta, na presença ou ausência da eletroestimulação. Os resultados da tensão elétrica para a escala de medida em centímetros de água (cmH₂O), analisados pelo teste t pareado mostrou que a contração evocada aumentou em 261,5% (p=0,0006) a força de pressão intra-anal quando comparada a contração reflexa (Tabela 1 e Figura 12).

Tabela 1. Força de contração muscular/manometria dos músculos do assoalho pélvico de ratas nulíparas eletroestimulada pela via intravaginal. Os registros de força foram tomados durante o tônus pela inserção da sonda de Foley (controle basal), durante a inserção da sonda do eletroestimulador e durante a aplicação da eletroestimulação.

N	Registros da força de contração	Média±DP
1	Controle basal / Inserção da sonda de Foley	19,4±9,7
2	Introdução intravaginal da sonda de eletroestimulação	25,5±16,1
3	Aplicação da eletroestimulação	92,4±21,2

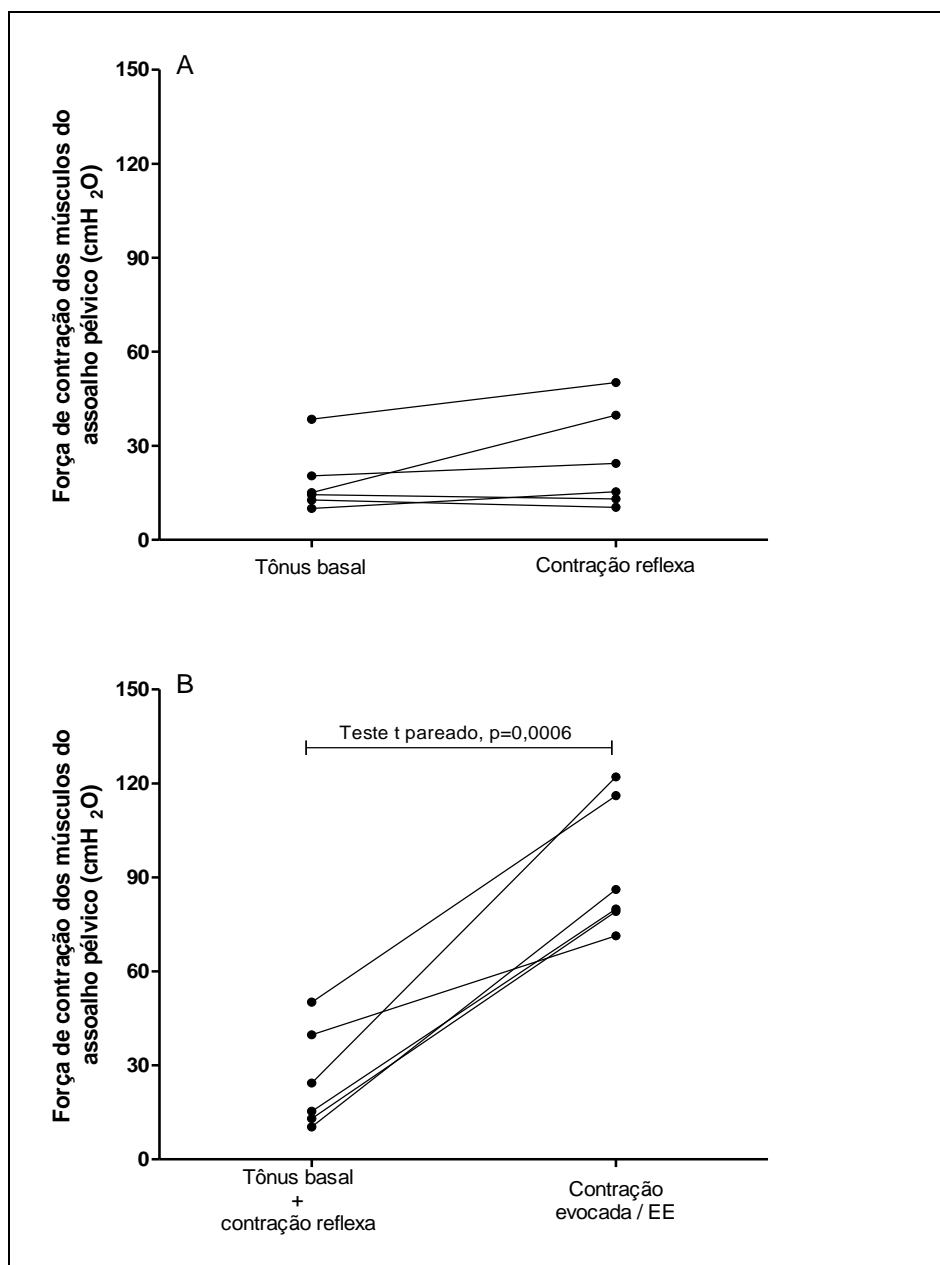


Figura 12. Força de contração/manometria ($n=6$) dos músculos do assoalho pélvico pela inserção intravaginal da sonda do eletroestimulador (A) e após a eletroestimulação intravaginal. Os resultados mostram aumento da força quando aplicada a eletroestimulação, na comparação com a introdução de ambas as sondas ($p < 0,05$). Estão mostrados os valores individuais.

4.2.2. DETERMINAÇÃO DO EFEITO DA ELETROESTIMULAÇÃO NOS MÚSCULOS DO ASSOALHO PÉLVICO

Para avaliar o efeito da eletroestimulação nos tecidos associados ao assoalho pélvico, foram obtidos o total de fibras ($1,6 \text{ mm}^2$), o diâmetro de 200 fibras musculares e o total de mionúcleos (20 fibras), em ratas eletroestimuladas pelas vias intravaginal ou intra-anal.

Os resultados mostraram que, na comparação com o controle, ambas as vias de eletroestimulação, intravaginal e intra-anal, reduziram o total de fibras em 34,1% e aumentaram o seu diâmetro em 25,2% (ANOVA, $p < 0,05$), além de aumentarem em 33,3% o total de mionúcleos (Kruskal-Wallis, $p < 0,05$). Não houve diferenças nos parâmetros avaliados quando comparadas as duas vias de eletroestimulação ($p > 0,05$) (Tabela 2, Figuras 13 e 14).

Tabela 2. Largura das camadas musculares e total de fibras dos músculos associados ao assoalho pélvico de ratas tratadas ou não com eletroestimulação por três semanas consecutivas.

<i>N</i>	<i>Parâmetros morfológicos</i>	<i>Controle</i>	<i>Eletroestimulação</i>	
			<i>Intravaginal</i>	<i>Intra-anal</i>
		<i>Média±DP</i> <i>Mediana</i>	<i>Média±DP</i> <i>Mediana</i>	<i>Média±DP</i> <i>Mediana</i>
1	<i>Total de fibras</i>	34,0±4,0 34,0	22,4±3,1* 22,0	24,0±2,5* 24,0
2	<i>Diâmetro das fibras</i>	40,4±3,5 40,8	50,6±4,5* 48,2	48,3±2,8* 48,1
3	<i>Total de mionúcleos</i>	2,9±0,6 3,0	4,3±0,8* 4,0	3,9±0,5* 4,0

*Valores diferentes do controle, $p < 0,05$

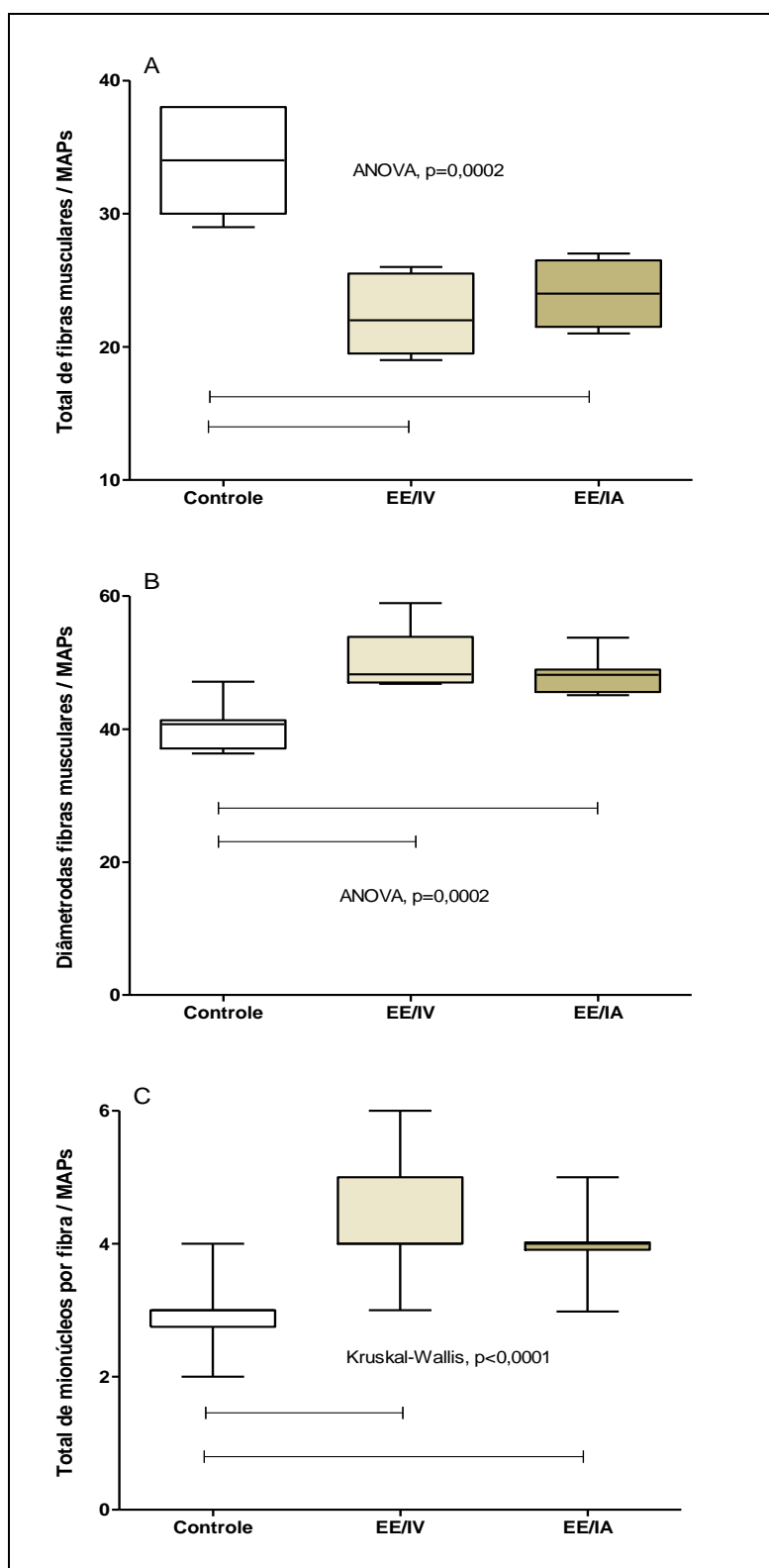


Figura 13. Dados morfométricos dos músculos do assoalho pélvico. Em A, total de fibras musculares, em B o diâmetro das fibras musculares e, em C o total de mionúcleos por fibra muscular. Os resultados foram analisados pelos testes de ANOVA seguido pelo método de Student-Newman-Keuls (total e diâmetro das fibras) ou Kruskal-Wallis seguido pelo método de Dunn para as múltiplas comparações (total de mionúcleos), sendo os grupos diferentes estão indicados pelas barras. Estão mostradas as medianas, quartis, valores máximos e mínimos.

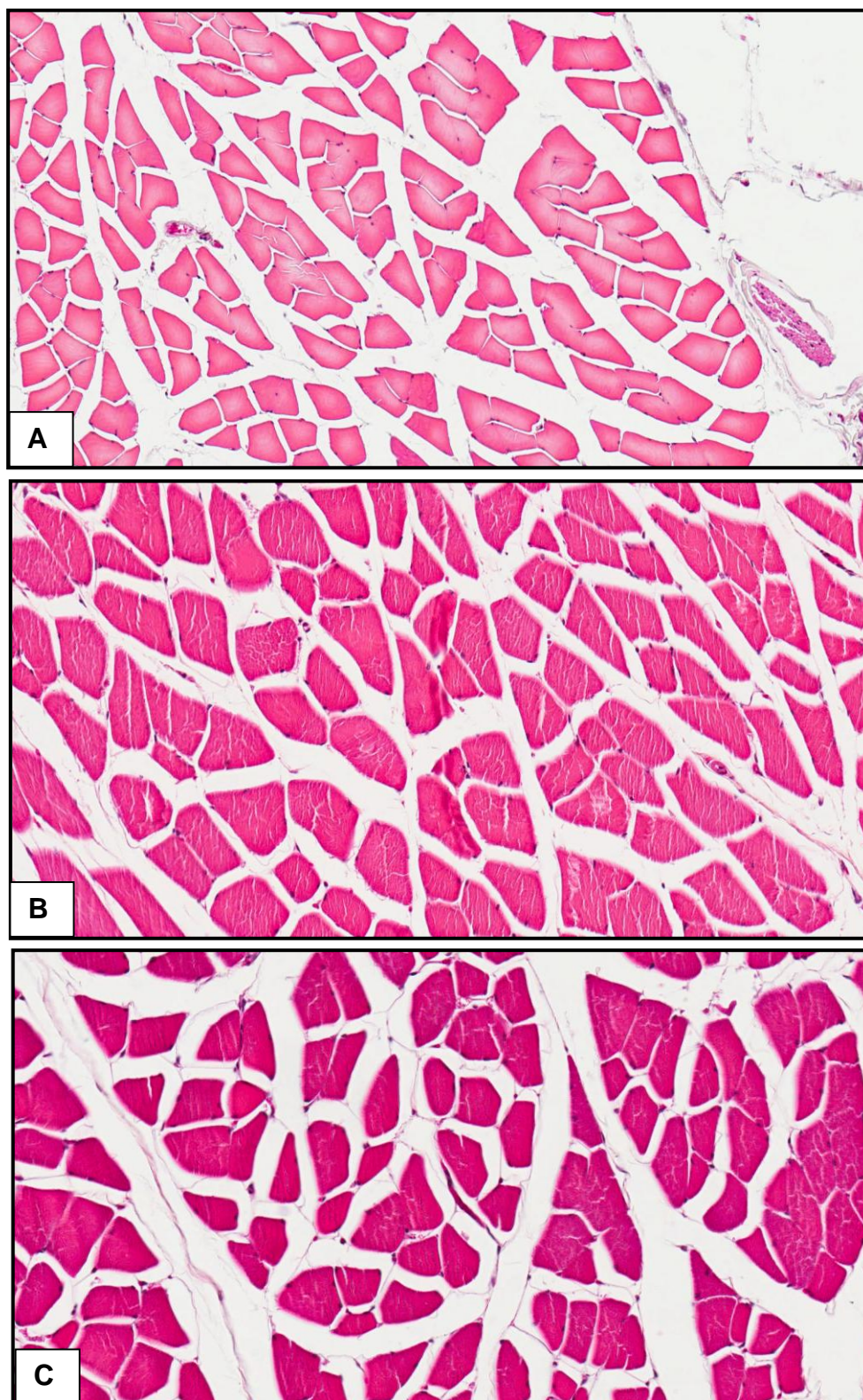


Figura 14. Fotomicrografias das fibras musculares esqueléticas dos músculos do assoalho pélvico (MAPs) de ratas Wistar. Em A, controle, Em B, eletroestimuladas por via intravaginal e em C por via intra-anal. Observar maior número de fibras musculares em A e maior diâmetro das fibras, bem como de mionúcleos em B e C. Coloração de hematoxilina e eosina (HE). Escala de 50 μ m.

4.2.3. DETERMINAÇÃO DO EFEITO DA ELETROESTIMULAÇÃO NA FÁSCIA ENDOPÉLVICA PARIETAL E VISCERAL

Os resultados, analisados pelo teste de Kruskal-Wallis seguido pelo método de Dunn para as múltiplas comparações, mostraram que os animais eletroestimulados pela via intravaginal aumentaram em 176,8% a mediana da largura da fáschia endopélvica parietal na comparação com o controle ($p=0,024$); não houve diferença entre o controle e o grupo eletroestimulado pela via intra-anal, nem tampouco entre as vias de eletroestimulação ($p>0,05$). Quanto à fáschia visceral os resultados, analisados pelo teste de ANOVA seguido pelo método de Student-Newman-Keuls, mostraram que houve aumento de 138,7% e 139,1% na média \pm DP da sua largura na comparação com o grupo controle ($p=0,0005$); não houve diferenças na largura da fáschia endopélvica visceral entre ambas as vias de eletroestimulação (Tabela 3; Figuras 15 e 16).

Tabela 3. Largura das porções parietal e visceral da fáschia endopélvica de ratas tratadas ou não com eletroestimulação por três semanas consecutivas.

N	Parâmetros morfológicos	Controle	Eletroestimulação	
			Intravaginal	Intra-anal
		Média \pm DP Mediana	Média \pm DP Mediana	Média \pm DP Mediana
1	Largura da fáschia endopélvica parietal	139,1 \pm 59,7 98,2	269,4 \pm 53,0* 271,9	244,9 \pm 58,3 234,5
2	Largura da fáschia endopélvica visceral	209,0 \pm 79,9 197,6	451,4 \pm 61,0* 460,6	499,9 \pm 115,1* 505,1

*Valores diferentes do controle ($p<0.05$).

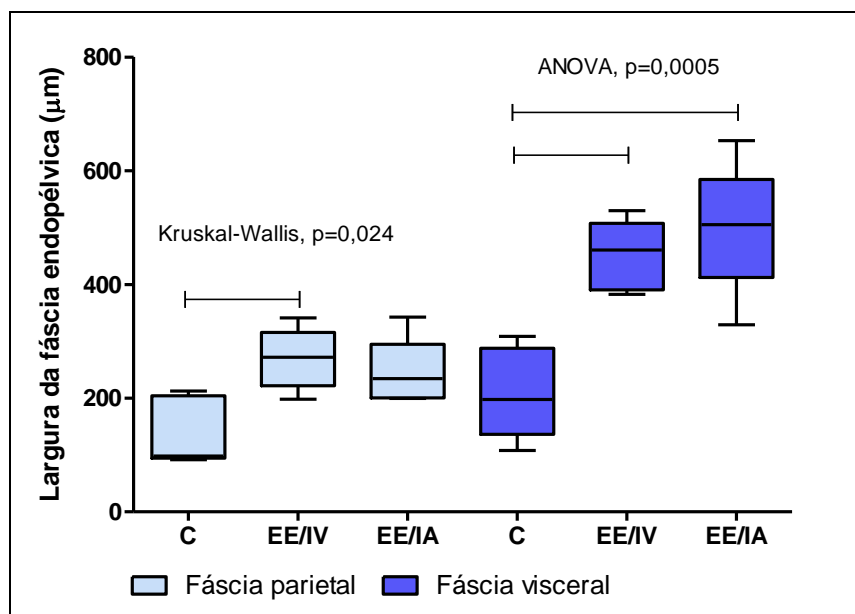


Figura 15. Dados morfométricos da fásia endopélvica. Os resultados mostraram aumento na largura das fásias parietal no grupo EE/IV e que a largura da fásia visceral foi maior para os grupos EE/IV e EE/IA na comparação com o controle. Estão mostradas as medianas, quartis, valores máximos e mínimos.

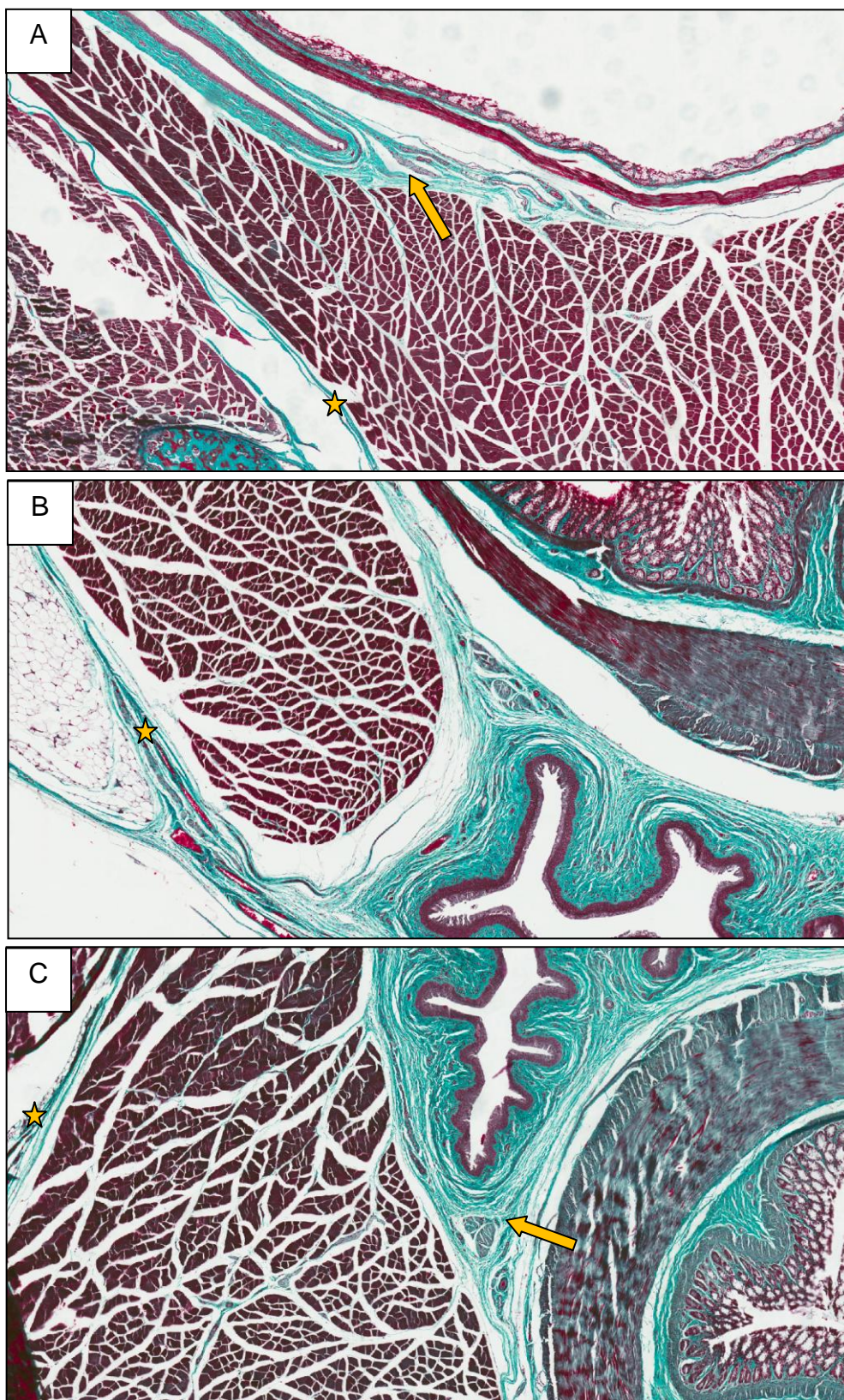


Figura 16. Fotomicrografias da pelve de ratas Wistar. Em A, controle, Em B, eletroestimuladas por via intravaginal e em C por via intra-anal. Observar maior largura da fáscia endopélvica visceral (seta) e parietal (estrela) em B e em C, na comparação com o controle A. Coloração tricrômio de Gomori. Escala de 1 mm.

4.2.4. DETERMINAÇÃO DA LARGURA DAS CAMADAS TECIDUAIS ASSOCIADAS À URETRA, VAGINA E RETO

A. URETRA

Quanto ao efeito da eletroestimulação nos tecidos associados à uretra, os resultados mostraram que na comparação com o controle, ambas as vias IV e IA, aumentaram a largura do epitélio (ANOVA, seguido pelo método de Student-Newman-Keuls, $p < 0,05$) e da camada muscular (Kruskal-Wallis seguido pelo método de Dunn, $p < 0,05$) e que a via IV aumentou a largura da camada submucosa (Kruskal-Wallis seguido pelo método de Dunn, $p < 0,05$); a via IA reduziu a largura do epitélio na comparação com a via IV (ANOVA, seguido pelo método de Student-Newman-Keuls, $p < 0,05$) (Tabela 4, Figura 17 A e 18).

Quanto ao esfíncter uretral os resultados mostraram que a via IV aumentou o diâmetro das fibras esqueléticas na comparação com o controle e com a via IA, que ambas as vias aumentaram o total de fibras lisas na comparação com o controle e que a via IA aumentou o total de fibras lisas na comparação com a via IV (ANOVA, seguido pelo método de Student-Newman-Keuls, $p < 0,0001$) (Tabela 4, Figura 17 B e 18).

Tabela 4. Largura das camadas teciduais da uretra, total de fibras musculares lisas e largura do esfíncter uretral externo de ratas tratadas ou não com eletroestimulação por três semanas consecutivas por via intravaginal e intra-anal.

N	Parâmetros morfológicos	Controle	Eletroestimulação	
			Intravaginal	Intra-anal
		<i>Média±DP</i> <i>Mediana</i>	<i>Média±DP</i> <i>Mediana</i>	<i>Média±DP</i> <i>Mediana</i>
1	Largura da camada mucosa	18,8 ± 3,6 19,6	26,1 ± 3,8* 26,1	21,9 ± 2,1* 22,1
2	Largura da camada submucosa	26,1 ± 6,2 23,2	33,7 ± 4,6* 34,1	30,6 ± 3,2 30,3
3	Largura da camada muscular lisa	81,9 ± 15,3 84,9	162,9 ± 44,0* 155,7	140,7 ± 57,6* 130,2
4	Músculo esquelético (EUE)	72,3 ± 26,9 64,8	156,1 ± 50,1* 166,0	75,9 ± 11,6 73,6
5	Total de fibras musculares lisas	201,2 ± 16,4 202,0	230,2 ± 3,6* 230,0	253,2 ± 11,7* 252,0

*Valores diferentes do controle, $p < 0,05$

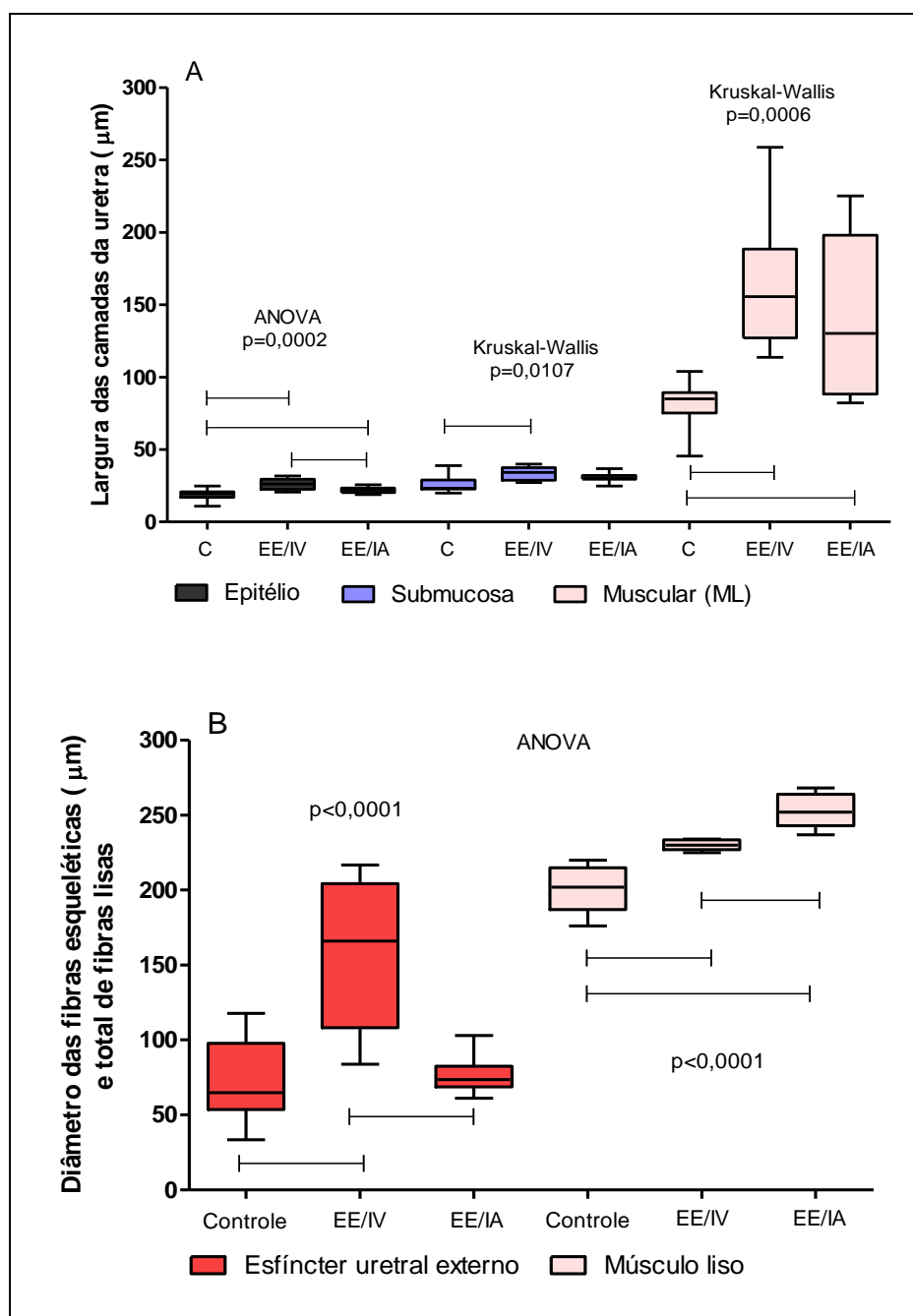


Figura 17. Dados morfométricos dos tecidos associados à uretra. Em A, largura das camadas mucosa, submucosa e muscular lisa e em B, tem-se o diâmetro das fibras do músculo esfíncter uretral externo e o total de fibras musculares lisas. Os resultados foram analisados pelos testes de ANOVA seguido pelo método de Student-Newman-Keuls (epitélio, esfíncter uretral externo e esfíncter uretral interno) ou Kruskal-Wallis seguido pelo método de Dunn para as múltiplas comparações (submucosa e muscular), sendo os grupos diferentes indicados pelas barras. Estão mostradas as medianas, quartis, valores máximos e mínimos.

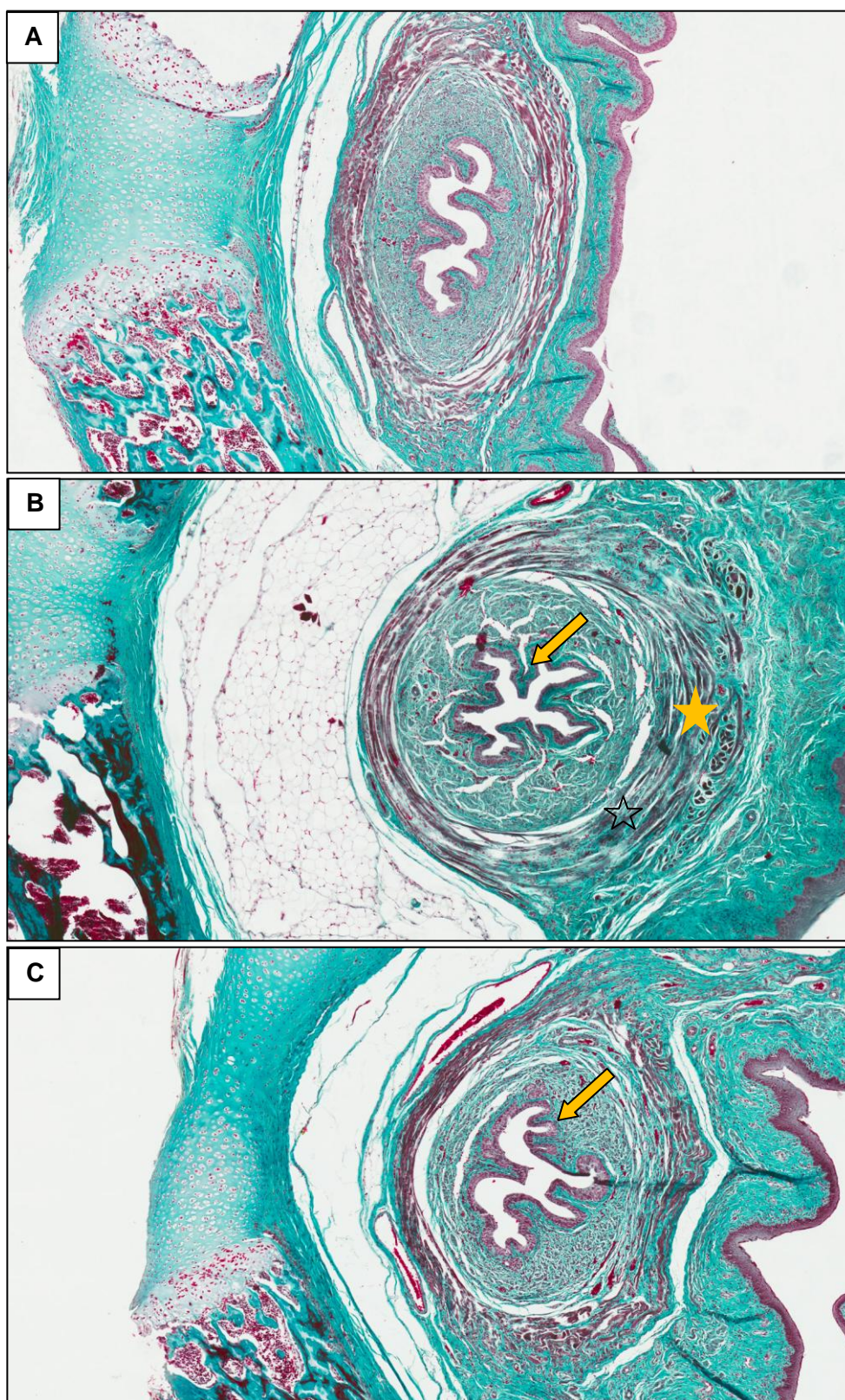


Figura 18. Fotomicrografias da uretra de ratas controle (A), eletroestimuladas pelas vias intravaginal (B) e intra-anal (C), representativas dos resultados. Observar maior largura das camadas da uretra em B e C (seta) e maior largura do EUE (estrela) em B na comparação com A e C. Coloração de tricrômio de Gomori. Escala de 500 μm .

B. VAGINA

A eletroestimulação nos tecidos associados à vagina afetou os parâmetros morfométricos da vagina. Os resultados mostraram que na comparação com o grupo controle, ambas as vias IV e IA, aumentaram a largura das camadas submucosa (Kruskal-Wallis, $p < 0,0001$) e muscular (ANOVA, $p < 0,0001$); a via IA aumentou a camada epitelial na comparação com o controle e com a via IV (ANOVA, $p < 0,0001$) (Tabela 5, Figura 19 A e 20).

Especificamente quanto ao músculo liso, os resultados mostraram que ambas as vias de eletroestimulação aumentaram o total das fibras e que a via IA causou maior número de fibras do que a via IV (ANOVA, $p < 0,0001$) (Tabela 5, Figura 19 B e 20).

Tabela 5. Largura das camadas teciduais da vagina e total de fibras musculares lisas de ratas tratadas ou não com eletroestimulação por três semanas consecutivas por via intravaginal e intra-anal.

<i>N</i>	<i>Parâmetros morfológicos</i>	<i>Controle</i>	<i>Eletroestimulação</i>	
			<i>Intravaginal</i>	<i>Intra-anal</i>
		<i>Média±DP</i> <i>Mediana</i>	<i>Média±DP</i> <i>Mediana</i>	<i>Média±DP</i> <i>Mediana</i>
1	<i>Largura da camada mucosa</i>	46,3± 8,3 46,3	41,2± 3,1 41,1	54,3± 13,2* 51,6
2	<i>Largura da camada submucosa</i>	68,4± 21,3 60,4	115,9± 11,5 117,7*	127,3±22,3 124,8*
3	<i>Largura da camada muscular lisa</i>	18,7± 5,3 18,4	56,3± 16,7* 52,4	55,5± 7,7* 53,6
5	<i>Total de fibras musculares lisas</i>	120,4± 8,4 119,0	217,8± 5,3* 219,0	262,0± 6,4* 261,0

*Valores diferentes do controle, $p < 0,05$

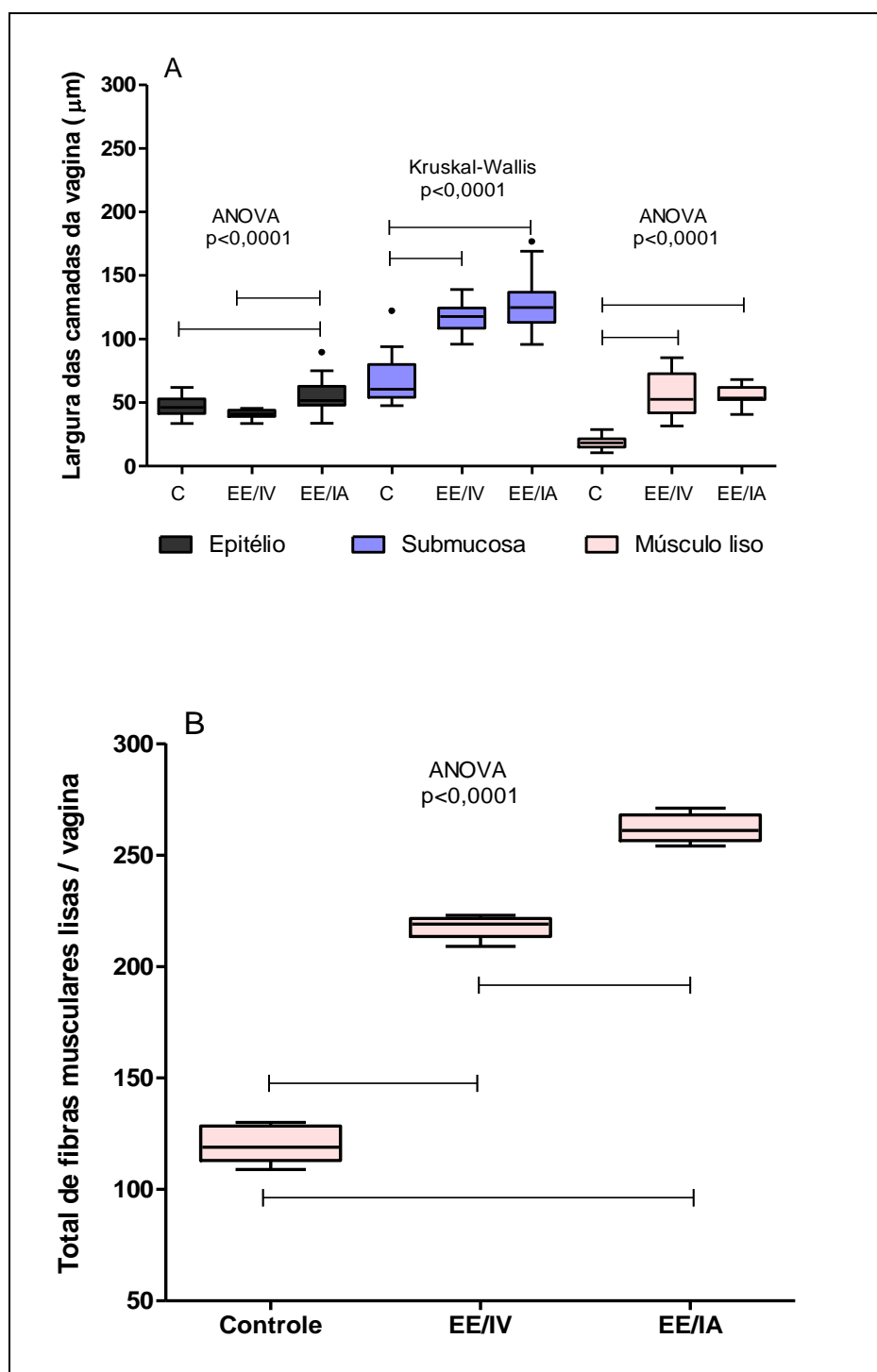


Figura 19. Dados morfométricos dos tecidos associados à vagina. Em A, largura das camadas mucosa, submucosa e muscular lisa e em B, tem-se o total das fibras musculares lisas. Os resultados foram analisados pelos testes de ANOVA seguido pelo método de Student-Newman-Keuls para o epitélio e músculo ou Kruskal-Wallis seguido pelo método de Dunn para as múltiplas comparações da camada submucosa, sendo que os grupos diferentes estão indicados pelas barras. Estão mostradas as medianas, quartis, valores máximos e mínimos.

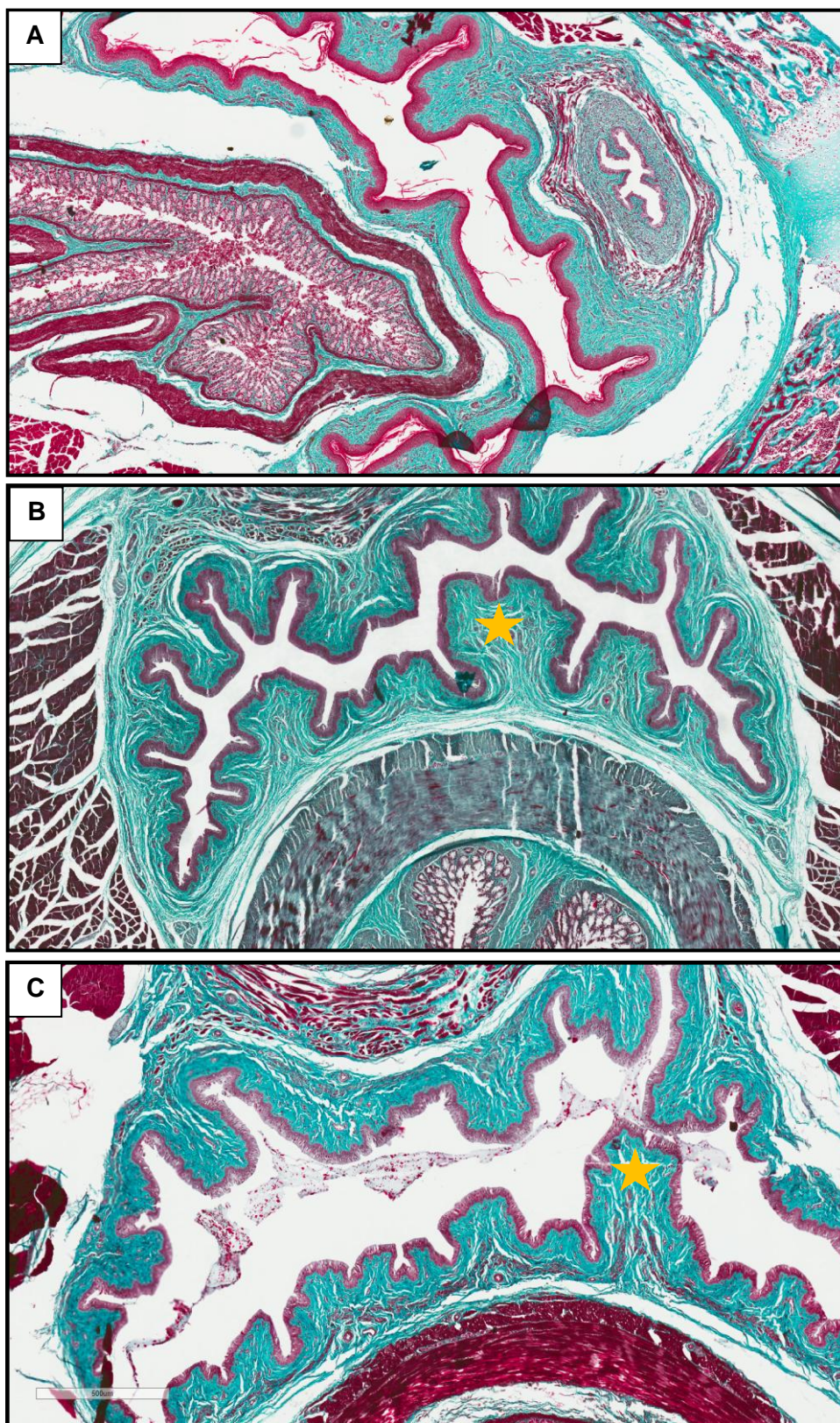


Figura 20. Fotomicrografias da vagina de ratas controle (A), eletroestimuladas via intravaginal (B) e intra-anal (C) representativas dos resultados. Observar maior largura das camadas da vagina (estrela) em B e C. Coloração de tricrômio de Gomori. Escala de 1 mm.

C. RETO

Para identificar o efeito da eletroestimulação nos tecidos do reto foram tomadas as medidas da largura das camadas mucosa, submucosa e muscular, conforme descrito anteriormente.

Os resultados mostraram que na comparação com o grupo controle os animais eletroestimulados por ambas as vias, intravaginal e intra-anal, aumentaram as larguras das camadas mucosa (Kruskal-Wallis, $p=0,0067$), submucosa (ANOVA, $p=0,0023$) e muscular (ANOVA, $p=0,0008$) (Tabela 6, Figura 21 A e 22). Semelhantemente, ambas as vias aumentaram o total de fibras musculares lisas do reto (ANOVA, $p<0,0001$) (Tabela 6, Figura 21 B e 22).

Tabela 6. Largura das camadas teciduais do reto e total de fibras musculares lisas da camada muscular de ratas tratadas ou não com eletroestimulação por três semanas consecutivas por via intravaginal e intra-anal.

N	Parâmetros morfológicos	Controle	Eletroestimulação	
			Intravaginal	Intra-anal
		Média±DP Mediana	Média±DP Mediana	Média±DP Mediana
1	Largura da camada mucosa	120.0±100.5 59.6	294,7±104,1 288,0*	252.0±87.5 281.4*
2	Largura da camada submucosa	39.6±18.5 33.9	84,3±28,1* 95,0	66.9±23.6 63.3
3	Largura da camada muscular lisa	122.1±81.9 86.7	323,7±64,8* 322,7	289.5±130.5* 263.4
5	Total de fibras musculares lisas	168,2±7,3 168,0	237,4±35,7* 237,0	268,2±15,7* 268,0

*Valores diferentes do controle, $p < 0,05$

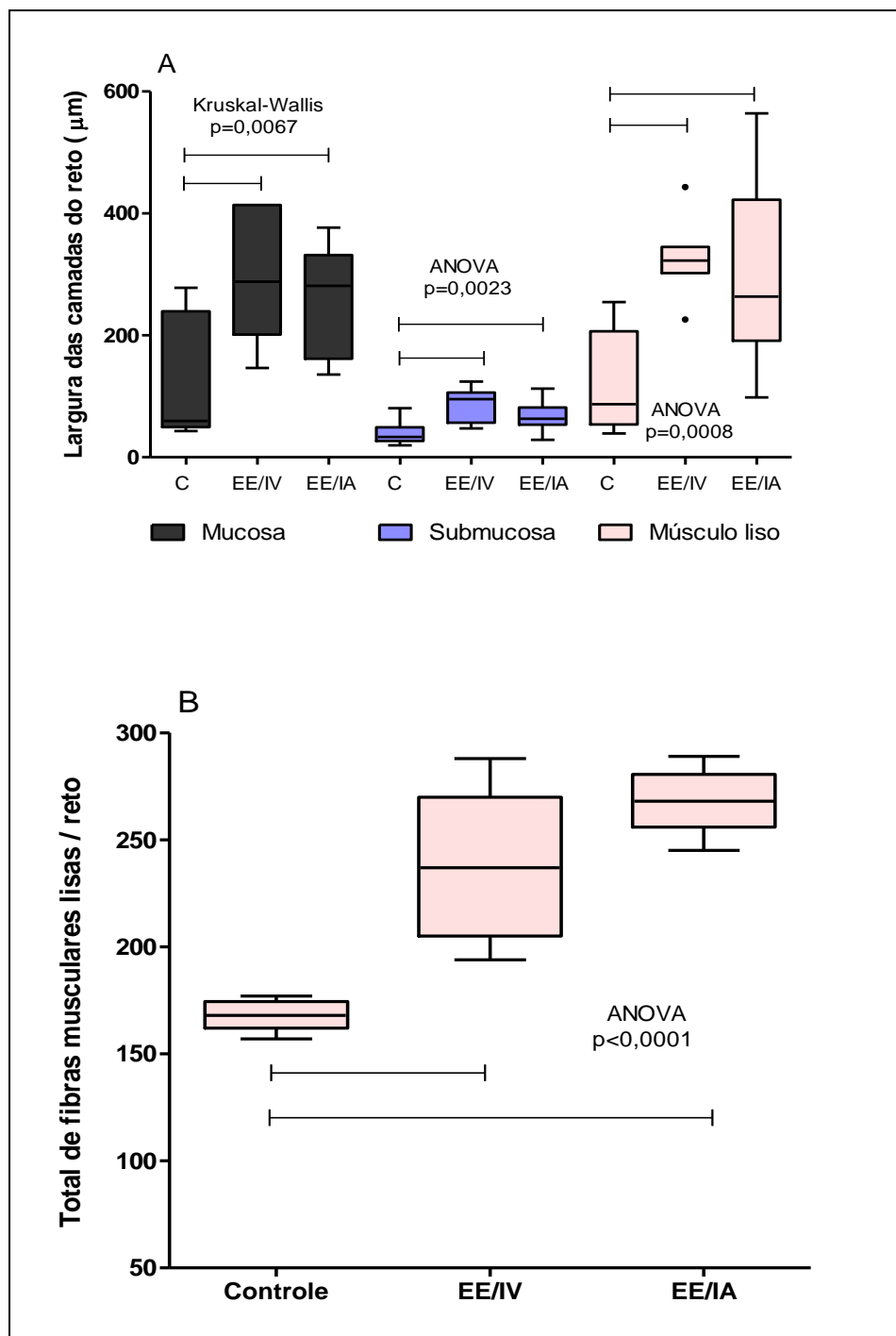


Figura 21. Dados morfométricos dos tecidos associados ao reto. Em A, largura das camadas mucosa, submucosa e muscular lisa e em B, tem-se o total de fibras musculares lisas. Os resultados foram analisados pelos testes de ANOVA seguido pelo método de Student-Newman-Keuls para as camadas submucosa e muscular e para o total de fibras lisas ou Kruskal-Wallis seguido pelo método de Dunn para a camada mucosa. Os grupos que diferem entre si estão indicados pelas barras. Estão mostradas as medianas, quartis, valores máximos e mínimos.

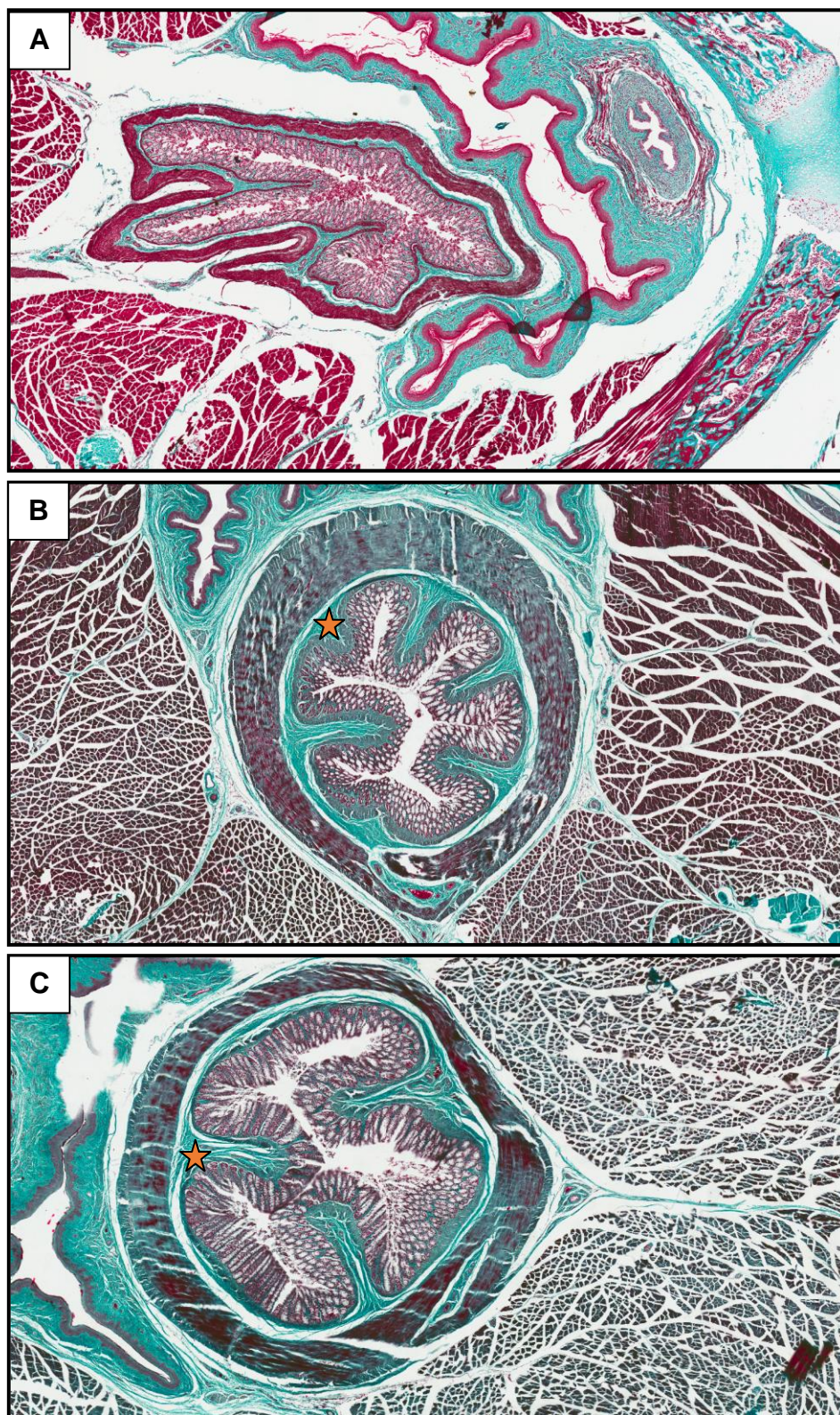


Figura 22. Fotomicrografias do reto de ratas controle (A), eletroestimuladas via intravaginal (B) e intra-anal (C) representativas dos resultados. Observar maior largura das camadas em B e C (estrela) na comparação com o controle A. Coloração de tricrômio de Gomori. Escala de 1mm.

D. Ânus

Para identificar o efeito da eletroestimulação nos tecidos associados ao ânus foram tomadas as medidas da largura das camadas mucosa, submucosa e do esfíncter anal interno, assim como o total de fibras do EAI e o diâmetro e o total das fibras esqueléticas do esfíncter anal externo, conforme descrito anteriormente.

Quando comparado ao grupo controle os resultados mostraram que ambas as vias de eletroestimulação foram capazes de aumentar a largura das camadas mucosa e submucosa na comparação com o grupo controle; também a via intra-anal aumentou a largura da submucosa na comparação com a via intravaginal (ANOVA, $p < 0,05$) (Tabela 7, Figura 23 A e 24).

Para o esfíncter anal interno foi verificada maior largura da camada para ambas as vias de eletroestimulação, na comparação com o controle, e que a via intra-anal causou maior largura dessa camada na comparação com a via intravaginal (ANOVA, $p < 0,0001$). Também, houve aumento no total de fibras lisas no grupo eletroestimulado pela via intravaginal na comparação com o controle (Kruskal-Wallis, $p < 0,0052$) (Tabela 7, Figura 23 B e 24).

Quanto ao esfíncter anal externo os resultados analisados pelo teste de ANOVA seguido pelo método de Student-Newman-Keuls para as múltiplas comparações, mostraram que ambas as vias de eletroestimulação aumentaram tanto o diâmetro ($p = 0,0008$) quanto o total das fibras ($p = 0,0002$) (Tabela 7; Figura 23 C e 25).

Tabela 7. Largura das camadas teciduais do ânus, total de fibras musculares lisas do esfíncter anal interno (EAI), diâmetro e total de fibras do esfíncter anal externo (EAE) de ratas tratadas ou não com eletroestimulação por três semanas consecutivas por via intravaginal e intra-anal.

N	Parâmetros morfológicos	Eletroestimulação		
		Controle	Intravaginal	Intra-anal
		<i>Média±DP</i> <i>Mediana</i>	<i>Média±DP</i> <i>Mediana</i>	<i>Média±DP</i> <i>Mediana</i>
1	Largura da Mucosa	86,4±36,7 74,5	113,5±14,8* 117,3	119,7±39,6* 107,3
2	Largura da Submucosa	172,2±67,3 171,0	462,8±54,0* 463,7	566,1±97,9* 525,1
3	Largura do esfíncter anal interno	338.7±45.0 338.7	468,4±42,8* 477,6	535.7±50.1* 545.5
4	Total de fibras do esfíncter anal interno	265.0±34.0 275.0	368,2± 9,8 369,0*	357.2±38.1 342.0*
5	Diâmetro das fibras do esfíncter anal externo	25.3±1.5 25.3	26,4± 1,1* 26,2	29.1±1.2* 29.0
6	Total de fibras Esfíncter anal externo	90.4±17.34 95.0	59,0± 4,3* 59,0	50.6±6.6* 50.0

*Valores diferentes do controle, $p < 0,05$

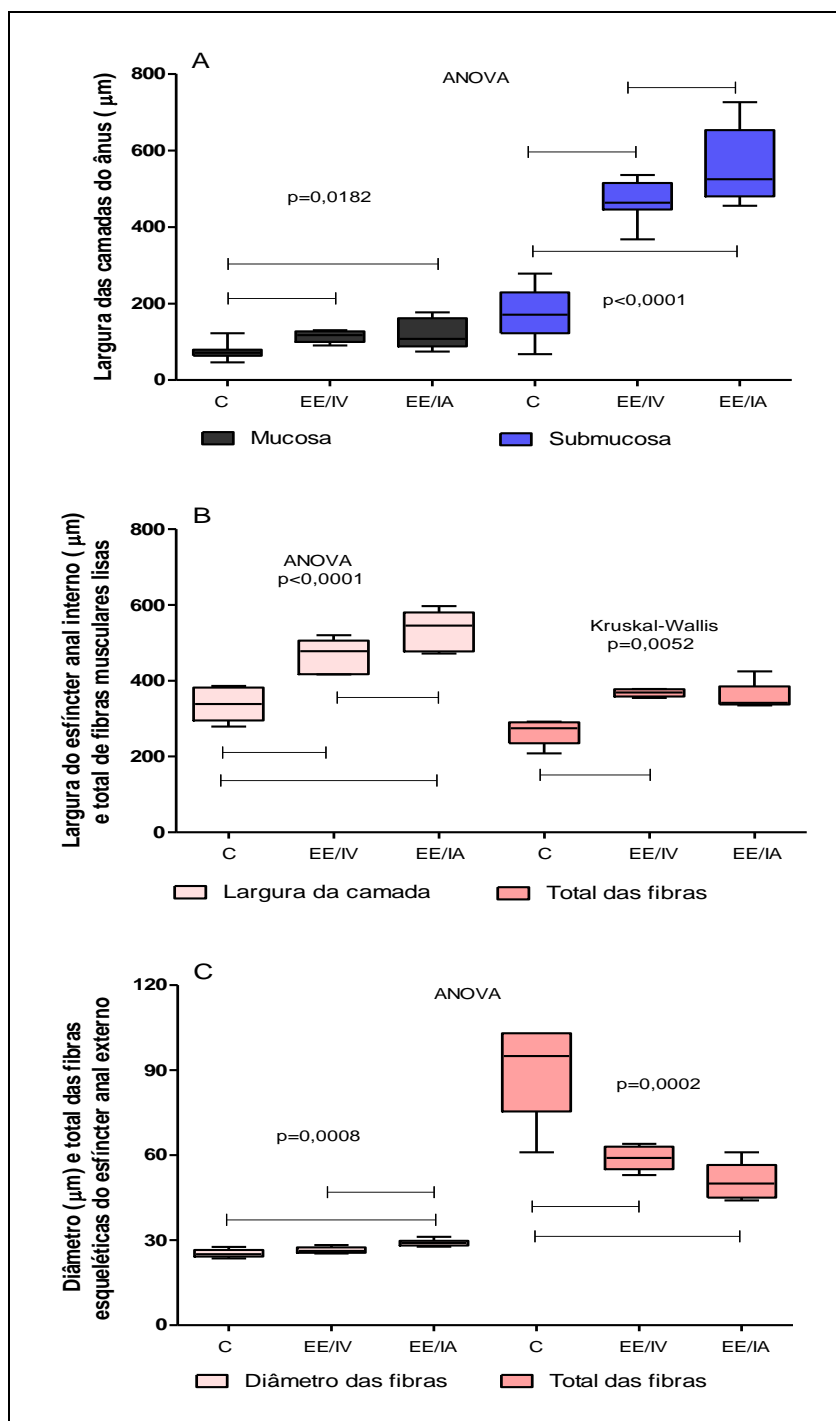


Figura 23. Dados morfométricos dos tecidos associados ao ânus. Em A, largura das camadas mucosa e submucosa, em B, tem-se a largura da camada e o total de fibras musculares lisas do esfíncter anal interno (EAI) e em C, tem-se o diâmetro e o total das fibras esqueléticas do esfíncter anal externo (EAE). Os resultados foram analisados pelos testes de ANOVA seguido pelo método de Student-Newman-Keuls para as camadas mucosa, submucosa, largura do EAI e EAE (diâmetro e total de fibras) ou Kruskal-Wallis seguido pelo método de Dunn para o total de fibras lisas do EAI. Os grupos que diferem entre si estão indicados pelas barras. Estão mostradas as medianas, quartis, valores máximos e mínimos.

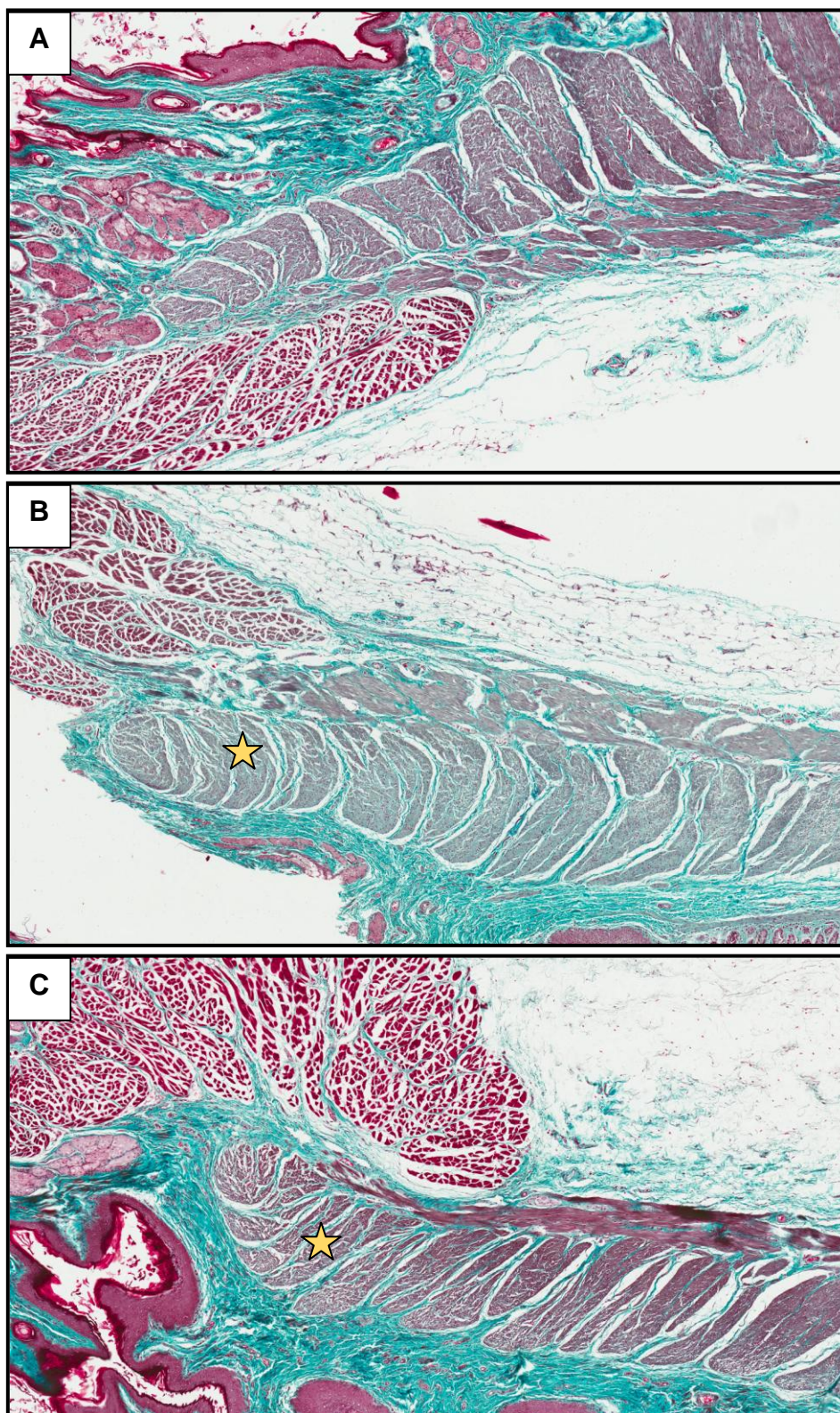


Figura 24. Fotomicrografias do ânus de ratas controle (A), eletroestimuladas via intravaginal (B) e intra-anal (C), representativas dos resultados para o esfíncter anal interno (EAI). Observar maior largura e número de fibras do EAI (estrela) em B e C na comparação com o controle A. Coloração de tricrômio de Gomori. Escala de 500 μ m.

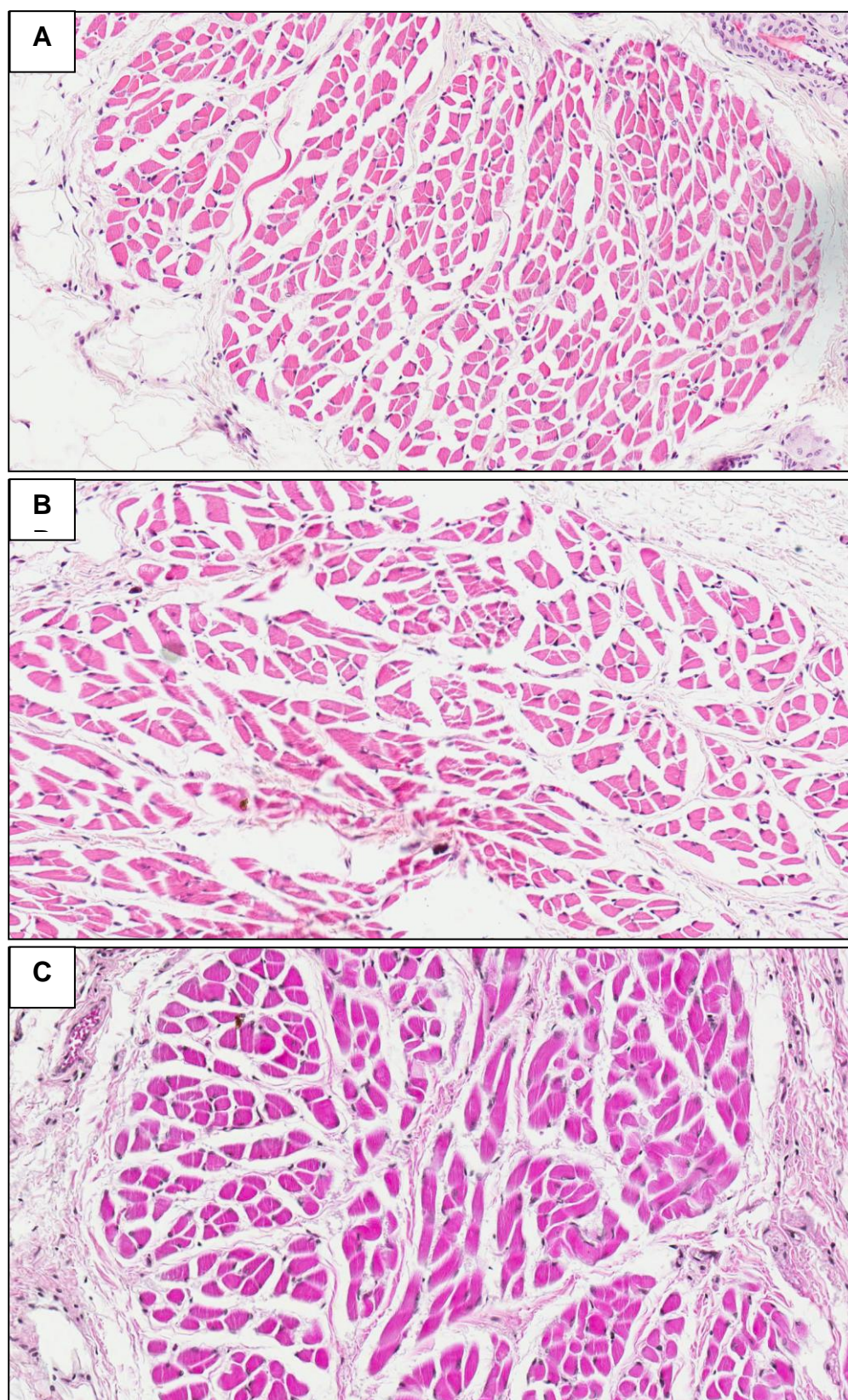


Figura 25. Fotomicrografias do esfíncter anal externo (EAE) de ratas nulíparas controle (A), eletroestimuladas via intravaginal (B) e intra-anal (C). Observar maior diâmetro das fibras musculares esqueléticas do EAE em B e C. Coloração de hematoxilina e eosina (HE). Escala de 100 μ m.

4.2.5. AVALIAÇÃO DAS CÉLULAS MIGRATÓRIAS NOS TECIDOS ASSOCIADOS AOS ÓRGÃOS DA PELVE E PERÍNEO.

Para avaliar o efeito da eletroestimulação na presença ou não de infiltrado inflamatório foram feitas análises qualitativas no tecido conjuntivo associado ao reto e ânus numa área de 200 μm^2 .

Os resultados mostraram que os tecidos associados a uretra e vagina dos grupos controle ou eletroestimulado não foram identificadas alterações morfológicas nos tecidos epitelial, conjuntivo ou muscular (liso ou esquelético) (Figura 26).

Os resultados mostraram que em ambos os seguimentos (reto e ânus) dos grupos controle ou eletroestimulado não foram identificadas alterações morfológicas nos tecidos epitelial, conjuntivo ou muscular (liso ou esquelético) (Figura 23). Os resultados das análises histopatológicas mostraram ausência de infiltrado inflamatório para uretra e vagina, mas para os seguimentos retal e anal foi encontrado na mucosa um leve infiltrado inflamatório composto por eosinófilos, linfócitos e macrófagos nos animais eletroestimulados quando comparado ao controle (Figura 27).

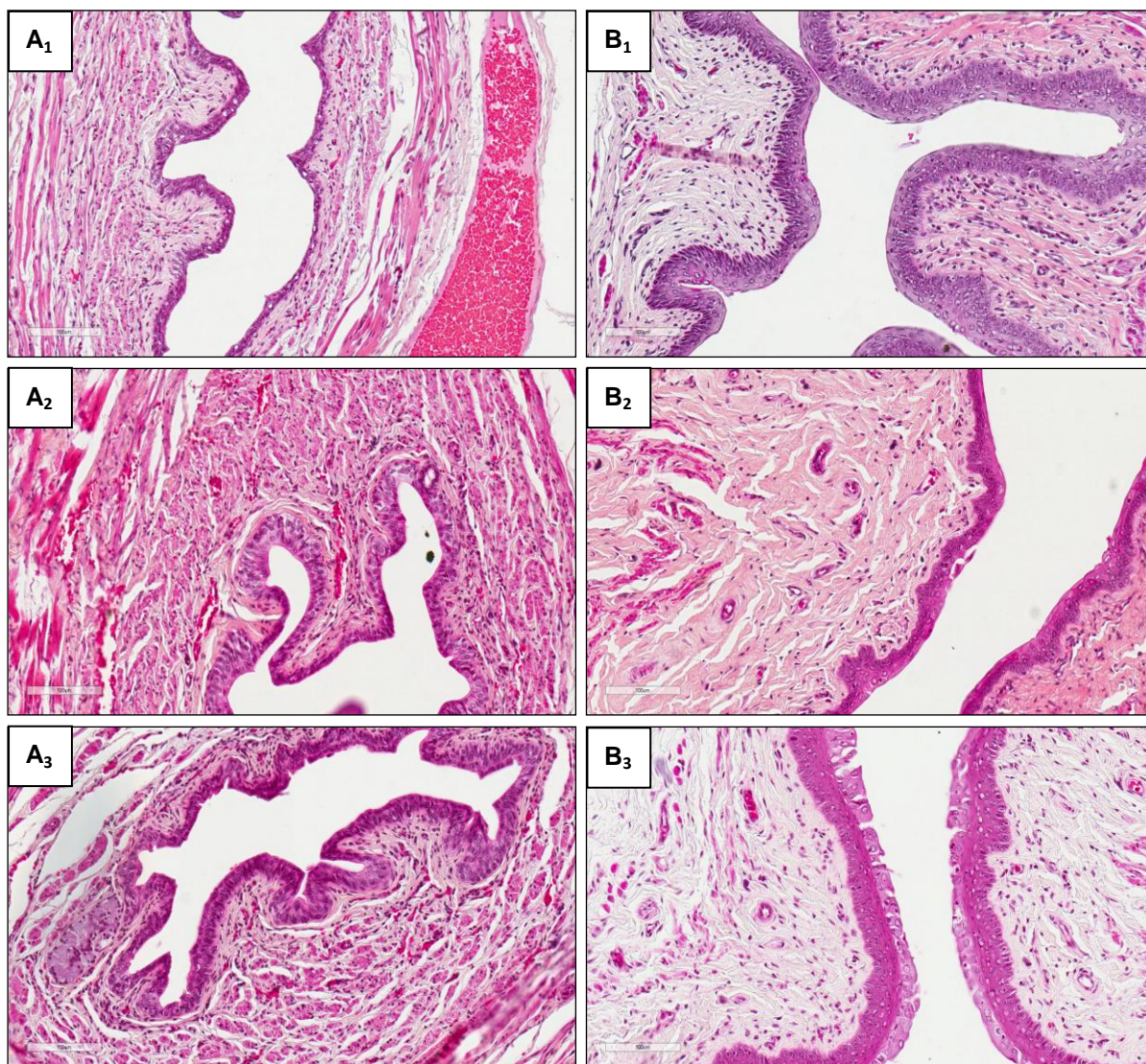


Figura 26. Fotomicrografias de seções histológicas da uretra (A) e da vagina (B) representativas dos resultados obtidos para os grupos controle (A₁, B₁), eletroestimulado pela via intravaginal (A₂, B₂) e eletroestimulado pela via intravaginal (A₃, B₃). Observar ausência de alterações morfológicas nos tecidos epitelial, conjuntivo ou muscular (liso ou esquelético) nos animais eletroestimulados na comparação com o controle. Coloração Hematoxilina e Eosina. Escala de 100 µm.

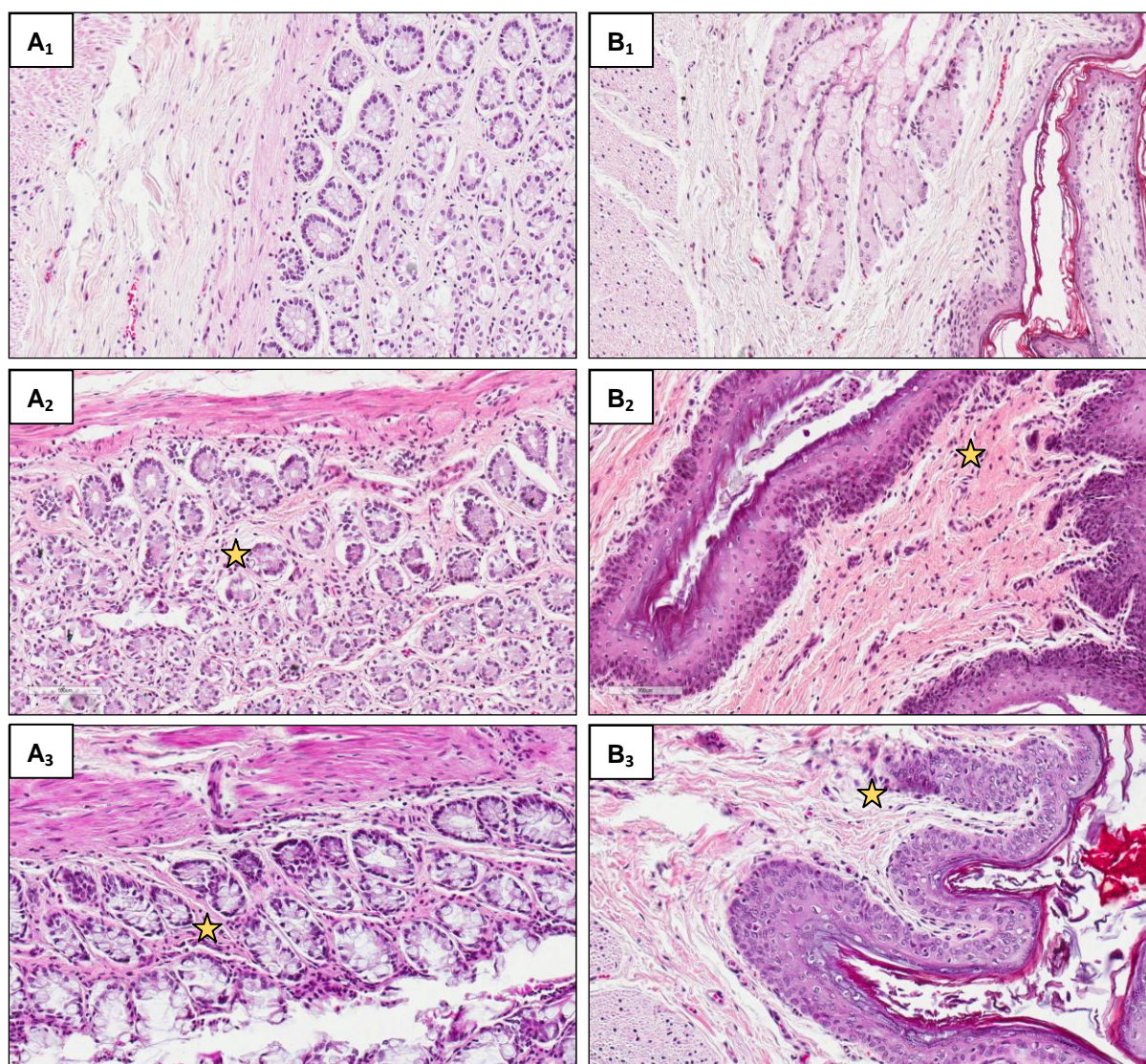


Figure 27. Fotomicrografias de seções histológicas do reto (A) e do ânus (B) representativas dos resultados obtidos para os grupos controle (A₁, B₁), eletroestimulado pela via intravaginal (A₂, B₂) e eletroestimulado pela via intra-anal (A₃, B₃). Observar leve infiltrado inflamatório (estrelas) composto por eosinófilos, linfócitos e macrófagos nos animais eletroestimulados quando comparado ao controle. Coloração Hematoxilina e Eosina. Escala de 100µm.

4.3. SUMÁRIO DOS RESULTADOS

Para uma melhor visualização dos resultados, nas tabelas 8 e 9 estão sintetizados os parâmetros morfológicos estudados de animais eletroestimulados pelas vias intravaginal ou intra-anal, na comparação com os animais do grupo controle.

Tabela 8. Parâmetros morfológicos avaliados dos animais eletroestimulados por via intravaginal; os valores representam as modificações na comparação com o grupo controle.

N	Parâmetros	Eletroestimulação intravaginal									
		% de aumento ou redução nos parâmetros avaliados									
		MAPs	Uretra	EUE	Vagina	Reto	Ânus	EAI	EAE	FEP parietal	FEP visceral
1	Largura da mucosa		↑38,8		↓10,0	↑383,2	↑31,4				
2	Largura da submucosa		↑46,5		↑95,0	↑112,8	↑168,8				
3	Largura muscular		↑98,9	↑116,2	↑180,6	↑165,1		↑38,3			
4	Diâmetro das fibras estriadas	↑25,2							↑4,3		
5	Total de fibras estriadas	↓34,1							↓37,8		
6	Total de mionúcleos	↑33,3									
7	Total de fibras lisas		↑14,4		↑80,8	↑41,1		↑38,9			
8	Largura da camada									↑176,8	↑115,9

Tabela 9. Parâmetros morfológicos avaliados dos animais eletroestimulados por via intra-anal; os valores representam as modificações na comparação com o grupo controle.

N	Parâmetros	Eletroestimulação intra-anal									
		% de aumento ou redução nos parâmetros avaliados									
		MAPs	Uretra	EUE	Vagina	Reto	Ânus	EAI	EAE	FEP parietal	FEP visceral
1	Largura da mucosa		↑16,4		↑12,6	↑372,1	↑38,5				
2	Largura da submucosa		↑30,6		↑106,6	↑68,9	↑228,7				
3	Largura muscular		↑53,5	↑4,0	↑197,8	↑137,1		↑58,2			
4	Diâmetro das fibras estriadas	↑18,3							↑15,0		
5	Total de fibras estriadas	↓29,4							↓44,0		
6	Total de mionúcleos	↑33,3									
7	Total de fibras lisas		↑25,8		↑116,7	↑59,4		↑34,8			
8	Largura da camada									↑138,7	↑139,1

5.1. CONSIDERAÇÕES SOBRE O DESENVOLVIMENTO DA SONDA ADAPTADA AO ELETROESTIMULADOR DUALPEX® 961 E DO MANÔMETRO ANAL.

A eletroestimulação, da pelve e períneo, é comumente indicada para afecções do assoalho pélvico. Apesar de ser amplamente utilizada no tratamento conservador para queixas de incontinência urinária e fecal, ainda permanecem dúvidas quanto ao efeito histofuncional da corrente elétrica nos tecidos que compõem os órgãos pélvicos e perineais. Acreditamos que uma das razões para existirem poucos conhecimentos publicados dos efeitos da eletroestimulação pélvica, venha da dificuldade para encontrar equipamentos que se ajustem ao tamanho e especificidades dos animais de laboratório, como ratos por exemplo, e assim simular as condições aplicadas no ambiente clínico.

Durante a elaboração da presente pesquisa, enxergamos a lacuna no conhecimento a respeito de discussões mais profundas a respeito das modificações celulares induzidas pela eletroestimulação pélvica nos tecidos epitelial, conjuntivo, muscular e nervoso. Além disso, observou-se que não há um consenso sobre a eletroestimulação neuromuscular promover aumento na força dos músculos da pelve e períneo. Exposto o problema da escassez de estudos publicados nas bases de dados, em relação aos temas anteriormente informados, decidimos responder as perguntas levantadas durante a revisão da literatura. Ocorre que ao checar se havia algum fabricante no Brasil ou fora do país que vendesse algum modelo de eletroestimulador e manômetro adaptados as dimensões do canal vaginal e anal de ratas Wistar de 12 meses, nos deparamos com a inexistência desse tipo de equipamento para ser comercializado no mercado. Ao encontrarmos uma empresa norte americana que não tinha os produtos, mas poderia estudar a possibilidade de customizar os aparelhos a nossa necessidade, vimos que ficaria muito dispendioso todo o projeto, além de correr o risco do eletroestimulador não atender as especificidades requeridas para o projeto, que eram: 1) Possuir sondas vaginal e anal adaptadas a ratas Wistar com 12 meses de idade; 2) Sonda de eletroestimulação com pelo menos dois eletrodos intercalados ao longo do seu eixo, para garantir variação na polaridade da

corrente, ora negativa em um dos polos, ora positiva no outro, de maneira alternada; 3) Aparelho gerador de corrente elétrica microprocessada, semelhante aos que são utilizados nos humanos, com a possibilidade de ajustar a largura de pulso, a frequência, a intensidade e o tempo de corrente elétrica, bem como o tempo de passagem de corrente, inclusive com tempo de subida e descida da corrente.

A partir das dificuldades acima relatadas tomou-se a decisão de empreender com o projeto de adaptação de uma sonda de eletroestimulação a um aparelho bem conhecido e amplamente utilizado no ambiente clínico do Brasil, com o intuito de reproduzir nos animais as mesmas condições que as/os pacientes submetidas(os) à eletroterapia recebem, e também diminuir muito com os custos de elaboração de um eletroestimulador e sonda. Conforme exposto nos resultados, logramos total êxito nesta etapa, uma vez que os testes de comparação de amplitude efetiva de corrente entre as sondas do Dualpex® 961 e da sonda elaborada para a nossa pesquisa não mostraram diferença com significância estatística, o que apontou para uma similaridade na transmissão da corrente, e por consequência, nas propriedades eletrofisiológicas mediadas pela interação máquina-homem.

Cabe destacar que durante todo o processo de eletroestimulação dos animais, não foi observada nenhuma intercorrência adversa que inviabilizasse alguma sessão de eletroterapia, tanto com a sonda como com os animais. As sondas de maneira geral não precisaram ser substituídas durante as sessões de eletroestimulação. A cada sessão eram realizados testes de passagem de corrente nos animais. Era investigado se ocorria uma contração efetiva dos músculos da pelve e períneo nas ratas, por meio da movimentação da cauda do animal e da adução dos membros inferiores. Os eventos acima descritos serviam de parâmetro para demonstrar a efetividade da sonda em transmitir a corrente para os animais, e com isso garantir os efeitos histofuncionais esperados.

Quanto à segurança elétrica do Dualpex 961 e conforme o manual do aparelho, ele é classificado como classe III pelo INMETRO pelo fato de não possuir partes aplicadas e ser duplamente isolado, não oferecendo assim, risco de choque

elétrico ao animal. Ressalta-se que para melhorar, ainda mais, a segurança elétrica foi utilizado a alimentação do sistema por meio de pilhas alcalinas, para diminuir o risco de choque elétrico nos animais.

A semelhança do que foi reportado anteriormente, quanto as dificuldades encontradas na tarefa de obter um aparelho e sonda de eletroestimulação adaptado as dimensões do canal anal de ratas Wistar, o mesmo problema foi encontrado em relação à manometria anal. Dessa maneira, buscou-se por meio de revisão da literatura identificar valores da pressão intra-anal registrado com manômetros anais em ratos. Em posse de alguns trabalhos publicados (Wyndaele & Poortmans 2006; Zutshi et al. 2009), procedeu-se a fase de elaboração do manômetro e da sonda intra-anal, ora seguindo recomendações sugeridas nos trabalhos usados como referência, ora criando novos elementos para se adequarem as características exigidas para a pesquisa. Após a elaboração e montagem do manômetro, realizou-se os testes para calibração e segurança do aparelho. Em seguida, executou-se testes nos animais, que revelaram a normalidade das conexões do aparelho e da sonda, dentro e fora da cavidade anal dos animais.

De modo geral os animais não demonstraram, quaisquer mudanças nos comportamentos alimentares, sociais e biológicos após investigação via monometria intra-anal. Deste modo, o manômetro elaborado para esta pesquisa, atendeu as necessidades esperadas e permitiu que avaliássemos os dados funcionais de força dos músculos da pelve e períneo, conforme será mostrado no decorrer da discussão.

5.2. CONSIDERAÇÕES SOBRE AS ADAPTAÇÕES DA SONDA DO ELETROESTIMULADOR E SOBRE A APLICAÇÃO DA ELETROTERRAPIA

De acordo com o que foi relatado na metodologia, optamos por adotar a contenção manual dos animais durante as sessões de eletroestimulação e registro de força dos músculos da pelve e períneo, com o intuito de não submeter o animal à toxicidade com o uso de sedativos de maneira crônica, já que durante cinco dias por semana, pelo período de três semanas consecutivas, submeteríamos os

animais ao processo de sedação. Essa decisão foi devidamente aprovada pelo Comitê de Experimentação e Uso de Animais do Centro Universitário de Brasília, o qual designou um médico veterinário para supervisionar as sessões de eletroestimulação e os registros manométricos de força, bem como o processo de eutanásia ao final do estudo. Ressalta-se que os estudos até o momento publicados na literatura (Wyndaele & Poortmans 2006; Zutshi et al. 2009; Camargo et al. 2013), não adotaram essa metodologia que criamos para esta pesquisa. Os outros autores optaram por sedar os animais durante as sessões de eletroestimulação/manometria. Pelo que notamos, os animais adaptaram-se bem ao longo do experimento, pois não manifestaram episódios de erição de pêlos, produção de ruídos típicos de desconforto, enrijecimento do corpo, tentativas de mordedura a sonda e aos pesquisadores, modificação no comportamento alimentar, social e das necessidades fisiológicas no curso do estudo.

Diante dos fatos narrados acima, percebe-se que nosso estudo contribuiu para adaptar uma sonda de eletroestimulação intra-anal e intravaginal as dimensões de ratas Wistar de 12 meses, o que tornou possível testar o efeito, nos tecidos de pelve e períneo, do eletroestimulador mais utilizado no ambiente clínico Brasileiro, e com isso enxergar possíveis translações dos achados ocorridos nos animais para os seres humanos. Além disso, permitiu também a confecção de um manômetro adaptado as dimensões de ratas Wistar de 12 meses.

Conforme será demonstrado no decorrer da discussão, existem semelhanças histofuncionais nos tecidos de pelve e períneo de ratas com os seres humanos (Alperin et al. 2014). Dessa forma, ao investigarmos o efeito da eletroestimulação nos tecidos pélvicos e ao monitorarmos, concomitantemente, a atividade muscular pressórica intra-anal com o animal consciente, possibilitamos avanços no conhecimento acerca dos ajustes nos parâmetros utilizados na eletroestimulação dessa região e, com isso, aprimorar as condutas eletroterapêuticas para as diferentes necessidades clínicas, seja para a manutenção e aumento do condicionamento dos músculos do assoalho pélvico, seja para tratamento das incontinências e prolapsos de órgãos.

Ficou também demonstrado, que nosso experimento inovou no âmbito da manipulação do animal durante procedimento de eletroestimulação e manometria, já que até o nosso experimento, os pesquisadores só conheciam relatos de experimento com o uso de eletroestimulador e manometria intracavitária, sedando o animal, sessão após sessão. Procedimento este que foi substituído pela contenção manual, o que permitiu acompanhar as reações fisiológicas e comportamentais do animal durante a eletroestimulação e a manometria.

5.3. CONSIDERAÇÕES SOBRE MANOMETRIA E A FORÇA DOS MÚSCULOS DO ASSOALHO PÉLVICO

A quantidade máxima de força que um músculo ou grupo muscular pode provocar em um determinado padrão de movimento e em uma determinada velocidade é denominada como força muscular (Nolasco et al. 2008). O grau de força muscular dos MAPs pode ser mensurado pela perineometria, que consiste em um dispositivo sensível à pressão, que permite a observação do registro de força de pressão dos músculos estriados da pelve e períneo (Barbosa et al. 2005; Pinheiro et al. 2012).

Sabe-se que os acontecimentos durante a vida da mulher, como a gravidez, o parto, o sobrepeso, a menopausa e o envelhecimento acabam afetando a força dos MAPs e de outras estruturas que dão apoio aos órgãos pélvicos, como a fáscia endopélvica (Franceschet et al. 2009). Mørkved et al. (2004), demonstraram que existe diferença na espessura e na força de pressão muscular dos MAPs em mulheres nulíparas continentas e com incontinência, o que reforça a tese de que a diminuição da força dos MAPs configura em fator de risco para as disfunções do assoalho pélvico.

A Fisioterapia Pélvica objetiva prevenir e tratar alterações funcionais da pelve e períneo. Para esse fim, utiliza-se de recursos terapêuticos como a cinesioterapia, eletroterapia, mecanoterapia, fototerapia e massoterapia (Souza et al. 2009; Knorst et al. 2012).

A eletroestimulação é um dos recursos indicados para promover restauração das funções contráteis de músculos que estejam em estado de

hipotonia e diminuição de força, como no caso de incontinência urinária de esforço, flatos vaginais e incontinência fecal. Geralmente, o fisioterapeuta ao eleger a eletroestimulação neuromuscular, tem como intuito otimizar as contrações dos MAPs e do EAE ou aumentar a força dos referidos músculos. Embora os fisioterapeutas clínicos saibam dessas possibilidades que a eletroestimulação propicia, não é incomum ouvir de muitos deles a seguinte expressão - "não acredito que a eletroestimulação induza hipertrofia e ganho de força muscular". Dessa forma, ignoram achados reportados na literatura que atestam sobre a hipertrofia e aumento de força dos MAPs (Wyndaele & Poortmans 2006).

No tocante a manometria dos músculos da pelve e períneo, antes e após a eletroestimulação, nossos resultados apontaram que o uso da corrente elétrica induziu expressivo aumento, de 4,7 vezes, na força de pressão intra-anal. Pelo que corrobora com os achados de Franco et al. (2011), Watson (2000) e Knorst et al. (2012), que observaram aumento da força muscular e percepção da qualidade de vida, bem como redução das queixas relacionadas a perda de urinária, fezes e gases, dor pélvica e prolapso de órgãos pélvico de grau leve, após reabilitação por exercícios, eletroestimulação e biofeedback. Esses achados, revelam que há relação entre aumento da força de MAPs e melhora de marcadores funcionais do pavimento pélvico. Nesse sentido, as adaptações morfológicas observadas no presente estudo, podem culminar em aumento na capacidade de exercer pressão de fechamento nos óstios uretral, vaginal e anal, além de favorecer maior capacidade do assoalho pélvico em resistir forças de tensão e compressão pelos aumentos súbitos na cavidade abdominopélvica. Assim sendo, nossos resultados também ratificam os achado de Wyndaele & Poortmans (2006), que observaram após eletroestimulação aumento na pressão retal, o que favorece a recomendação de exercícios (Hay-Smith et al. 2008; Hay-Smith et al. 2011) para fortalecimento dos músculos do diafragma pélvico e urogenital, uma vez que o aumento da força de contração de tais músculos configuram como fator de proteção para IUE, IA e POP, e acreditamos também, para as demais disfunções musculares do assoalho pélvico.

5.4. ASPECTOS TRANSLACIONAIS DO EFEITO DA ELETROESTIMULAÇÃO SOBRE A FORÇA DOS MÚSCULOS DO ASSOALHO PÉLVICO

Considerando que três a cada dez mulheres, entre 40 a 79 anos, com uma a três paridade, irão apresentar algumas disfunções pélvica (Nygaard et al. 2008), faz-se necessário pensar em formas de minimizar as sobrecargas que o pavimento pélvico fisiologicamente será submetido durante a vida. Nesse sentido, terapêuticas conservadoras como exercícios do assoalho pélvico e a eletroestimulação que possuem como objetivo o fortalecimento dos músculos da região da pelve e períneo, são ótimas ferramentas para o enfrentamento das disfunções dos MAPs e esfíncteres anal e uretral (Castro et al. 2008; Rett et al. 2007). Dessa maneira, a promoção de programas de fortalecimento dos músculos da pelve e períneo devem ser incentivadas como políticas públicas para a prevenção das disfunções do pavimento pélvico.

Conforme ficou demonstrado no nosso estudo, a eletroestimulação aumentou a força de pressão muscular da pelve períneo em quatro vezes em relação a pressão basal. Isto posto, percebe-se que esse recurso terapêutico contribui para o objetivo de fortalecimento dos músculos dessa região, o que favorece o papel dos MAPs em estabilizar os órgãos pélvicos, evitando o aumento da tensão sobre os ligamentos cardinais uterinos. Dessa maneira, observa-se que se os MAPs forem mais condicionados e mais fortes, eles cumprirão melhor com a tarefa de resistir aos aumentos súbitos da pressão intra-abdominal, o que terá como resultante uma contra força a rotação da parede da vagina no sentido posterior, o que contribui para evitar os POPs, e diminuição da tensão na fáscia endopélvica (Chen et al. 2006, Ashton-Miller & DeLancey 2009). Desse modo, é notável que o aumento da força dos MAPs traz consigo benefícios, que ao nosso ver, são poucos discutidos na literatura. Assim, constatações como as encontradas no presente estudo, reforçam a tese de que a manutenção e o aumento da força dos MAPs, são um fator de proteção para as disfunções dos órgãos pélvicos.

5.5. CONSIDERAÇÕES SOBRE O EFEITO DA ELETROESTIMULAÇÃO NOS TECIDOS DA PELVE E PERÍNEO

Os tecidos corporais são, fisiologicamente, expostos a quatro tipos de forças, a de compressão, tensão, cisalhamento e torção. A combinação dessas forças compõe a chamada propriedade viscoelástica dos tecidos (Nordin & Frankel 2003). Tal propriedade, permite aos tecidos biológicos armazenarem e liberarem energia mecânica, sem que haja ruptura da continuidade tecidual e, por consequência, da sua estabilidade (Mchugh et al.1992; Durigon 1995; Rosário et al. 2004). Os fatores tempo e carga são os principais responsáveis pelas modificações nos tecidos. Quando essas adaptações são benéficas, recebem o nome de efeito plástico, quando deletéria, recebem o nome de deformação/falha tecidual, sendo essa última a responsável pelos processos de ruptura no tecido, bem como sua instabilidade (Mchugh et al.1992; Durigon 1995; Rosário et al. 2004).

Conforme abordado acima, aos tecidos biológicos são impostas cargas a todo instante, variando de acordo com a atividade exercida no momento. Em sendo assim, no que tange às estruturas do assoalho pélvico, sabe-se que diversas forças incidem sobre essa região. Processos fisiológicos como a respiração, tosse, evacuação (manobra de valsalva), riso, levantamento e mobilização de cargas, mudanças de posturas (deitado, sentado, em pé) e suas variações, exercem força sobre o pavimento pélvico, impondo-o a tensões e compressões (Morgan et al. 2005). Para além disso, existem as modificações decorrentes do processo de envelhecimento, gestações, mecanismos de parto, cirurgias abdominopélvicas, entre outras que podem contribuir para alterações no equilíbrio de estabilização dos tecidos pélvicos (DeLancey et al. 2007). Tanto que a literatura aponta a idade, obesidade, paridade, tipos e parto, peso do recém-nascido, menopausa, cirurgias ginecológicas, constipação intestinal, fatores hereditários, tabagismo e sedentarismo como os principais fatores de risco para disfunções da continência e sustentação dos órgãos pélvicos (Torrise et al. 2012). Existem evidências que tais eventos sejam capazes de modificar o parênquima e o estroma das estruturas da pelve e períneo (Seratii et al. 2008). Dentre esses fatores, destacam-se o número e tipos de partos, bem como o peso do recém-nascido (Seratii et al. 2008).

Posto todos os fatos narrados acima e considerando as principais variáveis apresentadas como fatores de risco para disfunção pélvica, nossa pesquisa observou que a eletroestimulação induz ganhos estruturais nos tecidos que compõem a uretra, vagina, reto, ânus e MAPs.

A. EFEITO DA ELETROESTIMULAÇÃO NOS MÚSCULOS DO ASSOALHO PÉLVICO

Após trinta sessões de eletroestimulação por via intravaginal e intra-anal, foi possível observar hipertrofia das fibras musculares dos MAPs. Ambas as vias foram capazes de induzir aumento dos mionúcleos e do diâmetro médio do músculo, bem como redução do número de fibras musculares dos MAP's contadas por campo microscópico. Não foram observados sinais de alterações musculares, como hemorragia, degeneração e necrose nos MAP's, o que demonstra que a EE, dentro dos parâmetros utilizados no estudo, não promove danos ao tecido muscular do assoalho pélvico.

Apesar de os mecanismos celulares para hipertrofia muscular ainda permanecerem sem uma elucidação completa, entende-se que a eletroestimulação induza o aumento da área de secção transversa muscular, em função da resposta de processos adaptativos celulares como aumento da síntese proteica, aumento do número e tamanho das miofibrilas, assim como a adição de sarcômeros no interior da fibra muscular (Petrella et al. 2008). Para que tais eventos ocorram, faz-se necessário que as vias reguladoras da síntese proteica sejam ativadas. Estudos (Hitachi & Tsuchida 2014) indicam que a principal via responsável pela hipertrofia muscular, estriada esquelética e lisa, seja a IGF-1 (insulin-like growth factor-1). Mackey et al. (2011) verificaram que a eletroestimulação (60Hz, 300ms, 27mA a 54mA) foi capaz de induzir o aumento dos fatores de crescimento tecidual (TGF- β e IGF-1), aumento das células satélites, aumento dos macrófagos, aumento da regeneração das miofibrilas. Já foi demonstrado também na literatura, que a sobrecarga mecânica e fatores locais de crescimento tecidual induzem o aumento da atividade de células satélites e que essas são responsáveis pela adição de mionúcleos nas fibras musculares, o que resulta, conseqüente aumento da síntese

proteica e volume muscular (Chaillou 2013). Os achados reportados anteriormente ajudam a compreender o porquê do aumento de mionúcleos, bem como a hipertrofia muscular nos animais eletroestimulados do nosso estudo e também nos resultados obtidos por Wyndaele & Poortmans (2006), que de modo semelhante ao nosso trabalho, observaram hipertrofia muscular e aumento da força dos MAP's após eletroestimulação. E ainda, ajuda explicar o motivo pelo qual houve menor número de células nos animais eletroestimulados em relação aos controles, já que as fibras musculares hipertrofiadas possuem maior área de secção transversa e volume, ocupando desta maneira uma maior área por campo microscópico. Dessa forma, os nossos resultados corroboram com os achados de Wyndaele & Poortmans (2006), para refutar a tese de que a eletroestimulação neuromuscular não induz hipertrofia muscular e consequente aumento da força nos MAP's (Pernambuco et al. 2013).

Quanto ao aumento na largura da fáscia endopélvica, parietal e visceral, nossos resultados apontam para o papel da eletroestimulação nos processos que levam à proliferação de colágeno na matriz extracelular. Semelhantemente, Mackey et al. (2011) observaram que a eletroestimulação foi capaz de induzir aumento do colágeno tipo I, III, IV, XII, bem como laminina B1, B2, a5. Sabe-se que na presença de dano tecidual uma corrente elétrica endógena (~200–800 mV/mm) induz processos mitóticos e mecanismos de sinalização celular, orientam e estimulam a migração de células na direção da lesão, um fenômeno conhecido como eletrotaxia, devido ativação polarizada do ERK1/2 (Extracellular-Signaling Regulated Kinase 1/2) (Zhao et al. 2010), também, por atuar na distribuição de integrinas nas membranas celulares dos fibroblastos, promove a adesão dessas às proteínas da matriz extracelular (Brown & Loew 1994). Ademais, tem sido demonstrado que a EE possui efeito regulador na expressão da MMP (metaloproteinase). Entende-se que esse gene possua papel importante na manutenção do colágeno e por consequência na matriz extracelular (Campeau et al. 2011; Liapis et al. 2001; Eastwood et al. 1998; Ulmsten et al. 1987). Logo, considerando que a eletroestimulação exógena pode mimetizar os efeitos da eletrotaxia endógena, conforme afirmado por Zhao et al. (2010), é possível que a

aplicação de uma corrente bifásica simétrica com intensidade de 2 a 4 mA durante trinta dias tenha proporcionado os mecanismos de sinalização celular reportados, refletindo assim no ganho estrutural observado na fáscia endopélvica.

Quanto a comparação das vias de eletroestimulação, notou-se que ambas possuem capacidade para causar hipertrofia muscular, aumento de mionúcleos nos MAP's e aumento na largura da fáscia endopélvica. Cabe destacar que a via intravaginal promoveu hipertrofia da fibra muscular de maneira superior a via intra-anal, enquanto que a última induziu aumento dos mionúcleos em maior número em relação a primeira. Na literatura, existe uma predileção por parte dos fisioterapeutas, da indicação e prescrição da via intravaginal para aumentar a força e conscientização dos MAP's em pacientes com incontinência urinária (Knorst et al. 2012), ao passo que a via intra-anal é comumente recomendada para o tratamento da incontinência anal para ambos os sexos (Vonthein et al. 2013). No entanto, nossos resultados indicam que independente da via utilizada, a eletroestimulação promoverá hipertrofia do parênquima muscular do assoalho pélvico, bem como da fáscia endopélvica.

No que se refere aos aspectos translacionais de aplicação clínica do presente estudo, pode-se entender a razão pela qual a maioria dos pacientes submetidos ao tratamento com eletroestimulação neuromuscular passam obter em sua morfologia e funcionalidade. A corrente elétrica é capaz de induzir hipertrofia muscular e o aumento na largura da fáscia endopélvica, o que favorece o aumento de força, aumento da resistência muscular, que implicará maior capacidade de sustentação dos órgãos pélvicos (Petrella et al. 2008; Ashton-Miller & DeLancey 2009; Wyndaele & Poortmans 2006; Knorst et al. 2012). Além disso, os músculos poderão responder mais rapidamente aos aumentos súbitos da pressão abdominal, como quando por exemplo tossimos, rimos, mobilizamos e transportamos algum objeto pesado. Todos esses fenômenos podem ser explicados pelas adaptações morfológicas, conforme reportadas acima, além de adaptações neuromusculares, como aumento da despolarização das terminações nervosas situadas nos órgãos pélvicos e seu maior espelhamento na somatotopia dos segmentos medulares espinhais, S2 a S4, e corticais nos giros motor e sensitivo primários e secundários

(Krhut et al. 2014). Ademais, as repercussões da eletroestimulação também afetam o tecido conjuntivo. Quando consideramos que é atribuída a fásia endopélvica, papel fundamental na sustentação dos órgãos pélvicos e que a referida estrutura foi afetada de forma positiva pela eletroestimulação, faz-nos compreender o porquê de algumas pacientes com prolapso de órgãos pélvicos grau 1 evoluírem, satisfatoriamente, de um quadro de perda urinária e fecal para um estado de normalização dos mecanismos relacionados às continências urinária e anal (Dannecker et al. 2005; Knorst et al. 2012). Além disso, reforça a indicação da fisioterapia como tratamento de primeira linha nas disfunções do assoalho pélvico (Hay-Smith et al. 2009). Destacamos que até onde investigamos, os achados referentes ao aumento da largura da fásia endopélvica induzida pela eletroestimulação é inédita na literatura.

B. EFEITO DA ELETROESTIMULAÇÃO NA URETRA

Nossos achados mostraram que a aplicação de trinta sessões de eletroestimulação por via intravaginal e intra-anal aumentaram as larguras das camadas associadas à uretra (mucosa, submucosa e muscular). Ambas as vias foram capazes de induzir a hipertrofia do EUE e aumento do número de células musculares lisa da túnica muscular da uretra. Notou-se que a via intravaginal induziu maior aumento na largura da túnica mucosa em relação a via intra-anal. A explicação para tal fenômeno decorre do fato da uretra está intimamente aderida à parede anterior da vagina e, portanto, muito próxima da irradiação da corrente, que teve efeitos tróficos, para a túnica mucosa.

O incremento estrutural dos tecidos associados à uretra como efeito da eletroestimulação remete não apenas a hiperplasia do músculo liso ou hipertrofia do músculo esquelético, mas também nos tecidos epitelial e conjuntivo que se apresentaram maiores; esses achados são corroborados nos estudos de Hechavarria et al. (2010), em que, a eletroestimulação causou re-epitelização, aumento na biossíntese de colágeno e matriz extracelular, bem como aumento de tecido muscular na bexiga de murinos.

Quanto ao aumento na largura das camadas teciduais uretral e hipertrofia do EUE, nossos resultados apontam para o papel da eletroestimulação nos processos que induzem à proliferação e migração de células relacionadas aos diferentes tecidos. Entende-se que todas as células, não apenas os neurônios e os músculos, sejam capazes de gerar e receber sinais bioelétricos (Levin 2007). Esses, são compostos pelos fluxos de íons, que trafegam pelo meio intra e extracelular (Levin 2009). A mobilização desses íons formam um campo elétrico, que por sua vez influencia a atividade dos canais de voltagem transportadores de moléculas de sinalização celular e, com isso, possibilita a comunicação entre a célula e o meio extracelular, bem como célula-célula, seja próxima, por meio das junções gap, ou distante, via mudança no pH do líquido extracelular ou expressando fatores de crescimento tecidual, tais como fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento transformador beta ($TGF-\beta$), fator de crescimento vascular (EGF), fator de crescimento do tecido conectivo (CTGF), fator de crescimento fibroblástico (FGF), fator de crescimento epidermal (EPGF) e o fator de crescimento insulínico (IGF) (Macdonald et al. 2007; Eming et al. 2008; Levin 2009). Considerando a aplicação de corrente bifásica simétrica nos tecidos da pelve e períneo durante vinte e um dias tenha possibilitado os mecanismos de sinalização celular reportados, acreditamos que a eletroestimulação induziu a produção de fatores de crescimento tecidual, o que resultou em ganho estrutural observado nos tecidos associados ao EUE e a uretra.

No que se refere ao ganho muscular pela hiperplasia, conforme demonstrado pelo aumento na largura e número de células da túnica muscular lisa da uretra em resposta ao uso da eletroestimulação e, considerando que a via PW1/Pax7 (Mitchell et al. 2010), constitutivamente expressa pelas células progenitoras intersticiais, como $CD34^+/45^-$ (Tamaki et al. 2002a; Royer et al. 2002; Tamaki et al. 2010), que possui a capacidade de miogênese de células musculares lisa e esquelética (Tamaki et al. 2002b), aliada a expressão de fatores de crescimento mediados pelo estresse tecidual (Relaix et al. 1998; Hill et al. 2003), que a corrente elétrica causa; tais como aumento da temperatura, aumento da mobilização de íons, além do aumento da permeabilidade capilar (Guirro 2009;

Kitchen & Young 2003), é possível que a eletroestimulação tenha deflagrado os mecanismos de remodelação do parênquima uretral, o que ocasionou o aumento no total de células musculares lisas apontadas nos resultados e também a exemplo de Camargo et al. (2013), que observaram importante aumento da túnica muscular da uretra após doze sessões de EE.

Quanto ao ganho muscular pelo aumento na largura/hipertrofia das fibras esqueléticas/EUE, sabe-se que a eletroestimulação induz a atividade proliferativa de mioblastos (Putman et al. 2001), vista por marcação de BrdU/Pax7, e pela redução da atividade apoptótica das células satélites, por diminuição da dUTP, ADP-ribose e caspase-3 (Zhang et al. 2010; Guo et al. 2012). Além disso, há aumento na expressão da proteína Bcl-2, que possui ação anti-apoptótica (Guo et al. 2012), o que em conjunto, favorece a proliferação das células satélites, bem como a capacidade dos mioblastos, juntamente, com os mionúcleos de sintetizarem as proteínas contráteis segundo a demanda funcional da célula, resultando em ganho de massa celular, a exemplo dos nossos resultados e dos achados de Wyndaele & Poortmans (2006).

Como dito, a despeito das diferentes abordagens terapêuticas aplicadas à incontinência urinária, especialmente a de esforço que perfaz 80% das queixas de IU, considera-se a necessidade de aprimorar os métodos não invasivos como a eletroestimulação, uma vez que eles podem trazer uma resposta funcional satisfatória com menor risco aos pacientes (Vonthein et al. 2013; Bernstein et al. 2014), ao contrário das técnicas de alto custo e com considerável percentual de repetição de cirurgia, como a implantação de fios (*sling*) (Solana et al. 2007).

Considerando que a ação integrada dos tecidos associados à uretra é fundamental na continência voluntária, que a paridade (Nelson 2004) e o envelhecimento (Akhtar & Padda 2005) causam alterações estruturais que podem levar à incontinência urinária e à perda na qualidade de vida dos indivíduos (Abrams et al. 2009), esse estudo demonstrou, em modelo murino fisiologicamente semelhante aos humanos (Alperin et al. 2014), como a eletroestimulação afeta estruturalmente os diferentes tecidos associados à uretra de ratas nulíparas. Em conjunto, nossos resultados mostraram que esse método aumentou

estruturalmente todos os tecidos associados à uretra, os mecanismos intrínsecos e extrínsecos para a continência foram afetados pela eletroestimulação, o que potencialmente resultará em maior pressão de fechamento uretral, especialmente pelo ganho do tecido muscular liso e estriado esquelético, reforçando a aplicabilidade desse método no tratamento da incontinência urinária de esforço. Ressalta-se não foram encontrados na literatura, os dados referentes à hipertrofia do EUE após 30 sessões de eletroestimulação, é inédito na literatura.

C. EFEITO DA ELETROESTIMULAÇÃO NA VAGINA

Após trinta sessões de eletroestimulação por via intravaginal e intra-anal, foi possível observar aumento na largura da túnica conjuntiva e muscular. A via intra-anal induziu aumento da túnica mucosa, enquanto a intravaginal a reduziu. Notou-se também que ambas as vias foram capazes de promover a hiperplasia da túnica muscular. A via intravaginal mostrou-se superior à intra-anal para induzir aumento da túnica conjuntiva.

Quanto à redução da mucosa nos animais eletroestimulados pela via intravaginal, nossos resultados mostram que a introdução da sonda contribuiu para mudança na largura da mucosa, que é influenciada por fatores endógenos (idade, estado hormonal e emocional, sangramentos) e exógenos (uso de medicamentos, hábitos de higiene, vestuário, atividade sexual e corpos estranhos) (Giraldo et al. 2005; Guaschino et al. 2008; Petricevic et al. 2008). Neste caso, acreditamos que a inserção da sonda, bem como sua manipulação e ajustes durante as sessões, acrescida da eletroestimulação, que promove adaptações biofísicas e bioquímicas no tecido, aliadas ao fato de os animais do grupo eletroestimulados serem constituídos por nulíparas, ou seja, animais que não copularam e por consequência não pariram, sejam os motivos pelos quais induziram a redução da mucosa.

Em relação ao aumento na largura da mucosa da vagina, via eletroestimulação intra-anal, nossos resultados apontam para o papel da corrente elétrica nos processos que levam à proliferação do epitélio de revestimento desse órgão. Do mesmo modo, Huang et al. (2009) observaram que a eletroestimulação foi capaz de induzir aumento do fator de crescimento epidérmico e queratinócitos.

Entende-se que uma corrente elétrica de aproximadamente 200mV seja capaz de induzir processos mitóticos e mecanismos de sinalização celular, como a ativação polarizada do ERK1/2 (Extracellular-Signaling Regulated Kinase 1/2) (Zhao et al. 2010). Ademais, Jennings et al. (2010) relataram que ao aplicarem uma corrente de 300 mV/mm na pele, os queratinócitos expressaram em grande quantidade a quimiocina (CCL20), que por sua vez induz a ativação da fosfolipase C β (PLC β), conduzindo à formação de inositol trifosfato (IP3) e diacilglicerol (DAG), que estimulam, respectivamente, a liberação de cálcio do retículo endoplasmático e ativação da proteína quinase C (PKC). A PKC conduz, por seu turno, a uma cascata de eventos tanto intracitoplasmáticos como dentro do núcleo (Guerreiro et al. 2011; Mellado et al. 2001; Soldevila & García-Zereda 2007; Thelen 2001; Jin et al. 2008). Em posse dessas informações, nota-se que a eletroestimulação ativa moléculas efetoras envolvidas no rearranjo do citosqueleto, implicadas na adesão e migração celular (Mellado et al. 2001; Soldevila & García-Zereda 2007), o que explica o aumento na largura da mucosa vaginal pela via intra-anal.

No tocante ao aumento na largura do tecido conjuntivo da vagina, eletroestimuladas por ambas as vias, nossos resultados indicam que a corrente elétrica promove proliferação dos fibroblastos, que por sua vez sintetizam os componentes da matriz extracelular, colágeno, elastina, fibronectina, glicosaminoglicanas e proteoglicanas. Os achados de Wang et al. (2016) corroboram com os nossos resultados, uma vez que observaram que a eletroestimulação induz a proliferação de fibroblastos, via ativação do TGF β 1-ERK-NF- κ B, o que favorece a remodelação tecidual. Sabe-se que a eletroestimulação modifica campo elétrico tecidual (Koopes et al. 2014), na área irradiada e nas adjacências, o que influencia a abertura dos canais de Ca²⁺ mediados por voltagem, durante a passagem da corrente (Levin 2009). Esse influxo de Ca²⁺ influencia a motilidade e contratilidade celular, modulação da atividade enzimática, secreção autócrina e parácrina, além da migração, proliferação e diferenciação celular (Levin 2009). Considerando que a corrente elétrica aumenta a tensão na matriz extracelular (Finkelstein et al. 2004) e que há ligação entre as fibras da matriz com a actina no ambiente intracelular dos fibroblastos, via integrinas $\alpha\beta$ 3,

fibronectina A5 β 1, talina, vinculina, α -actinina, paxilina (Tsai et al. 2013; Arnaout et al. 2007; Nayal et al. 2004) e que os fibroblastos são mecanossensíveis às forças de tensão e compressão tecidual (Geiger & Bershadsky 2001), acreditamos que a eletroestimulação induziu a proliferação de fibroblastos, o que resultou em aumento na largura do tecido conjuntivo da vagina.

Quanto ao ganho de massa na musculatura lisa da vagina após trinta sessões de eletroestimulação, nossos resultados mostraram que a frequência de 50Hz foi capaz de induzir aumento na largura das paredes da vagina, fato este ainda não descrito na literatura. Giraldi et al. (2002), observaram que o músculo liso da parede da vagina possui comportamento de frequência-dependência, em que o aumento da frequência induz maior força de contração e ainda, observaram que o óxido-nítrico (NO) exerce papel modulador no músculo liso da vagina e uretra, ora potencializando a contratilidade, ora inibindo. Além disso, notaram que a parede muscular possui receptores para sinaptofisina (Syn), óxido nítrico sintetase (NOS), neuropeptídeo Y (NPY), tirosina hidroxilase (TH) e transportador vesicular de acetilcolina (VACHT), o que pode significar que as células do músculo liso vaginal são reguladas, por mediadores adrenérgico, colinérgico e não adrenérgico não colinérgico (NANC). Considerando esses achados e os de Sebe et al. (2005) e Thor & Groat (2010), percebe-se que a túnica muscular lisa das paredes da vagina pode se beneficiar com a eletroestimulação neuromuscular, da mesma forma que o músculo EUE, uma vez que ambos os músculos possuem origem embriológica comum e receptores neurais semelhantes (Keast 2006). Cabe destacar ainda, que a eletroestimulação intravaginal promoveu maior ganho de massa muscular e tecido conjuntivo que a via intra-anal. Uma explicação provável para isso, vem do fato da proximidade do eletrodo, fonte irradiadora do estímulo, com a túnica muscular, que possui alta afinidade com a corrente elétrica, conforme já foi narrado anteriormente. Assim, a eletroestimulação intravaginal aumentou as forças de tensão no músculo liso (Goffin et al. 2006) e no tecido conjuntivo da parede da vagina, o que deve ter contribuído para proliferação, migração, remodelação e diferenciação dos fibroblastos para protomiofibroblastos e miofibroblastos

(Tomasek et al. 2002; Hinz & Gabianni 2003), o que resultou em maior largura da túnica muscular e conjutiva da vagina.

No que se refere a hiperplasia observada em nosso estudo na túnica muscular da vagina, por ambas as vias de eletroestimulação, indicam que a corrente elétrica foi capaz de induzir à proliferação de células musculares lisas. Semelhantemente, Rowlands & Cooper-White (2008) observaram que a eletroestimulação promoveu hiperplasia de células musculares lisas via expressão da α -actina (SMA) e cadeia pesada de miosina de músculo liso (SMMHC) em vaso sanguíneo. Desse modo, acreditamos que a eletroestimulação promove a proliferação, adesão e migração de células musculares lisas nas paredes da vagina (Stern-Straeter et al. 2005), por meio da expressão MyoD, que é um fator de transcrição diretamente relacionado com o crescimento muscular (Kawahara et al. 2006), pela M-caderina, uma proteína de adesão envolvida na diferenciação terminal de mioblastos (Kawahara et al. 2006), diferenciação dos miofibroblastos, presentes no tecido conjuntivo adjacente à túnica muscular, as quais são células mecanossensíveis a tensão da matriz extracelular, e pela modificação na concentração de cálcio (Ca^{+}) extracelular e intracelular, que influencia a migração celular (Berridge 1995; Wamhoff et al. 2004; Tsai et al. 2014). Com isso, postula-se que a hiperplasia da túnica muscular lisa da vagina, tenha como resultante, um melhor desempenho deste órgão no papel de suporte ativo da vagina e nos mecanismos de reatividade contrátil frente a forças compressivas e distensivas da cavidade abdominopélvica (DeLancey 1992; Ashton-Miller & DeLancey 2009)

Ressaltamos que a hiperplasia das células dos tecidos muscular liso, epitelial e conjuntivo em função da eletroestimulação intravaginal e intra-anal, conforme demonstrado em nosso estudo, são inéditos na literatura, até onde pesquisamos.

Como dito, a despeito das modificações estruturais nos tecidos conjuntivo e muscular na vagina provocadas pela idade, número de partos vaginais, hipoestrogenismo e que tais fatores contribuem para o POP, IU, IA, dor pélvica, além de queixas relativas à sexualidade, como anorgasmia e dispaureunia,

considera-se a necessidade de diferentes abordagens terapêuticas aplicadas à prevenção e tratamento dessas afecções (Baber et al. 2001; Milsom et al. 2009).

Considerando que a eletroestimulação induziu aumento nos tecidos associados à vagina, em especial, no tecido conjuntivo e muscular, que possuem papel de contenção e estabilização para os órgãos pélvicos (bexiga, uretra e reto) adjacentes a ela, esse estudo demonstrou em modelo animal, o potencial histofuncional da eletroestimulação para a remodelação vaginal, utilizando parâmetros de corrente para a hipertrofia de músculo esquelético. Dessa forma, nossos achados apontam para a prescrição da eletroestimulação para além das fronteiras do ganho de força muscular dos MAP's e EUE, mas também para aumentar a força tênsil dos tecidos da pelve e períneo, e com isso, contribuir como mais um agente terapêutico a ser considerado no enfrentamento das afecções funcionais destas regiões.

D. EFEITO DA ELETROESTIMULAÇÃO RETO-ÂNUS

Nossos achados mostraram que a aplicação de trinta sessões de eletroestimulação por via intravaginal e intra-anal aumentaram as larguras das camadas associadas ao reto (mucosa, submucosa e muscular) e o número de eosinófilos, macrófagos e linfócitos associados à mucosa e ao epitélio de revestimento do reto e ânus, bem como causou hiperplasia do músculo liso do esfíncter anal interno (EAI) e hipertrofia do músculo do esfíncter anal externo (EAE).

O ganho estrutural dos tecidos associados ao reto e ânus como efeito da eletroestimulação reflete não somente a hiperplasia do músculo liso ou hipertrofia do músculo esquelético, mas também nos tecidos epitelial e conjuntivo que se apresentaram maiores; esses achados são corroborados nos estudos de Alvarez et al. (1983), em que, a eletroestimulação causou maior taxa de re-epitelização e aumento na biossíntese de colágeno em lesões cutâneas experimentais em porcos.

Quanto ao aumento na largura das camadas teciduais e ao maior número de leucócitos na mucosa retal e anal, nossos resultados apontam para o papel da

eletroestimulação nos processos que levam à proliferação e migração de células relacionadas aos diferentes tecidos. Sabe-se que na presença de dano tecidual uma corrente elétrica endógena (~100–200 mV/mm) induz processos mitóticos e mecanismos de sinalização celular, orientam e estimulam a migração de células na direção da lesão, um fenômeno conhecido como eletrotaxia (Robinson 1985), devido ativação polarizada do EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor), ERK1/2 (Extracellular-Signaling Regulated Kinase 1/2) e da quinase PI3 (Zhao et al. 2010), também, por atuar na distribuição de integrinas nas membranas celulares dos fibroblastos, promove a adesão dessas às proteínas da matriz extracelular (Brown & Loew 1994). Logo, considerando que a eletroestimulação exógena pode mimetizar os efeitos da eletrotaxia endógena, conforme afirmado por Zhao et al. (2010), é possível que a aplicação de uma corrente bifásica simétrica com intensidade de 2 mA (220mV) durante vinte um dias tenha proporcionado os mecanismos de sinalização celular reportados, refletindo assim no ganho estrutural observado nos tecidos associados ao reto e ânus.

Quanto ao ganho muscular pela hiperplasia muscular em resposta ao uso da eletroestimulação e, considerando que a proteína tirosina quinase Abl (Abelson tyrosine kinase), constitutivamente expressa nas células musculares lisas, possui uma variedade de funções que incluem a regulação da actina, migração e adesão (Cleary et al. 2014), mas também a proliferação celular em resposta à ativação de fatores de crescimento (Jia et al. 2012; Wang et al. 2013), pela modulação dinâmica da actina, fosforilação e ativação de uma cascata de proteínas quinases como Raf-1, MEK1/2 e ERK1/2 durante a ativação miogênica (Widmann et al. 1999), é possível que a eletroestimulação mimetizando os efeitos da eletrotaxia endógena tenha favorecido o aumento no total de células musculares lisas observada nos resultados.

Quanto ao ganho muscular pelo aumento no diâmetro/hipertrofia das fibras esqueléticas/EAE, sabe-se que este processo é adaptativo e resulta em um aumento da área muscular/fibra muscular como resposta ao aumento da síntese proteica intracelular (Gondin et al. 2011). Embora os mecanismos celulares envolvidos na hipertrofia muscular não estejam totalmente elucidados sabe-se que

ela está relacionada diretamente ao número de mionúcleos e à taxa de síntese e degradação das proteínas dos miofilamentos (Gundersen 2011). Em condições de atonia muscular ou no envelhecimento observa-se a perda gradativa dos mionúcleos das fibras esqueléticas, resultando na diminuição da síntese protéica (Siu et al. 2005a; Siu et al. 2005b; Gundersen 2011). No entanto, a reversão desse processo pode se dar na presença de estímulo excitatório (Hakkinen et al. 2000; Silva 2006; Jones et al. 2009) em que as células satélites, associadas à face interna das fibras musculares, são ativadas e passam a compor os mionúcleos e recompor ativamente a síntese protéica (Allen et al. 1999; Cornelison et al. 2001), resultando em ganho de massa celular, a exemplo dos nossos resultados e dos achados de Wyndaele & Poortmans (2006).

Como dito, a despeito das diferentes abordagens terapêuticas aplicadas à incontinência anal, considera-se a necessidade de aprimorar os métodos não invasivos como a eletroestimulação, uma vez que eles podem trazer uma resposta funcional satisfatória com menor risco aos pacientes (Vonthein et al. 2013; Bernstein et al. 2014), ao contrário das técnicas de alto custo e complexidade como a implantação de eletrodos sobre o nervo sacral (Solana et al. 2007).

Considerando que a ação integrada dos tecidos associados ao reto e ânus é fundamental na continência voluntária, que a paridade (Nelson, 2004) e o envelhecimento (Akhtar & Padda 2005) causam alterações estruturais que podem levar à incontinência anal e à perda na qualidade de vida dos indivíduos (Akhtar & Padda 2005), esse estudo demonstrou, em modelo murino fisiologicamente semelhante aos humanos (Alperin et al. 2014), como a eletroestimulação afeta estruturalmente os diferentes tecidos associados ao reto e ânus de ratas nulíparas. Em conjunto, nossos resultados mostraram que esse método aumentou estruturalmente todos os tecidos associados ao reto e ânus e, sobretudo, quanto ao tecido muscular nossos resultados apontam para o ganho estrutural com reflexos no ganho funcional, reforçando a aplicabilidade desse método no tratamento da incontinência anal.

6. CONCLUSÃO

Os resultados das comparações entre o grupo controle não estimulado e os grupos tratados com a eletroestimulação permitem as seguintes conclusões:

- A sonda de eletroestimulação foi satisfatoriamente adaptada as dimensões anorretais das ratas Wistar de 12 meses e acoplou-se perfeitamente ao eletroestimulador clínico Dualpex® 961;
- Não houve diferença de transmissão efetiva de sinal elétrico entre a sonda comercial para humanos e a sonda produzida e adaptada para as ratas;
- A sonda de eletroestimulação foi capaz de induzir a contração muscular efetiva dos músculos da pelve e períneo;
- O manômetro produzido permitiu o registro adequado dos dados pressóricos dos músculos da pelve e períneo e adaptou-se perfeitamente ao segmento anorretal;
- A pressão intra-anal aumenta durante a passagem da corrente elétrica, indicando a contração muscular dos MAPs;
- Ambas as vias de eletroestimulação, intravaginal e intra-anal, aumentaram as larguras das camadas mucosa, submucosa e muscular da uretra, vagina, reto e ânus, no entanto a via intravaginal reduziu a largura da mucosa da vagina;
- Ambas as vias causaram aumento no diâmetro das fibras musculares esqueléticas e redução no número delas nos músculos do assoalho pélvico e do esfíncter anal externo;
- Ambas as vias, intravaginal e intra-anal, aumentaram o número de mionúcleos por fibras musculares esqueléticas dos MAPs;
- Ambas as vias de eletroestimulação, intravaginal e intra-anal, aumentaram o total de fibras musculares lisas nos músculos da uretra, vagina, reto e do esfíncter anal interno;
- Ambas as vias, intravaginal e intra-anal, causaram aumento na largura da fáscia endopélvica parietal e visceral;

- Na uretra, a via de eletroestimulação intravaginal causou maior aumento na largura das camadas mucosa e submucosa, bem como no total de fibras musculares lisas e no diâmetro das fibras estriadas do esfíncter uretral externo do que a via intra-anal;
- Quando comparadas as vias de eletroestimulação, a via intra-anal foi mais efetiva do que a intravaginal para aumentar a largura da mucosa e o total de fibras musculares da vagina;
- Ambas as vias, intravaginal e intra-anal, causaram no ânus aumento na largura das camadas mucosa, submucosa e muscular lisa (esfíncter anal interno), bem como no diâmetro das fibras estriadas do esfíncter anal externo;
- Não houve diferenças entre as vias de eletroestimulação, intravaginal e intra-anal, nos tecidos do reto.

Os resultados demonstraram a eficácia da sonda de eletroestimulação na transmissão do sinal elétrico que afetou estruturalmente os tecidos associados aos órgãos pélvicos das ratas. Especificamente, a eletroestimulação intravaginal ou intra-anal foi capaz de estimular as fibras musculares para ativar as células satélites quiescentes, resultando em hipertrofia celular, além de ativar fibroblastos resultando na maior largura das camadas visceral e parietal da fáscia endopélvica. Assim, nossos resultados apontam para a efetividade da a eletroestimulação no ganho funcional mediado pela melhora estrutural dos tecidos dos órgãos pélvicos.

7. LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS

O presente estudo foi realizado para responder a questionamentos sobre os efeitos da eletroestimulação intravaginal e intra-anal nos tecidos da pelve e períneo que não puderam ser respondidos, até a presente data, devido à carência de pesquisas nesta área. Embora a eletroestimulação seja largamente utilizada como agente terapêutico no tratamento das disfunções pélvicas, de modo geral, as pesquisas com eletroestimulação concentram seu foco no efeito histofuncional da corrente elétrica sobre os músculos estriados esqueléticos, ignorando o fato de que antes de atingir as fibras musculares esqueléticas e despolarizá-las, a corrente elétrica atravessará as túnicas epitelial, conjuntiva e muscular lisa, que formam as paredes dos órgãos pélvicos, bem como ao tecido conjuntivo que forma as fâscias e ligamentos da pelve.

Os resultados encontrados demonstraram a viabilidade da utilização da eletroestimulação intravaginal e intra-anal para aumentar a força de pressão dos MAPs, bem como, contribuiu para hipertrofia dos músculos esqueléticos dos diafragmas pélvico e urogenital, além do esfíncter anal externo. Ela também se mostrou eficaz para aumentar largura das túnicas epitelial, conjuntiva e muscular lisa da uretra, vagina e reto, e ainda, o número de fibras musculares lisas nestes órgãos. Pelo que também, aumentou a largura e o número de fibras do esfíncter anal interno. Com tudo isso, os achados encontrados apontam para o potencial terapêutico que a eletroestimulação possui para modificar o parênquima e estroma dos órgãos pélvicos, sem provocar iatrogenias, estimulando a adaptação autócrina e paráquina nas células e tecidos, com possíveis implicações positivas para a continência urinária e anal, bem como estabilização dos órgãos, uma vez que tanto os mecanismos dinâmicos como estáticos, os músculos (liso e esquelético) e as túnicas conjuntivas (uretra, vagina, reto, ânus e fâscia endopélvica), respectivamente, envolvidos no processo de continência e estabilização, responderam aumentando seu volume e largura, o que possivelmente aumenta a força tênsil como um todo dos tecidos da pelve.

Destacamos a necessidade de outras pesquisas que investiguem quanto à tipagem de fibras esqueléticas dos músculos do diagrama pélvico e urogenital após a eletroestimulação, para revelar se ajustes nos parâmetros (frequência, amplitude,

intensidade) da corrente, frequência de exposição na semana ao recurso, podem modificar a plasticidade muscular, bem como as propriedades contrateis, metabólicas e morfológicas das fibras em resposta ao estímulo elétrico. Há também a premência em mais pesquisas que confirmem os resultados encontrados em nosso estudo para proliferação de células muscular lisa, no tecido conjuntivo (fibras de colágeno, reticulares e elastina) e tecido epitelial na uretra, vagina, reto e ânus, uma vez que a confirmação desses achados abrirá novas perspectivas para remodelação dos tecidos da pelve e períneo, contribuindo na prevenção e tratamento das disfunções pélvicas.

Entendemos que nosso estudo apresentou algumas limitações, tais como, a baixa quantidade de amostras por grupo, falta de uso de métodos imunohistoquímicos para marcação de células tronco, tipificação das fibras musculares esqueléticas com ATPase, marcação de células em proliferação (muscular lisa e esquelética, fibras de colágeno, reticulares, elastina), mensuração do comportamento da força muscular ao longo das trinta sessões, criando para isso um grupos pareado de ratas eletroestimuladas por via intra-anal e intravaginal, para com isso reforçar o conhecimento acerca da prescrição da eletroestimulação para o ganho de força muscular. Apontamos também para o possível viés de aferição da sonda de Foley no registro da pressão intra-anal. Ressaltamos, entretanto, que a falta de utilização dos métodos anteriormente citados, deveu-se a dificuldade em angariar recursos financeiros para custeá-los, o que impossibilitou o acesso aos tais. Quanto a limitação do baixo número de amostras por grupo, tivemos oposição, por parte do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA), para composição de grupos acima de cinco animais, pois a recomendação vigente do CEUA sinaliza para substituir, reduzir ou refinar o uso de animais para fins científicos (3Rs), com vistas a inibir a eutanásia exagerada de animais e mal-uso de recursos financeiros. No tocante a sonda de Foley, admitimos que o registro da pressão intra-anal possa ter recebido algum incremento do seu valor em função da oscilação da pressórica intra-abdominal, que a cada ciclo inspiratório aumenta a pressão na cavidade pélvica, e conseqüentemente, na pressão intra-anal. No

entanto, destacamos que trata-se de um mecanismo fisiológico que pode ter ocorrido em todas as coletas de avaliação de pressão, de maneira aleatória.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abramowitch SD, Feola A, Jallah Z, Moalli PA. Tissue mechanics, animal models, and pelvic organ prolapse: a review. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2009; 1:S146-58.
2. Abrams P, Cardozo L, Khoury S, Wein A, organizadores. Incontinence. 4th International Consultation on Incontinence, Paris July 5-8, 2008. Health Publication Ltd; 2009, p.1325-1385.
3. Akhtar AJ, Padda M. Fecal Incontinence in older patients. *J Am Med Dir Assoc* 2005; 6:54-60.
4. Allen DL, Roy RR, Edgerton VR. Myonuclear domains in muscle adaptation and disease. *Muscle Nerve* 1999; 22: 1350-60.
5. Alperin M, Tuttle LJ, Conner BR, Dixon DM, Mathewson MA, Ward SR, et al. Comparison of pelvic muscle architecture between humans and commonly used laboratory species. *Int Urogynecol J* 2014; 25: 1507-15.
6. Alvarez OM, Mertz PM, Smerbeck RV, Eaglstein WH. The healing of superficial skin wounds is stimulated by external electrical current. *J Invest Dermatol* 1983; 81:144-48.
7. Arnaout MA, Goodman SL, Xiong JP. Structure and mechanics of integrin-based cell adhesion. *Curr Opin Cell Biol* 2007; 19:495-507.
8. Ashton-Miller JA, DeLancey JOL. On the Biomechanics of Vaginal Birth and Common Sequelae. *Annu Rev Biomed Eng* 2009; 11:163-76.
9. Barber MD, Kuchibhatla MN, Pieper CF, Bump RC. Psychometric evaluation of 2 comprehensive condition-specific quality of life instruments for women with pelvic floor disorders. *Am J Obstet Gynecol* 2001; 185:1388-95.
10. Barbosa AMP, Carvalho LR, Martins AMVC, Calderon IMP, Rudge MVC. Efeito da via de parto sobre a força muscular do assoalho pélvico. *Rev Bras Ginecol Obstet* 2005; 27:677-85.
11. Barbosa JMM, Dias RC, Pereira LSM. Qualidade de vida e estratégias de enfrentamento em idosos com incontinência fecal: uma revisão da literatura. *Rev Bras Geriatr Gerontol* 2007; 10:383-99.

12. Berridge MJ. Calcium signalling and cell proliferation. *BioEssays* 1995; 17: 491–500.
13. Bernstein MA, Purdy CH, Becker A, Magar R. Three-year cost-effectiveness model for non-animal stabilized hyaluronic acid and dextranomer copolymer compared with sacral nerve stimulation after conservative therapy for the management of fecal incontinence. *Clin Therap* 2014; 36:890-905.
14. Bharucha AE, Zinsmeister AR, Locke GR. Prevalence and burden of fecal incontinence: a population-based study in women. *Gastroenterology* 2005; 129:42–9.
15. Bo K, Talseth T, Holme I. Single blind, randomized controlled trial of pelvic floor exercises, electrical stimulation, vaginal cones, and no treatment in management of genuine stress incontinence in women. *BMJ* 1999; 318:487-493.
16. Brown MJ, Loew LM Electric field-directed fibroblast locomotion involves cell surface molecular reorganization and is calcium independent. *J Cell Biol* 1994; 127: 117–280.
17. Brown MD, Hudlicka O. Modulation of physiological angiogenesis in skeletal muscle by mechanical forces: Involvement of VEGF and metalloproteinases. *Angiogenesis* 2003; 6:1-14.
18. Camargo ALM, Salerno GRF, Simões RS, Castro RA, Girão MJBC. Aspectos morfológicos da uretra de ratas após eletroestimulação do assoalho pélvico. *Rev Bras Ginecol Obstet* 2013; 35:159-63.
19. Campeau L, Gorbachinsky I, Badlani GH, Andersson KE. Pelvic floor disorders: linking genetic risk factors to biochemical changes. *BJU International* 2011; 108:1240-7.
20. Castro RA, Arruda RM, Zanetti MR, Santos PD, Sartori MG, Girão MJ. Single-blind, randomized, controlled trial of pelvic floor muscle training, electrical

stimulation, vaginal cones, and no active treatment in the management of stress urinary incontinence. *Clin Sci* 2008; 63:465-72.

21. Cavalcante EVV, Da Silva LGM, Montenegro EJM, Pontes NT Filho. Efeito da eletroestimulação no músculo desnervado de animais: revisão sistemática. *Fisioter Mov* 2012; 25:669-78.
22. Chaillou T. Time course of gene expression during mouse skeletal muscle hypertrophy. *Journal of applied physiology* 2013; 115:1065-74.
23. Chen LC, Ashton-Miller JA, Hsu Y, DeLancey JOL. Interaction between Apical Supports and Levator Ani in Anterior Vaginal Support: Theoretical Analysis *Obstet Gynecol* 2006; 108:324-32.
24. Cheon C, Maher C. Economics of pelvic organ prolapse surgery. *Int Urogynecol J* 2013; 24:1873-76.
25. Cleary RA, Wang R, Waqar O, Singer HA, Tang DD. Role of c-Abl tyrosine kinase in smooth muscle cell migration. *Am J Physiol Cell Physiol* 2014; 306:C753-61.
26. Cornelison DD, Filla MS, Stanley HM, Rapraeger AC, Olwin BB. Syndecan-3 and syndecan-4 specifically mark skeletal muscle satellite cells and are implicated in satellite cell maintenance and muscle regeneration. *Dev Biol* 2001; 239: 79-94.
27. Correia GN, Bossini PS, Driusso P. Eletroestimulação intravaginal para o tratamento da incontinência urinária de esforço: revisão sistemática. *Femina* 2011; 39:223-30.
28. Coyne KS, Wein A, Nicholson S, Kvasz M, Chen CI, Milsom I. Economic burden of urgency urinary incontinence in the united states: a systematic review. *J Manag Care Pharm* 2014; 20:130-40.
29. Dannecker C, Wolf V, Raab R, Hepp H, Anthuber C. EMG-biofeedback assisted pelvic floor muscle training is an effective therapy of stress urinary or mixed incontinence: a 7-year experience with 390 patients. *Arch Gynecol Obstet* 2005; 273:93-7.

30. DeLancey JOL. Anatomic aspects of vaginal eversion after hysterectomy. *Am J Obstet Gynecol* 1992; 166:1717-28.
31. DeLancey JOL. The hidden epidemic of pelvic floor dysfunction: achievable goals for improved prevention and treatment. *Am J Obstet Gynecol* 2005; 192:1488-95.
32. DeLancey JOL, Morgan DM, Fenner DE, Kearney R, Guire K, Miller JM, et al. Comparison of levator ani muscle defects and function in women with and without pelvic organ prolapse. *Obstet Gynecol* 2007; 109:295-302.
33. Dirks ML, Wall BT, Snijders T, Ottenbros CLP, Verdijk LB, Van Loon LJC. Neuromuscular electrical stimulation prevents muscle disuse atrophy during leg immobilization in humans. *Acta Physiol* 2014; 210:628–41.
34. Eastwood M, Mudera VC, McGrouther DA, Brown RA. Effect of precise mechanical loading on fibroblast populated collagen lattices: morphological changes. *Cell Motil Cytoskel* 1998; 40:13–21.
35. Eming SA, Brachvogel B, Odorisio T, Koch M. Skin homeostasis during inflammation: a role for nerve growth factor. *Histol Histopathol* 2008; 23:1-10.
36. Elbadawi A. Functional anatomy of the organs of micturition. *Urol Clin North Am* 1996; 23:177-210.
37. Feola A, Moallip, Alperin M, Duerr R, Gandley RE, Bramowitch S. Impact of pregnancy and vaginal delivery on the passive and active mechanics of the rat vagina. *Ann Biomed Eng* 2011; 39:549-58.
38. Finkelstein E, Chang W, Chao PH, Gruber D, Minden A, HUNG CT, Bulinski JC. Roles of microtubules, cell polarity and adhesion in electric-field-mediated motility of 3T3 fibroblasts. *J Cell Sci* 2004; 117:1533–1545.
39. Franceschet J, Sacomori C, Cardoso FL. Força dos músculos do assoalho pélvico e função sexual em gestantes. *Rev Bras Fisioter* 2009; 13:383-9.
40. Francine O. Qualidade de vida de mulheres com bexiga hiperativa refratária tratadas com estimulação elétrica do nervo tibial posterior. *Rev Bras Fisioter* 2009; 13:480-6.

41. Franco GR, Oliveira E, Baraca EC, Simões MJ, Sartoria MJF5, Girão MJBC, et al. Histomorphometric analysis of a rat bladder after electrical stimulation. *Rev Assoc Med Bras* 2011; 57:20-24.
42. Geiger B, Bershadsky A. Assembly and mechanosensory function of focal contacts. *Curr Opin Cell Biol* 2001; 13:584-92.
43. Giraldi A, Alm P, Werkström V, Myllymäki L, Wagner G, Andersson KE. Morphological and functional characterization of a rat vaginal smooth muscle sphincter. *Int J Impot Res* 2002; 14:271-82.
44. Giraldo PC, Amaral RCG, Gonçalves AK, Vicentini R, Martins CH, Giraldo H, et al. Influência da frequência de coitos vaginais e da prática de duchas higiênicas sobre o equilíbrio da microbiota vaginal. *Rev Bras Ginecol Obstet* 2005; 27:257-62.
45. Gobbo M, Maffiuletti NA, Orizio C, Minetto MA. Muscle motor point identification is essential for optimizing neuromuscular electrical stimulation use. *J NeuroEngineer Rehabil* 2014; 11:1-6.
46. Gondin J, Brocca L, Bellinzona E, D'Antona G, Maffiuletti NA, Miotti D, et al. Neuromuscular electrical stimulation training induces atypical adaptations of the human skeletal muscle phenotype: a functional and proteomic analysis. *J Appl Physiol* 2011; 110:433-50.
47. Goffin JM, Pittet P, Csucs G, Lussi JW, Meister JJ, Hinz B. Focal adhesion size controls tension-dependent recruitment of α -smooth muscle actin to stress fibers. *J Cell Biol* 2006; 172:259-68.
48. Guaschino S, Benvenuti C. Sophy project Part 1: an observational study of vaginal pH and lifestyle in women of different ages and in different physiopathological conditions. *Minerv Ginecol* 2008; 60:1-7.
49. Guirro ECO. Eletroterapia no tratamento da incontinência urinária de esforço. In: Palma PCR. Aplicações clínicas das técnicas fisioterapêuticas nas

disfunções miccionais e do assoalho pélvico. Campinas SP: Personal Link Comunicações; 2009, p. 247-254.

50. Guerreiro R, Santos-Costa Q, Azevedo-Pereira JM. As quimiocinas e os seus receptores: características e funções fisiológicas. *Acta Med Port* 2011; 24:967-76.
51. Guo BS, Cheung KK, Yeung SS, Zhang BT, Yueng EW. Electrical stimulation influences satellite cell proliferation and apoptosis in unloading-induced muscle atrophy in mice. *PLoS ONE* 2012; 7:e30348.
52. Guralnick ML, Kelly H, Engelke H, Koduri S, O'Connor RC. In Tone: a novel pelvic floor rehabilitation device for urinary incontinence. *Int Urogynecol J* 2015; 26:99-106.
53. Gundersen K. Excitation-transcription coupling in skeletal muscle: the molecular pathways of exercise. *Biol Rev Camb Philos Soc* 2011; 86:564-600.
54. Haibe HW. *Tratado de ginecologia*. 3 ed. São Paulo SP: Roca; 2000.
55. Häkkinen K, Alen M, Kallinen M, Newton RU, Kraemer WJ. Neuromuscular adaptation during prolonged strength training, detraining and re-strength-training in middle-aged and elderly people. *Eur J Appl Physiol* 2000; 83:51-62.
56. Handa VL, Zyczynski HM, Burgio KL, Fitzgerald MP, Borello-France D, Janz NK, Fine PM, Whitehead W, Brown MB, Weber A. The impact of fecal and urinary incontinence on quality of life 6 months after childbirth. *Am J Obstet Gynecol* 2007; 197:636 e1-6.
57. Hay-Smith J, Mørkved S, Fairbrother KA, Herbison GP. Pelvic floor muscle training for prevention and treatment of urinary and faecal incontinence in antenatal and postnatal women. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2008; 4: 1-88.
58. Hay-Smith EJC, Herderschee R, Dumoulin C, Herbison GP. Comparisons of approaches to pelvic floor muscle training for urinary incontinence in women. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2011; 12:1-103.

59. Haylen BT, Ridder D, Freeman RM, Swift SE, Berghmans B, Lee J, Monga A, et al. An International Urogynecological Association (IUGA)/International Continence Society (ICS) joint report on the terminology for female pelvic floor dysfunction. *Int Urogynecol J* 2010; 21:5-26.
60. Hechavarria D, Dewilde A, Braunhut S, Levin M, Kaplan DL. *Medical engineering and Physics* 2010; 32:1065-73.
61. Herschorn S, Gajewski J, Schulz J, Corcos J. A population-based study of urinary symptoms and incontinence: the Canadian Urinary Bladder Survey. *BJU Int* 2007; 101:52-58.
62. Hill M, Wernig A, Goldspink G. Muscle satellite (stem) cell activation during local tissue injury and repair. *J Anat* 2003; 203: 89-99.
63. Hitachi K, Tsuchida K. Role of microRNAs in skeletal muscle hypertrophy. *Front Physiol* 2014; 4:1-7.
64. Hinz B, Gabbiani G. Mechanisms of force generation and transmission by myofibroblasts. *Curr Opin Biotechnol* 2003; 14:538–546.
65. Holzer B, Rosen HR, Novi G, Ausch C, Holbling N, Schiessel R. Sacral nerve stimulation for neurogenic faecal incontinence. *Br J Surg* 2007; 94:749-53.
66. Huang L, Cormie P, Messerli MA, Robinson KR. The involvement of Ca²⁺ and integrins in directional responses of zebrafish keratocytes to electric fields. *J Cell Physiol* 2009; 219:162-172.
67. Hvidman L, Foldspang A, Mommsen S, Nielsen JB. Correlates of urinary incontinence in pregnancy. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct* 2002; 13:278-83.

68. Jennings JA, Chen D, Feldman DS. Upregulation of chemokine (C-C motif) ligand 20 in adult epidermal keratinocytes in direct current electric fields. *Arch Dermatol Res* 2010; 302:211-20.
69. Jia L, Wang R, Tang DD. Abl regulates smooth muscle cell proliferation by modulating actin dynamics and ERK1/2 activation. *Am J Physiol Cell Physiol* 2012; 302:1026–34.
70. Jin T, Xu X, Hereld D. Chemotaxis, chemokine receptors and human disease. *Cytokine* 2008; 44:1-8.
71. Jones TE, Stephenson KW, King JG, Knight KR, Marshall TL, Scott WB. Sarcopenia mechanisms and treatments. *Journal of Geriatric Phys Therap* 2009; 32:39-45.
72. Jung KW, Yang DH, Yoon IJ, Seo SY, Koo HS, Lee HJ, et al. Electrical Stimulation Therapy in Chronic Functional Constipation: Five Years' Experience in Patients Refractory to Biofeedback Therapy and With Rectal Hyposensitivity. *J Neurogastroenterol Motil* 2013; 19: 366–73.
73. Jung SY, Fraser MO, Ozawa H, Yokoyama O, Yoshiyama M, Groat WC, et al. Urethral afferent nerve activity affects the micturition reflex; implication for the relationship between stress incontinence and detrusor instability. *J Urol* 1999; 162: 204-212.
74. Kawahara Y, Yamaoka K, Iwata M, Fujimura M, Kajiume T, Magaki T, et al. Novel electrical stimulation sets the cultured myoblast contractile function to on. *Pathobiology* 2006; 73:288–94.
75. Keast JR. Plasticity of pelvic autonomic ganglia and urogenital innervation. *Int Rev Cytol* 2006; 248:141–208.
76. Kitchen S, Young S. Reparo dos tecidos. In: Kitchen S. *Eletroterapia: prática baseada em evidências*. Manole, 2 ed. São Paulo: 2003; p. 45-56.
77. Knorst MR, Cavazzoto K, Henrique M, Resende TL. Intervenção fisioterapêutica em mulheres com incontinência urinária associada ao prolapso de órgão pélvico. *Rev Bras Fisioter* 2012; 16: 102-107.

78. Koppes AN, Nordberg AL, Paolillo GM, Goodsell MN, Darwish HA, Zhang L, et al. Electrical Stimulation of Schwann Cells Promotes Sustained Increases in Neurite Outgrowth. *Tis Eng* 2014; 20: 494–506.
79. Kopp Z, Irwin DE, Agatep B, Milsom I, Abrams P. Worldwide Estimates of Current and Future Individuals (≥ 20 years) With Lower Urinary Tract Symptoms Including Urinary Incontinence and Overactive Bladder. Poster presentation, 4th International Consultation on Incontinence. Paris 2008.
80. Krhut J, Holy P, Tintera J, Zachoval R, Zvara P. Brain activity during bladder filling and pelvic floor muscle contractions: A study using functional magnetic resonance imaging and synchronous urodynamics. *Int J Urol* 2014; 21:169-174.
81. Levin M. Large-scale biophysics: ion flows and regeneration. *Trends Cell Biol* 2007; 17:251-310.
82. Levin M. Bioelectric mechanisms in regeneration: unique aspects and future perspectives. *Seminars in Cell & Development Biology* 2009; 20:543-6.
83. Lien KC, Mooney B, DeLancey JO, Ashton-Miller JA. Levator ani muscle stretch induced by simulated vaginal birth. *Obstet Gynecol* 2004; 103:31-40.
84. Liapis A, Bakas P, Pafiti A, Frangos-Plemenos M, Arnoyannaki N, Creatsas G. Changes of collagen type III in female patients with genuine stress incontinence and pelvic floor prolapse. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2001; 97:76-9.
85. Macdonald KK, Cheung CY, Anseth KS. Cellular delivery of TGFbeta(1) promotes osteoinductive signalling for bone regeneration. *J Tis Engin Regen Med* 2007; 1:314-317.
86. Maffiuletti NA. Physiological and methodological considerations for the use of neuromuscular electrical stimulation. *Eur J Appl Physiol* 110:223–234, 2010.
87. Mackey AL, Brandstetter S, Schjerling P, Bojsen-Moller J, Qvortrup K, Pedersen MM, et al. Sequenced response of extracellular matrix deadhesion and fibrotic regulators after muscle damage is involved in protection against future injury in human skeletal muscle. *FASEB J* 2011; 25:1943-59.

88. Mellado M, Rodríguez-Frade JM, Mañes S, Martínez AC. Chemokine signaling and functional responses: the role of receptor dimerization and TK pathway activation. *Annu Rev Immunol* 2001; 19:397-421.
89. Messelink B, Benson T, Berghmans B, Bo K, Corcos J, Fowler C, Laycock J, Lim PH, Van-Lausen R, Nijeholt GL, Pemberton J, Wang A, Watier A, Van-Kerrebroeck P. Standardisation of terminology of pelvic floor muscle function and dysfunction: report from the pelvic floor clinical assessment group of the international continence society. *Neurourol Urodynamics* 2005; 24:374-380.
90. Milsom I, Altman D, Lapitan MC, Nelson R, Sillén U, Thom D. Epidemiology of Urinary (UI) and Faecal (FI) Incontinence and Pelvic Organ Prolapse (POP). In: Abrams P, Cardozo L, Khoury S, Wein A, (Org.). *Incontinence. 4th International Consultation on Incontinence, Paris July 5-8, 2008*. Health Publication Ltd: 2009; p. 35-112.
91. Mitchell KJ, Pannérec A, Cadot B, Parlakian A, Besson V, Gomes ER, Marazzi G, Sasso DA. Identification and characterization of a nonsatellite cell muscle resident progenitor during postnatal development. *Nature Cell Biology* 2010; 12: 257-66.
92. Moore KL, Dalley AF. *Anatomia orientada para clínica*. 4 ed. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro: 2011; p. 342-346.
93. Morgan DM, Kaur G, Hsu Y, Fenner D, Guire K, Miller J, DeLancey JO. Does vaginal closure force differ in the supine and standing positions? *Am J Obstet Gynecol* 2005; 192:1722-8.
94. Mørkved S, Salvesen KA, Bø K, Eik-Nes S. Pelvic floor muscle strength and thickness in continent and incontinent nulliparous pregnant women. *Int Urogynecol J* 2004; 15:384–390.
95. Mchugh MP, Magnusson SP, Gleim GW; Nicholas JA. Viscoelastic stress relaxation in human skeletal muscle. *Med Sei Sports Exerc* 1992; 24:1375-82.
96. Myers DL. Female mixed urinary incontinence: a clinical review. *JAMA* 2014; 311: 2007-14.

97. National Institute of Health. NIH State-of-the-Science Conference Statement on Prevention of Fecal and Urinary Incontinence in Adults 2007; 24:1-37.
98. Nayal A, Webb DJ, Horwitz AF. Talin: an emerging focal point of adhesion dynamics. *Curr Opin Cell Biol* 2004; 16:94–98.
99. Nelson RL. Epidemiology of fecal incontinence. *Gastroenterology* 2004; 126:S3-S7.
100. Nolasco J, Martins L, Berquo M, Sandoval RA. Atuação da cinesioterapia no fortalecimento muscular do assoalho pélvico feminino: revisão bibliográfica. *Efdeportes* 2008; 12:1-7.
101. Nordin M, Frankel VH. *Biomecânica básica do sistema musculoesquelético*. 3 ed. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro: 2003; p.128-151.
102. Nygaard I, Barber MD, Burgio KL, Kenton K, Meikle S, Schaffer J, et al. Prevalence of symptomatic pelvic floor disorders in us women. *JAMA* 2008; 300:1311-16.
103. O'Boyle AL, O'Boyle JD, Davis BCGD. Pelvic organ support in pregnancy and postpartum. *Int Urogynecol J* 2005; 16:69-72.
104. Pedraza R, Nieto J, Ibarra S, Haas EM. Pelvic muscle rehabilitation: a standardized protocol for pelvic floor dysfunction. *Adv Urol* 2014; 2014:1-7.
105. Pernambuco AP, Carvalho NM, Santos AH. A eletroestimulação pode ser considerada uma ferramenta válida para desenvolver hipertrofia muscular? *Fisioter Mov* 2013; 26: 123-131.
106. Petrella JK, Kim JS, Mayhew DL, Cross JM, Bamman MM. Potent myofiber hypertrophy during resistance training in humans is associated with satellite cell-mediated myonuclear addition: a cluster analysis. *J Appl Physiol* 1985; 104: 1736-42.
107. Petricevic L, Unger FM, Viernstein H, Kiss H. Randomized, double-blind, placebo-controlled study of oral lactobacilli to improve the vaginal flora of postmenopausal women. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2008; 141:54-7.

108. Persu C, Chapple CR, Cauni V, Gutue S, Geavlete P. Pelvic organ prolapse quantification system (POP-Q) – a new era in pelvic prolapse staging. *J Med Life* 2011; 4:75-81.
109. Pinheiro BF, Franco GR, Feitosa SM, Yuaso DR, Castro RA, Girão MJBC. Fisioterapia para consciência perineal: uma comparação entre as cinesioterapias com toque digital e com auxílio do biofeedback. *Fisioter Mov* 2012; 25:639-4.
110. Pretlove SJ, Radley S, Toozs-Hobson PM, Thompson PJ, Coomarasamy A, Khan KS. Prevalence of anal incontinence according to age and gender: a systematic review and meta-regression analysis. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct* 2006; 17:407-417.
111. Putman CT, Sultan KR, Wassmer T, Bamford JA, Skorjanc D, Pette D. Fiber-Type Transitions and Satellite Cell Activation in Low-Frequency-Stimulated Muscles of Young and Aging Rats. *The Journals of Gerontology* 2001; 56:B510-9.
112. Rao SSC. Pathophysiology of adult fecal incontinence. *Gastroenterology* 2004; 126:S14-S2.
113. Relaix F, Wei XJ, Wu X, Sassoon DA. Peg3/Pw1 is an imprinted gene involved in the TNF-NFkappaB signal transduction pathway. *Nature Genet* 1998; 18:287-291.
114. Rett MT, Simões JA, Herrmann V, Gurgel MSC, Morais SS. Qualidade de vida em mulheres após tratamento da incontinência urinária de esforço com fisioterapia. *Rev Bras Ginecol Obstet.* 2007; 29:134-40.
115. Robinson KR. The responses of cells to electrical fields: review. *JCell Biol* 1985; 101:2023-27.
116. Rosário JLR; Marques AP; Maluf AS. Aspectos clínicos do alongamento: uma revisão de literatura. *Rev Bras Fisioter* 2004; 8:83-88.
117. Rosenbaum TY. Pelvic floor physiotherapy for women with urogenital dysfunction: indications and methods. *Minerva Urol Nefrol* 2011; 63:1-7.

118. Rowlands AS, Cooper-White JJ. Directing phenotype of vascular smooth muscle cells using electrically stimulated conducting polymer. *Biomaterials* 2008; 29:4510–4520.
119. Royer CL, Howell JC, Morrison PR, Srour EF, Yoder MC. Muscle-derived CD45-SCA-1+c-kit- progenitor cells give rise to skeletal muscle myotubes in vitro. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 2002; 38:512-7.
120. Samuelsson EC, Victor FTA, Tibbin G, Svardsudd K. Signs of genital prolapse in a Swedish population of women 20 to 59 years of age and possible related factors. *Am J Obstet Gynecol* 1999; 180:299–305.
121. Sebe P, Fritsch H, Oswald J, Schwentner C, Lunacek A, Bartsch G, Radmayr C. Fetal development of the female external urinary sphincter complex: an anatomical and histological study. *J Urol* 2005; 173:1738–1742.
122. Sengupta P. A scientific review of age determination for a laboratory rat: how old is it in comparison with human age? *Biomedicine International* 2011; 2: 81-89.
123. Seratii M, Salvatore S, Khullar V, Uccella S, Bertelli E, Ghezzi F, Bolis P. Prospective study to assess risk factors for pelvic floor dysfunction after delivery. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2008; 87:313–8.
124. Silva D. Estudo comparativo da força muscular do assoalho pélvico em mulheres sedentárias e mulheres que praticam atividade física. Trabalho de conclusão de curso de fisioterapia. Universidade da Amazônia 2006; p. 67.
125. Siu PM, Alway SE. Id2 and p53 participate in apoptosis during unloading-induced muscle atrophy. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2005; 288:C1058-73.
126. Siu PM, Pistilli EE, Butler DC, Alway SE. Aging influences cellular and molecular responses of apoptosis to skeletal muscle unloading. *Am J Physiol Cell Physiol* 2005; 288:C338-49.
127. Solana A, Alós RYM, Ruiz D. Tratamiento neuromodulador en pacientes con incontinencia anal. *GH Continuada* 2007; 6:32-35.

128. Soldevila G, García-Zepeda EA: The role of the Jak-Stat pathway in chemokine-mediated signaling in T lymphocytes. *Signal Transduct* 2007; 7:427-38.
129. Souza C, Lima RM, Bezerra LMA, Pereira RW, Moura TK, Oliveira RL. Estudo comparativo da função do assoalho pélvico em mulheres continentas e incontinentes na pós menopausa. *Rev Bras Fisioter* 2009; 13:535-41.
130. Stern-Straeter J, Bach AD, Stangenberg L, Foerster VT, Horch RE, Stark GB, Beier JP. Impact of electrical stimulation on three-dimensional myoblast cultures - a real-time RT-PCR study. *J Cell Mol Med* 2005; 9:883–92.
131. Strohbehn K. Normal pelvic floor anatomy. *Obstetrics & Gynecology Clinics of North América* 1998; 25:683-705.
132. Tamaki T, Akatsuka A, Ando K, Nakamura H, Matsuzawa H, Hotta T, Roy RR, Edgerton VR. Identification of myogenic-endothelial progenitor cells in the interstitial spaces of skeletal muscle. *J Cell Biol* 2002; 157: 571–577.(a)
133. Tamaki T, Akatsuka A, Yoshimura S, Roy RR, Edgerton VR. New fiber formation in the interstitial spaces of rat skeletal muscle during postnatal growth. *J Histochem Cytochem* 2002; 50:1097-1111.(b)
134. Tamaki T, Uchiyama Y, Akatsuka A. Plasticity and physiological role of stem cells derived from skeletal muscle interstitium: contribution to muscle fiber hyperplasia and therapeutic use. *Curr Pharm Des* 2010; 16:956-67.
135. Thelen M: Dancing to the tune of chemokines. *Nat Immunol* 2001; 2:129-34.
136. Thom DH, Nygaard IE, Calhoun EA. Urologic diseases in America project: urinary incontinence in women-national trends in hospitalizations, office visits, treatment and economic impact. *J Urol* 2005; 173:1295.
137. Thor KB, de Groat WC. Neural control of the female urethral and anal rhabdosphincters and pelvic floor muscles. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2010; 299:R416-38.
138. Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C, Brown RA. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002; 3:349-363.

139. Torrisi G, Minini G, Bernasconi F, Perrone A, Trezza G, Guardabasso V, et al. A prospective study of pelvic floor dysfunctions related to delivery. *Eur J of Obstet Gynecol Reprod Biol* 2012; 160:10-115.
140. Tsai FC, Seki A, Yang HW, Hayer A, Carrasco S, Malmersjö S, et al. A polarized Ca^{2+} , diacylglycerol and STIM1 signalling system regulates directed cell migration. *Nat Cell Biol* 2014; 16:133-144.
141. Ulmsten U, Ekman G, Giertz G, Malmstrom A. Different biochemical composition of connective tissue in continent and stress incontinent women. *Acta obstetricia et gynecologica Scandinavica* 1987; 66:455-7.
142. Vonthein R, Heimerl T, Schwandner T, Ziegler A. Electrical stimulation and biofeedback for the treatment of fecal incontinence: a systematic review. *Int J Colorectal Dis* 2013; 28:1567-1577.
143. Wamhoff BR, Bowles DK, McDonald OG, Sinha S, Somlyo AP, Somlyo AV, et al. L-type voltage-gated Ca^{2+} channels modulate expression of smooth muscle differentiation marker genes via a Rho kinase/myocardin/Srf-dependent mechanism. *Circ Res* 2004; 95:406-14.
144. Wang XH. MicroRNA in myogenesis and muscle atrophy. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2013; 16:258-66.
145. Wang Y, Rouabhia M, Zhang Z. Pulsed electrical stimulation benefits wound healing by activating skin fibroblasts through the $TGF\beta 1/ERK/NF-\kappa B$ axis. *Biochim Biophys Acta* 2016; 1860:1551-9.
146. Watson T. The role of electrotherapy in contemporary physiotherapy practice. *Manual Therapy* 2000; 5:132-141.
147. Widmann C, Gibson S, Jarpe MB, Johnson GL. Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol Rev* 1999; 79:143–80.
148. Wieslander CK, Rahn DD, McIntire DD, Acevedo AJF, Drewes PG, Yanagisawa H, Word RA. Quantification of pelvic organ prolapse in mice:

vaginal protease activity precedes increased mopq scores in fibulin 5 knockout mice. *Biol Reprod* 2009; 80:407–414.

149. Worsøe J, Rasmussen M, Christensen P, Krogh K. Neurostimulation for neurogenic bowel dysfunction. *Gastroenterol Res Parct*. 2013; 563294:1-8.
150. Wright G. Urinary incontinence in older women: a review of conservative therapeutic interventions. *Rev Clin Gerontol* 2014; 24:93-104.
151. Wyndaele JJJ, Poortmans A. Functional and histological effects of intravaginal electrical stimulation on the pelvic muscles: a study in the rat. *Int Urogynecol J*. 2006; 17:444-448.
152. Xu X, Menees SB, Zochowski MK, Fenner DE. Economic cost of fecal incontinence. *Dis Colon Rectum* 2012; 55:586-98.
153. Zetterstrom J, Mellgren A, Jensen LL, Wong WD, Kim DG, Lowry AC, et al. Effect of delivery on anal sphincter morphology and function. *Dis Colon Rectum* 1999; 42:1253-1260.
154. Zhang Y, Bicek AD, Wang G, Timm GW. Effects of periurethral neuromuscular electrical stimulation on the voiding frequency in rats. *Int Urogynecol J* 2010; 21:1279-1284.
155. Zhao M, Penninger J, Isseroff RR. Electrical Activation of Wound-Healing Pathways. *Adv Skin Wound Care* 2010; 1:567-573.
156. Zutshi M, Salcedo LB, Zaszczurynski PJ, Hull TL, Butler RS, Damaser MS. Effects of Sphincterotomy and Pudendal Nerve Transection on the Anal Sphincter in a Rat Model. *Diseas Colon & Rectum* 2009; 52:1321-29.

Brasília, 19 de abril de 2013.

Parecer 004/13.

Da: Comissão de Ética em Uso de Animais do UniCEUB – CEUA / UniCEUB.

Para: Hugo Alves de Sousa.

Assunto: Encaminhamento do Parecer Nº 004/13 do Projeto TCD (A) 001/12.

Prezado Pesquisador,

Encaminhamos o parecer do Projeto TCD (A) 001/12 “**Análise Morfométrica dos Músculos do Assoalho Pélvico Após Eletroestimulação em Ratas Wistar**”, atendeu a todas as solicitações apontadas; está **aprovado** por esta Comissão de Ética no Uso de Animais e em condições de ser iniciado.

Ressaltamos a necessidade de atenção aos Incisos I ao X do Art. 9º da Resolução Normativa 01/2010 CONCEA/MCT concernentes às responsabilidades do pesquisador, professores e técnicos responsáveis.


Cordialmente,



Ranieri Rodrigues de Oliveira
Comissão de Ética no Uso de Animais/ UniCEUB
Presidente

Ranieri Rodrigues de Oliveira
CEUA/UniCEUB

Electrical stimulation structurally affects the tissues of the rectum and anus of nulliparous rats

Hugo Alves de Sousa,¹ Maria da Glória da Silva,² Keyla de Paula Barbosa,³ Leonora Maciel de Souza Vianna,⁴ Yolanda Galindo Pacheco,¹ José Roberto Pimenta de Godoy¹ and Selma Aparecida Souza Kuckelhaus^{1,5} 

¹Laboratory of Molecular Anatomy and Nanomedicine, Area of Morphology, Faculty of Medicine, University of Brasília, Brasília, Federal District, Brazil

²Laboratory of Histology, Area of Morphology, Faculty of Medicine, University of Brasília, Brasília, Federal District, Brazil

³Labocien, University Center of Brasília UNICEUB, Brasília, Federal District, Brazil

⁴Area of Pathology, Faculty of Medicine, University of Brasília, Brasília, Federal District, Brazil

⁵Laboratory of Cell Immunology, Area of Pathology, Faculty of Medicine, University of Brasília, Brasília, Federal District, Brazil

Abstract

Considering that the muscles of the anus perform a critical role in maintaining continence, losses in their structure can negatively affect the physiological control of the intestinal contents. Anorectal electro-stimulation (ARES) has been reported to have a positive effect on the functionality of treated patients, but how ARES affects the structural tissues of the anorectal segment remains unknown. Because the study of how ARES structurally affects human tissues is not possible, this study aimed to clarify these effects in a murine model, which has a similar anorectal segment (structure and physiology) to humans. For the descriptive and comparative study, randomly selected nulliparous adult Wistar rats ($n = 5$) were submitted to 30 anorectal sessions of ARES with a biphasic current (700 μ s, 50 Hz from 2 to 4 mA). After treatment, the animals were euthanized, and the anorectal segments were dissected and processed for histopathological analysis. Our results showed that ARES increased the widths of the mucosal, submucosal and muscle layers of the rectum, as well as the number of leukocytes in the mucosa. ARES also caused hyperplasia of the smooth muscle of the internal anal sphincter and hypertrophy of the external anal sphincter muscle. In conclusion, our results showed that ARES had not only a positive effect on the structure (morphology) of all tissues associated with the rectum and anus but, more importantly, on the structural gain of the muscles (hyperplasia and hypertrophy), which could point to a functional gain of the anal sphincter, reinforcing the applicability of ARES as a non-invasive treatment for anal incontinence.

Key words: anal sphincter; electrical stimulation; fecal incontinence; histology; rectum.

Introduction

The muscles associated with the anus are critical in maintaining continence. The integrated action of the muscles of the sphincter and pelvis, rectal compliance, consistency of the feces and the intestinal transit time cooperate in maintaining voluntary continence (Saad et al. 2002). Failures in this integration can cause a loss of physiological control of the intestinal contents, resulting in physical and psychological disability, loss of self-esteem and consequently a reduction in the quality of life of individuals affected by fecal

incontinence (Yiou et al. 2001; Rao, 2004). Although there are few epidemiological surveys, fecal incontinence is present in an estimated 2–33% of the population (Whitehead et al. 2009; Brown et al. 2012) and is more common in older women, possibly due to complications related to vaginal delivery mechanisms (Snoks et al. 1990).


Therapeutic approaches applied to the treatment of fecal incontinence (FI) depend on its severity. Conservative treatment is intended for patients for whom clinical evaluation and diagnostic methods have not identified significant structural or functional lesions, while invasive approaches are intended for more severe cases in which tissue damage and/or marked dysfunction are verified and for whom non-invasive treatments do not work (Van Koughnett & Wexner, 2013; Duelund-Jakobsen et al. 2016).

Among conservative and noninvasive treatments, food re-education, diarrhea control, biofeedback techniques and

Correspondence

Selma Aparecida Souza Kuckelhaus, Area of Morphology, Faculty of Medicine, University of Brasília, Campus Darcy Ribeiro, Brasília, 70910-000 Federal District, Brazil. E: selmask@gmail.com

Accepted for publication 6 April 2017

Dispatch: 3.5.17	CE: Sobana
No. of pages: 7	PE: Rija J
WILEY	
12635	Manuscript No.
J O A	Journal Code
	



Selma KÜCKELHAUS <selmask@gmail.com>

Submission Confirmation for Neuromuscular electrical stimulation caused hypertrophy in the pelvic floor tissues of female rats

1 mensagem

Physiotherapy <eesserver@eesmail.elsevier.com>
Responder a: Physiotherapy <physiotherapy@elsevier.com>
Para: selmask@gmail.com, selmak@unb.br

9 de maio de 2017 11:25

Dear Professor KUCKELHAUS,

Your submission entitled "Neuromuscular electrical stimulation caused hypertrophy in the pelvic floor tissues of female rats" has been received by Physiotherapy

You may check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author. The URL is <https://ees.elsevier.com/physt/>.

Your username is: selmask@gmail.com

If you need to retrieve password details, please go to: http://ees.elsevier.com/PHYST/automail_query.asp.

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Elsevier Editorial System
Physiotherapy

Quadro 1. Escala de Ortiz. Classificação funcional do assoalho pélvico de acordo com a contração voluntária.

Grau	Função subjetiva Visualização da contração em posição ginecológica	À palpação
0	Ausente	Ausente
1	Ausente	Reconhecível
2	Débil	Reconhecível
3	Presente	Sem resistência
4	Presente	Com resistência <5 (resistência mantida)
5	Presente	Com resistência >5 (resistência mantida)

Fonte: Contreras Ortiz O, Coya Nuñez F, Ibañez G. Evaluación funcional del piso pelviano femenino (clasificación funcional). Bol Soc Latinoam Uroginecol Cir Vaginal 1994; 1: 5-9.