

**ANA LUCIA CARNEIRO SARMENTO**

**EFEITO DA ELETROESTIMULAÇÃO TRANSVAGINAL NOS TECIDOS DO  
ASSOALHO E DE ÓRGÃOS PÉLVICOS DE RATAS WISTAR  
MULTÍPARAS E NULÍPARAS**

Brasília, Distrito Federal

2023

**ANA LUCIA CARNEIRO SARMENTO**

**EFEITO DA ELETROESTIMULAÇÃO TRANSVAGINAL NOS TECIDOS DO  
ASSOALHO E DE ÓRGÃOS PÉLVICOS DE RATAS WISTAR  
MULTÍPARAS E NULÍPARAS**

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

**Orientadora:** Profa. Dra. Selma Aparecida Souza Kückelhaus

**Co-orientador:** Prof. Dr. Hugo Alves de Sousa

Brasília, Distrito Federal

2023

Se

Sarmiento, Ana Lucia Carneiro

EFEITO DA ELETROESTIMULAÇÃO TRANSVAGINAL NOS  
TECIDOS DO ASSOALHO E DE ÓRGÃOS PÉLVICOS DE RATAS  
WISTAR MULTÍPARAS E NULÍPARAS / Ana Lucia Carneiro Sarmiento;  
orientador Selma Aparecida Souza Kückelhaus; co-orientador Hugo  
Alves de Sousa. -- Brasília,2023.  
105p.

Tese (Doutorado em Ciências Médicas) -- Universidade de Brasília,2023

1. assoalho pélvico. 2. força muscular do assoalho  
pélvico. 3. músculos do assoalho pélvico. 4. disfunções do assoalho  
pélvico. 5. fraqueza muscular do assoalho pélvico. I. Kückelhaus, Selma  
Aparecida Souza, orient. II. de Sousa, Hugo Alves, co-orient. III. Título.

## **TERMO DE APROVAÇÃO**

**ANA LUCIA CARNEIRO SARMENTO**

**EFEITO DA ELETROESTIMULAÇÃO TRANSVAGINAL NOS TECIDOS DO  
ASSOALHO E DE ÓRGÃOS PÉLVICOS DE RATAS WISTAR  
MULTÍPARAS E NULÍPARAS**

Tese aprovada em 27 de fevereiro de 2023 como requisito para a obtenção do grau de Doutora 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 Souza Kückelhaus**

Universidade de Brasília

Presidente da banca

**Profa. Dra. Renata Oliveira Soares**

Membro Externo à Instituição – FEPECS

**Prof. Dr. Amilcar Sabino Damazo**

Membro Externo ao Programa – UnB

**Profa. Dra. Letícia Martins Paiva**

Membro Externo à Instituição – UniCEUB

**Prof. Dr. Leonel Alves de Oliveira**

Membro Externo à Instituição - ANVISA

Brasília, 27 de fevereiro de 2023

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho a Deus e aos meus filhos.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por ter me concedido fé, forças, resiliência, paciência, para realizar esse trabalho, alcançando esse objetivo muito almejado nesta etapa difícil e importante da minha vida.

Aos meus queridos pais, Argemiro Carneiro da Silva, “*in memoriam*”, e Maria das Dores Gomes Carneiro da Silva, “*in memoriam*”, por terem me ensinado que nunca é tarde para alcançar sonhos e objetivos.

Aos meus amados filhos Gustavo Carneiro Sarmiento e Guilherme Carneiro Sarmiento, por terem me apoiado e incentivado sempre.

Às minhas estimadas noras Rita Helena Ferreira Moura e Marina Neis Ramos pelo apoio.

À minha querida família: irmãos, irmãs, sobrinhos e sobrinhas, por me emitirem manifestações de ânimo.

À minha orientadora Profa. Dra. Selma Aparecida Souza Kückelhaus, por me aceitar, incentivar, apoiar, encorajar e tornar possível a realização deste trabalho com sua experiência pioneira e exemplar na área de Morfologia junto ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Medicina (FM) da Universidade de Brasília (UnB).

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Hugo Alves de Sousa, por ter me despertado e encorajado para realizar esse trabalho, continuação da linha de pesquisa da área de Morfologia da FM/UnB, da qual foi o pioneiro, sempre me ajudando com muita dedicação e paciência, atuando sempre de forma exemplar e incentivadora.

Aos meus colegas professores da área de Morfologia/FM/UnB, com os quais me relacionei: Dra. Yolanda Galindo Pacheco, MsC. Vicente Perez Carrascosa, “*in memoriam*”, MsC. Paulo Maurício de Oliva Fonte Boa, Dra. Jussara Rocha Ferreira,

Dra. Viviane Urbini Vomero, Dra. Fabíola Cristina Ribeiro Zucchi e com os quais ainda convivo: Dr. José Roberto Pimenta de Godoy, Dr. José Roberto de Souza de Almeida Leite, Dr. José Eduardo Baronesa, MsC Fábio da Costa Sales, Dr. Hudson Fernando Nunes Moura, Dra. Flora Aparecida Milton e Dr. Amilcar Damazo Sabino, pela troca de experiências, amizade e pelo companheirismo.

Ao professor da área de Patologia da FM/UnB, Dr. Gustavo Henrique Soares Takano, pela atenção e ajuda incondicional na descrição técnica de imunohistoquímica.

À professora da área de Patologia da FM/UnB, Dra. Leonora Maciel de S. Vianna, pela ajuda incondicional na análise histopatológica.

À MsC. Maria da Glória Silva, servidora técnica da área de Morfologia/FM/UnB, pela amizade e confecção da maior parte do material histológico deste trabalho com muita dedicação e maestria.

Aos demais servidores técnicos da área de Morfologia/FM/UnB com os quais me relacionei: Abel de Souza Barbosa, Raimundo Rodrigues, Natalino Dias Santos, Mauro Freitas e com os quais ainda convivo: MsC Giulliano Rezende Silva, Dr. Daniel Carneiro Moreira, Abimael Melo Nunes, Flávia Geordana Damasceno Araújo, MsC. Marianna de Souza Soares, MsC Wanessa Felix Cabral e Phellip de Carvalho, pela presteza, amizade e disponibilidade sempre.

À Coordenadora do Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas da FM/UnB, Profa Dra. Laila Salmen Espindola pela atenção nas resoluções das questões acadêmicas pertinentes relativas à minha pessoa.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da FM/UnB, pelos ensinamentos prestados, com os quais muito aprendi.

Aos colegas alunos do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da FM/UnB, principalmente Andreanne Gomes Vasconcelos pelo convívio e amizade.

Aos servidores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da FM/UnB, em especial ao Gledson Alessandro Ribeiro da Silva, pela dedicação e excelente ajuda nas questões acadêmicas e administrativas pertinentes, principalmente relativas à minha pessoa.

Aos diretores da FM/UnB, Prof. Dr. Gustavo Adolfo Sierra Romero e Profa. Dra. Gilvânia Coutinho Silva Feijó pela atenção e presteza nas resoluções das questões acadêmicas e administrativas relativas à minha pessoa.

Aos servidores da secretaria de áreas da FM/UnB, principalmente Nivia Eulália Santos, Eloisa de Fátima Cunha, Shirley Xavier Ramos Santos, Maria Vitória Ramos da Silva Lima, e da secretaria da direção da FM/UnB, principalmente Gilvan Laurentino da Silva, pela presteza nos atendimentos administrativos prestados à minha pessoa.

Finalmente a todos que, de forma direta ou indireta, me auxiliaram no decorrer deste trabalho.

“Sonhar com o impossível é o primeiro passo  
para torná-lo possível”.

Confúcio

“Sonhos não morrem, apenas adormecem  
na alma da gente”.

Chico Xavier

“Tudo tem o seu tempo determinado, e há tempo  
para todo o propósito debaixo do céu”,

Eclesiastes 3:1

## RESUMO

O assoalho pélvico (AP), formado por músculos e fáscias, é o responsável pela sustentação dos órgãos abdominopélvicos, com papel importante na continência urinária/fecal/anal, no fechamento do hiato urogenital e no funcionamento sexual. Alterações estruturais e/ou funcionais do AP pelo envelhecimento, parto vaginal, pela multiparidade, obesidade e outros fatores de risco, podem causar as disfunções como as incontinências e os prolápsos. O tratamento para essas disfunções pode ser cirúrgico ou conservador. A eletroestimulação (EE), um recurso da fisioterapia, vem sendo usada como tratamento conservador e consiste na aplicação de estímulos elétricos intermitentes de baixos níveis de corrente que causam a contração muscular. Entretanto, carecem estudos que avaliem os efeitos da EE diretamente nos tecidos da região pélvica e do períneo. Assim, esse estudo avaliou o efeito da eletroestimulação transvaginal (EV) na histomorfometria dos músculos do AP (MAPs) e nos tecidos associados à vagina, uretra e ao reto de ratas Wistar múltiparas e nulíparas. Trata-se de um estudo descritivo, analítico, comparativo, experimental e prospectivo longitudinal, realizado em ratas Wistar múltiparas (n=10) e nulíparas (n=10) com 12 meses de idade. A EE (30 sessões) foi feita com sonda intravaginal com corrente bifásica, largura de pulso de 700 ms, frequência de 50 Hz e intensidade de 2 mA. Os dados histomorfométricos foram obtidos nos tecidos epitelial, conjuntivo e muscular em espécimes histológicos pélvicos processados com técnicas de rotina e corados com hematoxilina e eosina, tricrômico de Gomori e imunomarcagem com Ki67. Os resultados mostraram que a EV: **1)** aumentou a força de contração dos MAPs em nulíparas e múltiparas; **2)** aumentou a espessura dos MAPs (hipertrofia muscular) em nulíparas e múltiparas; **3)** não aumentou a espessura do epitélio de revestimento da vagina das nulíparas e múltiparas, em relação aos seus grupos controle, mas aumentou na uretra das múltiparas; **4)** aumentou a espessura do tecido conjuntivo associado aos três órgãos pélvicos nas nulíparas e múltiparas; **5)** aumentou a espessura da camada de tecido muscular liso da vagina, uretra e do reto nas múltiparas, assim como da uretra e do reto nas nulíparas; **6)** aumentou o total de leucócitos/200  $\mu\text{m}^2$  nas mucosas das nulíparas e múltiparas; **7)** aumentou o total de fibroblastos/fibrócitos/700  $\mu\text{m}^2$  nas mucosas das múltiparas em relação aos demais grupos; **8)** produziu uma maior imunomarcagem com Ki67+ em células epiteliais basais, endoteliais, musculares lisas e em fibroblastos nas múltiparas, na comparação com seu grupo controle; **9)** produziu uma maior imunomarcagem com Ki67+ em células satélites dos MAPs das nulíparas e múltiparas. O conjunto dos resultados demonstraram que a aplicação de 30 sessões de EV, nos parâmetros utilizados, favoreceu o ganho estrutural/funcional, sobretudo, nos tecidos conjuntivo e muscular, refletindo no aumento da força de contração muscular do AP. Concluindo, esses resultados mostraram uma efetividade da EV em ratas Wistar múltiparas e nulíparas, que pode contribuir para reforçar seu uso na clínica médica visando o fortalecimento do AP e manutenção da continência pelos órgãos pélvicos nas mulheres, que são as mais comumente atingidas pelas disfunções do AP.

**Palavras-chave:** assoalho pélvico; força muscular do assoalho pélvico; músculos do assoalho pélvico; disfunções do assoalho pélvico; fraqueza muscular do assoalho pélvico.

## ABSTRACT

The pelvic floor (PF), formed by muscles and fascia, is responsible for supporting the abdominal and pelvic organs, with an important role in urinary/fecal/anal continence, in the closure of the urogenital hiatus and in sexual functioning. Structural and/or functional alterations of the AP due to aging, vaginal delivery, multiparity, obesity and other risk factors can cause dysfunctions such as incontinence and prolapses. The treatment for these dysfunctions can be surgical or conservative. The electrical stimulation (EE), a physiotherapy resource, has been used as a conservative treatment and consists of the application of intermittent electrical stimuli of low current levels that cause muscle contraction. However, there is a lack of studies that evaluate the effects of EE directly on the tissues of the pelvic region and perineum. Thus, this study evaluated the effect of transvaginal electrical stimulation (VE) on the histomorphometry of the PF muscles (PFMs) and tissues associated with the vagina, urethra and rectum of multiparous and nulliparous Wistar rats. This is a descriptive, analytical, comparative, experimental and prospective longitudinal study, carried out in multiparous (n=10) and nulliparous (n=10) Wistar rats aged 12 months. The EE (30 sessions) was performed with an intravaginal probe with biphasic current, 700 ms pulse width, 50 Hz frequency and 2 mA intensity. Histomorphometric data were obtained from epithelial, connective, and muscular tissues in pelvic histological specimens processed with routine techniques and stained with hematoxylin and eosin, Gomori's trichrome, and immunostaining with Ki67. The results showed that VE: **1)** increased the force of contraction of PFMs in nulliparous and multiparous; **2)** increased the thickness of PFMs (muscle hypertrophy) in nulliparous and multiparous; **3)** did not increase the thickness of the epithelium lining the vagina of nulliparous and multiparous, in relation to their control groups, but increased in the urethra of multiparous; **4)** increased thickness of connective tissue associated with the three pelvic organs in nulliparous and multiparous; **5)** increased the thickness of the smooth muscle tissue layer of the vagina, urethra and rectum in multiparous, as well as the urethra and rectum in nulliparous; **6)** increased the total number of leukocytes/200  $\mu\text{m}^2$  in the mucous membranes of nulliparous and multiparous; **7)** increased total fibroblasts/fibrocytes/700  $\mu\text{m}^2$  in the mucous membranes of multiparous compared to the other groups; **8)** produced a greater immunostaining with Ki67+ in basal epithelial, endothelial, smooth muscle cells and in fibroblasts in multiparous, in comparison with its control group; **9)** produced a greater immunostaining with Ki67+ in PFMs satellite cells from nulliparous and multiparous. The set of results demonstrated that the application of 30 sessions of VE, in the parameters used, favored the structural/functional gain, mainly in the connective and muscular tissues, reflecting in the increase of the force of muscular contraction of the PF. In conclusion, these results showed the effectiveness of VE in multiparous and nulliparous Wistar rats, which can contribute to reinforce its use in the medical clinic, aiming at strengthening the PF and maintaining continence by the pelvic organs in women, who are the most commonly affected by dysfunctions of the PF.

**Keywords:** pelvic floor; pelvic floor muscle strength; pelvic floor muscles; pelvic floor dysfunctions; pelvic floor muscle weakness.

## SUMÁRIO

-	RESUMO	X
-	ABSTRACT	Xi
1	<b>INTRODUÇÃO</b>	1
1.1	CONSTITUINTES DO ASSOALHO PÉLVICO	3
1.2	O ASSOALHO PÉLVICO NA MULHER	4
1.3	PRINCIPAIS DISFUNÇÕES DO ASSOALHO PÉLVICO	5
1.4	FATORES DE RISCO PARA AS DISFUNÇÕES DO ASSOALHO PÉLVICO	8
1.5	TRATAMENTO DAS DISFUNÇÕES DO ASSOALHO PÉLVICO	9
2	<b>OBJETIVOS</b>	12
2.1	OBJETIVO GERAL	13
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
3	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	14
3.1	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	15
3.2	TIPO DE ESTUDO	16
3.3	TIPO DE ANIMAIS	16
3.4	GRUPOS DE ESTUDO	16
3.5	ELETOESTIMULAÇÃO TRANSVAGINAL (EV)	17
3.6	FORÇA DE CONTRAÇÃO MUSCULAR ANTES E APÓS EV	19
3.7	EUTANÁSIA DOS ANIMAIS E OBTENÇÃO DO MATERIAL	19
3.8	PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO E OBTENÇÃO DAS IMAGENS	20
3.9	OBTENÇÃO DOS DADOS HISTOMORFOMÉTRICOS	21
3.9.1	DETERMINAÇÃO DO DIÂMETRO DAS FIBRAS MUSCULARES ESQUELÉTICAS DOS MAPs	21
3.9.2	QUANTIFICAÇÃO DO TOTAL DE FIBRAS MUSCULARES DOS MAPs	21
3.9.3	QUANTIFICAÇÃO DOS MIONÚCLEOS DAS FIBRAS MUSCULARES DOS MAPs	21
3.9.4	MEDIDAS DOS TECIDOS EPITELIAL, CONJUNTIVO E MUSCULAR ASSOCIADOS À VAGINA, À URETRA E AO RETO	22
3.9.5	ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA E HISTOLÓGICA	22
3.9.6	ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA	22
3.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA	24
4	<b>RESULTADOS</b>	26
4.1	AVALIAÇÃO DO EFEITO DA EV NA FORÇA DOS MÚSCULOS DO ASSOALHO PÉLVICO (MAPs)	27
4.2	AVALIAÇÃO DO EFEITO DA EV NOS MAPs	28
4.2.1	DIÂMETRO DAS FIBRAS	28
4.2.2	TOTAL DAS FIBRAS	29
4.2.3	TOTAL DE MIONÚCLEOS	30

4.3	AVALIAÇÃO DO EFEITO DA EV NAS CAMADAS DA VAGINA	32
4.3.1	EPITÉLIO	32
4.3.2	TECIDO CONJUNTIVO	32
4.3.3	CAMADA MUSCULAR	32
4.4	AVALIAÇÃO DO EFEITO DA EE NAS CAMADAS DA URETRA	34
4.4.1	EPITÉLIO	35
4.4.2	TECIDO CONJUNTIVO	35
4.4.3	CAMADA MUSCULAR	35
4.5	AVALIAÇÃO DO EFEITO DA EV NAS CAMADAS DO RETO	37
4.5.1	EPITÉLIO	38
4.5.2	TECIDO CONJUNTIVO	38
4.5.3	CAMADA MUSCULAR	38
4.6	AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA (QUALITATIVA) E HISTOLÓGICA (SEMIQUANTITATIVA) DO TECIDO CONJUNTIVO	40
4.6.1	ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA (QUALITATIVA)	41
4.6.2	ANÁLISE HISTOLÓGICA (SEMIQUANTITATIVA)	41
4.7	AVALIAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR NOS MAPs E NOS TECIDOS ASSOCIADOS AOS ÓRGÃOS PÉLVICOS	42
4.7.1	EPITÉLIO VAGINAL	42
4.7.2	TECIDO CONJUNTIVO	42
4.7.3	ENDOTÉLIO	42
4.7.4	CÉLULAS MUSCULARES LISAS	42
4.7.5	CÉLULAS MUSCULARES ESTRIADAS	43
4.8	SUMÁRIO DOS RESULTADOS	45
5	<b>DISCUSSÃO</b>	46
5.1	CONSIDERAÇÕES SOBRE A MULTIPARIDADE, A PARIDADE E AS DISFUNÇÕES DO AP	48
5.2	EFEITO DA ELETROESTIMULAÇÃO NOS TECIDOS PÉLVICOS	51
5.2.1	TECIDO MUSCULAR	52
5.2.2	TECIDO CONJUNTIVO	59
5.2.3	TECIDO EPITELIAL	62
6	<b>CONCLUSÃO</b>	64
7	<b>LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS</b>	67
8	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	70
9	<b>ANEXOS</b>	86

8	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	71
9	<b>ANEXOS</b>	87

## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

<b>Figura 1</b>	Organograma do Estudo	15
<b>Figura 2</b>	Fotografia da sonda de EV para ratas Wistar	17
<b>Figura 3</b>	Desenho esquemático do registro da força muscular	19
<b>Figura 4</b>	Força de contração basal, reflexa e eletroestimulada dos MAPs das ratas Wistar nulíparas e múltíparas	27
<b>Figura 5</b>	Diâmetro das fibras dos MAPs das ratas Wistar nulíparas e múltíparas	29
<b>Figura 6</b>	Total de fibras dos MAPs das ratas Wistar nulíparas e múltíparas	30
<b>Figura 7</b>	Total de mionúcleos das fibras dos MAPs de ratas Wistar nulíparas e múltíparas	31
<b>Figura 8</b>	Fotomicrografias das fibras musculares estriadas esqueléticas dos MAPs	31
<b>Figura 9</b>	Espessura dos tecidos epitelial (A), conjuntivo (B) e muscular (C) da vagina	33
<b>Figura 10</b>	Fotomicrografias de secções histológicas da vagina	34
<b>Figura 11</b>	Espessura dos tecidos epitelial (A), conjuntivo (B) e muscular (C) da uretra	36
<b>Figura 12</b>	Fotomicrografias de secções histológicas de uretra das ratas Wistar nulíparas e múltíparas	37
<b>Figura 13</b>	Espessura dos tecidos epitelial (A), conjuntivo (B) e muscular (C) do reto	39
<b>Figura 14</b>	Fotomicrografias de secções histológicas do reto das ratas Wistar nulíparas e múltíparas	40
<b>Figura 15</b>	Total de leucócitos e de fibroblastos nas mucosas da vagina, da uretra e do reto das ratas Wistar nulíparas e múltíparas	41
<b>Figura 16</b>	Fotomicrografias de secções histológicas dos MAPs e da vagina - imunomarcção com o anticorpo primário Ki67	44
<b>Tabela 1</b>	Total de células marcadas com Ki67	43
<b>Tabela 2</b>	Sumário dos resultados	45

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

---

<b>AP</b>	Assoalho pélvico
<b>EAE</b>	Esfíncter anal externo
<b>EAI</b>	Esfíncter anal interno
<b>EE</b>	Eletroestimulação
<b>EA</b>	Eletroestimulação intra-anal ou transanal
<b>EV</b>	Eletroestimulação intravaginal ou transvaginal
<b>EUA</b>	Estados Unidos da América
<b>IA</b>	Incontinência anal
<b>IU</b>	Incontinência urinária
<b>IUE</b>	Incontinência urinária de esforço
<b>IUM</b>	Incontinência urinária mista
<b>IUU</b>	Incontinência urinária de urgência
<b>MAP</b>	Musculatura do assoalho pélvico
<b>MAPs</b>	Músculos do assoalho pélvico
<b>MC</b>	Múltiparas controle
<b>MEV</b>	Múltiparas com eletroestimulação transvaginal
<b>MLA</b>	Músculo levantador do ânus
<b>NC</b>	Nulíparas controle
<b>NEV</b>	Nulíparas com eletroestimulação transvaginal
<b>Off</b>	Desligado
<b>On</b>	Ligado
<b>POP</b>	Prolápio de órgão pélvico
<b>UnB</b>	Universidade de Brasília
<b>UnICEUB</b>	Centro Universitário de Brasília
<b>°C</b>	Gráus centígrados
<b>G</b>	Gramas(s)
<b>Hz</b>	Frequência em Hertz
<b>mA</b>	MiliAmpere
<b>mm<sup>2</sup></b>	Milímetro ao quadrado
<b>µm<sup>2</sup></b>	Micrômetro ao quadrado
<b>ms</b>	Milissegundo
<b>%</b>	Porcentagem
<b>20x</b>	Vinte vezes

>	Maior
<	Menor
≈	Semelhante
&	“e”

---

## **1. INTRODUÇÃO**

O assoalho pélvico (AP), um complexo de estruturas musculares e fasciais, que formam uma unidade estrutural, também denominado de pavimento ou diafragma pélvico ou ainda de diafragma musculofascial da pelve, em forma de taça ou funil, situa-se no limite inferior da cavidade pélvica e superior do períneo, circundando o reto, a uretra e a vagina, estendendo-se do púbis ao cóccix e de um lado ao outro da parede pélvica. (Strohbehn 1998; Messelink, 1999; Corton 2009).

O AP é responsável pela sustentação dos órgãos abdominopélvicos, desempenhando um papel importante no processo de continência e excreção urinária e fecal/anal, assim como no funcionamento sexual (Strohbehn 1998; Messelink, 1999; Herschorn 2004; Ashton-Miller & DeLancey 2007; Ashton-Miller & DeLancey 2009; Corton 2009).

O AP é constituído predominantemente de músculos, além de elementos fibromusculares e fibrosos, como a fáscia endopélvica que reveste estes músculos em suas faces superior e inferior (Moore & Dalley 2011; Messelink et al. 2005; Roch et al. 2021). A membrana perineal (diafragma urogenital) e o corpo perineal, ambos localizados inferiormente ao AP, também contribuem para esse diafragma musculofacial da pelve (Peng et al. 2018; Roch et al. 2021).

Os músculos do AP (MAPs) são constituídos por dois tipos de fibras, as do tipo I (de contração lenta) mais numerosas e resistentes à fadiga (Heit et al. 1996), que apresentam atividade tônica (contração normal de repouso), e as do tipo II (de contração rápida, reflexa) permitindo respostas imediatas a mudanças súbitas da pressão intra-abdominal (Gosling et al. 1981; Strohbehn 1998; Wyndaele & Poortmans 2006; Corton 2009). Os MAPs são inervados diretamente pelo ramo anterior de S4 e pelos ramos do nervo pudendo (S2 a S4) (Drake et al. 2015).

Segundo Strohbehn (1998), as estruturas do AP podem ser divididas em passivas e ativas, sendo as passivas os ossos pélvicos e o tecido conjuntivo (fáscia endopélvica) e as ativas a inervação para os músculos e os próprios músculos. Ou seja, estruturas de suporte ativo incluem as neuromusculares que resultam em contrações sustentadas (manutenção do tônus) e intermitentes dos músculos dos MAPs durante a atividade (Strohbehn 1998). Portanto, tanto em estado de repouso quanto no aumento da pressão intra-abdominal, o AP tem que dar suporte aos órgãos pélvicos e isso só será possível se a posição anatômica dos MAPs, sua

atividade em repouso (suporte ativo) e a integridade da fáscia endopélvica (suporte passivo) estiverem adequadas (Messelink et al. 2005; Peng et al. 2018).

### **1.1. CONSTITUINTES DO ASSOALHO PÉLVICO**

Como já foi referido, o AP é constituído predominantemente por músculos revestidos pela fáscia endopélvica.

O músculo levantador do ânus (MLA) e o coccígeo (isquiococcígeo) constituem os MAPs (Corton 2009).

O MLA é uma alça muscular larga com simetria bilateral e constitui a maior parte do AP, sendo formado por vários feixes musculares com diferentes origens e inserções (Corton 2009; Peng et al. 2018). Este músculo é o mais importante do AP, por manter-se em estado constante de contração, proporcionando um piso ativo que suporta o conteúdo abdominopélvico. Além disso, é o principal responsável pela sustentação dos órgãos pélvicos porque ajuda a mantê-los em sua posição e resiste ao aumento de pressão intra-abdominal (Ashton-Miller & DeLancey 2009; Moore & Dalley 2011). O MLA é um complexo muscular composto por três partes principais ou subdivisões ou regiões básicas: pubococcígeo, puborretal e iliococcígeo (Ashton-Miller et al. 2001; Ashton-Miller & DeLancey 2009; Eickmeyer 2017), designadas assim em virtude da direção e fixação de suas fibras (Corton 2009). O músculo pubococcígeo, a porção medial mais volumosa do MLA, é também denominado de complexo pubovisceral, devido à sua associação e fixação às vísceras da linha média, subdividindo-se nas seguintes porções: pubovaginal (na mulher) ou puboprostático (no homem), puboperineal (pubouretral) e puboanal (em ambos) (Lawson 1974; Strohbehn 1998; Herschorn 2004; Ashton-Miller & DeLancey 2009; Corton 2009). A parte puborretal do MLA é importante para a continência fecal/anal pelo fato de unir-se ao seu par para realizar uma alça em forma de U (tipóia) ao redor da junção anorretal, passando pela parte posterior desta, para constituir a flexura (ângulo) anorretal que se torna obtuso (mais retilíneo) no relaxamento de tal músculo, permitindo a defecação (Ashton-Miller & DeLancey 2009). A porção iliococcígea, a parte posterolateral do MLA, é delgada e frequentemente muito pouco desenvolvida; além da função postural, também tem um papel ativo na micção, permitindo o esvaziamento da bexiga (Guerquin 2017).

O músculo coccígeo (isquicocccígeo), o outro componente dos MAPs, que forma a parte posterior do AP, se estende da espinha isquiática ao cóccix e à parte inferior do sacro, complementando esse diafragma pélvico (Herschorn, 2004).

As fáscias pélvicas são divididas em fáscia pélvica parietal (fáscia endopélvica) que reveste as superfícies superiores e inferiores dos MAPs (Corton 2009; Eickmeyer 2017) e fáscia pélvica visceral, que forma a cobertura das vísceras pélvicas, de seus vasos e nervos (Herschorn 2004). A fáscia endopélvica é contínua com a fáscia visceral, que fornece uma cápsula contendo os órgãos e permite deslocamentos e alterações de volume (Herschorn, 2004); sua morfologia e composição variam de acordo com a região anatômica (Roch et al. 2021).

Funcionalmente, o MLA e a fáscia endopélvica desempenham um papel interativo na manutenção da continência e do suporte pélvico (Norton 1993; Ashton-Miller et al. 2001; Roch et al. 2021). O MLA atua na proteção dos ligamentos pélvicos e fáscias do excesso de carga, uma vez que, por manter adequadamente o fechamento do hiato urogenital e manter o tônus muscular constante, faz com que os ligamentos e as estruturas fasciais, que sustentam os órgãos pélvicos, sofram um alívio, fiquem submetidos a uma tensão mínima e simplesmente atuem para estabilizar esses órgãos em sua posição (Ashton-Miller et al. 2001; Ashton-Miller & DeLancey 2009; Corton 2009). Caso os nervos do MLA sejam danificados durante o parto, os músculos sofreriam atrofia, deixando para a fáscia endopélvica o suporte dos órgãos pélvicos, o que, com o tempo, poderia apresentar comportamento viscoelástico, esticando-se gradativamente sob a carga constante, ocasionando o desenvolvimento de prolapso (Ashton-Miller et al. 2001).

Os MAPs que são fundamentais para as continências (urinária, fecal e anal), para a sustentação dos órgãos pélvicos e para a sexualidade humana (Strohbehn, 1998; Rocca 2016), atuam em conjunto (de forma sinérgica) com os músculos perineais do diafragma do triângulo urogenital (esfíncter uretral externo, transverso profundo e superficial do períneo, bulboesponjoso e bulbocavernoso) (Corton 2009; Moore & Dalley 2011).

## **1.2. O ASSOALHO PÉLVICO NA MULHER**

Na mulher, o AP também tem função de manter o hiato urogenital fechado e de atrair as partes distais da uretra, vagina e reto em direção aos ossos púbicos (Corton, 2009), contra a ação de abertura da pressão intra-abdominal, e contribuir

para a continência urinária, fecal e anal, observando-se um aumento na força de fechamento dos óstios uretral, vaginal e anal numa contração voluntária desse complexo muscular (DeLancey 1988; Rocca 2016). O relaxamento após a contração resulta numa redução no suporte para uretra, vagina, ânus, períneo, permitindo os órgãos pélvicos retornarem à posição anatômica de descanso, sendo que os MAPs devem estar relaxados, para remover o mecanismo de continência passiva, numa micção normal (Messelink 1999; Roch et al. 2021).

A fásia endopélvica feminina é uma estrutura de tecido conjuntivo fibroso denso (Ashton-Miller & DeLancey 2007; Roch et al. 2021; Cosma et al. 2021) em monocamada rica em fibras elásticas com muito poucas ou nenhuma fibra muscular lisa, com exceção da área mais posterior perto do reto, que exibe uma maior densidade de fibras musculares lisas (Hirata et al. 2011). A fásia endopélvica atua como ligamento juntamente com os MAPs na fixação e estabilização dos órgãos relacionados com uretra, bexiga, vagina, útero e reto-ânus, e na resistência à força de tensão ocasionada pela pressão intra-abdominal aumentada a cada ciclo ventilatório (inspiração e expiração), na manobra de Valsalva, na tosse, risada, no espirro, orgasmo e ao levantar-se, saltar, correr, erguer objeto pesado (Milsom et al. 2009; Roch et al. 2021, Cosma et al. 2021).

A divisão triangular anterior do períneo, onde se localiza o hiato urogenital, está associada aos óstios dos sistemas urinário (uretra) e genital (vagina) (Rocca 2016). Na divisão triangular posterior do períneo ou trígono anal, onde se localiza o hiato anal, onde se vê o óstio intestinal (ânus), encontra-se o canal anal com seus esfíncteres anal interno (IAI) e anal externo (EAE), importantes para a continência fecal/anal, atuando juntos com os MAPs.

Para o correto funcionamento dos MAPs é necessário que as conexões dos músculos com as estruturas adjacentes, assim como a inervação, estejam intactas; alterações estruturais e ou funcionais nos MAPs podem causar disfunções no AP (Wall 1993).

### **1.3. PRINCIPAIS DISFUNÇÕES DO ASSOALHO PÉLVICO**

O AP na mulher está relacionado aos sistemas urinário, genital e digestório e dessa forma, distúrbios estruturais e/ou funcionais do AP podem levar à perda do controle da micção e da defecação, do suporte dos órgãos pélvicos e da função sexual (Messelink 1999; Messelink et al. 2005). Essas disfunções podem resultar

de atrofia ou fraqueza muscular e, considerando a variedade e o sinergismo entre os tecidos que integram a região pélvica, o envelhecimento também contribui para tais disfunções (Delancey 1994).

A incontinência urinária (IU), incontinência fecal (IF), incontinência anal (IA), assim como o prolápio de órgãos pélvicos (POP), são as principais disfunções do AP (Abrams et al. 2009; Abrams et al. 2013; Abrams et al. 2017). Essas disfunções podem se manifestar em qualquer idade, são mais frequentes nas mulheres, afetam a qualidade de vida por prejudicarem seriamente o bem-estar físico, sexual, higiênico, emocional, psicológico, social e econômico (Wall 1993). De forma geral, as incontinências acarretam depressão, ansiedade, isolamento auto-imposto, constrangimento, ausência no emprego ou perda do mesmo, prejuízos à auto-estima e no relacionamento íntimo, incapacidade de exercer atividade física, podendo precipitar a internação em lares de idosos, afetando também as famílias, cuidadores e a sociedade como um todo (Norton 2004; Whitehead 2005; Melville et al. 2005; Whitehead et al. 2009; Brown et al. 2012; Smith et al. 2013; Meyer & Richter 2015).

A IU é definida pela Sociedade Internacional de Continência e Associação Internacional de Uroginecologia, como perda involuntária de urina e inclui a incontinência urinária de esforço (IUE), a incontinência urinária de urgência (IUU) e a incontinência urinária mista (IUM) (Haylen et al. 2010). A IUE isolada é responsável por aproximadamente metade de toda IU (prevalência de 10 a 39%); a IUM, com poucas exceções, é a próxima mais comum (prevalência de 7,5 a 25%) e a IUU é a menos prevalente (1 a 7%) (Milsom et al. 2013; Milsom et al. 2017). Aproximadamente 10% de todas as mulheres adultas relatam vazamento pelo menos semanalmente, sendo o vazamento ocasional muito mais comum, afetando 25% a 45% (Milsom et al. 2013; Milsom et al. 2017). No estudo de Herschorn et al. (2008) realizado com 518 mulheres no Canadá com idade média de 45 anos, a IU foi relatada por 28,8% delas, sendo 68% relacionada a IUE, seguida por IUM em 21% e IUU em 11%. Num estudo realizado no Brasil, a prevalência de IU entre mulheres, com idade média de 51 anos, foi de 29,7% sendo que em 59,2% a IUU estava associada (Amaro et al. 2008). Em outro estudo brasileiro foi reportado que dentre as mulheres com IU, 23,21% delas também apresentavam a IA (Bezerra et al. 2014). Outros estudos nos EUA apontaram a associação da IU com a IF (Norton

et al. 2004; Melville et al. 2005; Ditah et al. 2014). A IU afete cerca de 25% a 45% mulheres de todo o mundo e de 30% a 60% mulheres de meia idade a idosas (Milsom et al. 2013; Milsom et al. 2017).

As definições de IF e IA não devem ser consideradas como sinônimos, sendo a IF a perda involuntária de fezes, sólida ou líquida, que é um problema social ou de higiene e a IA, além disso, inclui a perda involuntária de flatus, que é sentida por muitos pacientes como sendo igualmente uma desordem incapacitante e antissocial (Norton et al. 2009). Estudos demonstram uma prevalência de IF/IA que varia de 1% a 40% (Melville et al. 2005; Bharucha et al. 2005; Pretlove et al. 2006; Lawrence et al. 2008; Whitehead et al. 2009; Aitola et al. 2010; Bezerra et al. 2014; Ditah et al. 2014). Segundo Bharucha et al. (2015) a prevalência da IA é maior que a da IF. Embora IF/IA sejam consideradas comuns, a prevalência é frequentemente subestimada ou difícil de estimar, devido à relutância dos indivíduos em relatar suas queixas ou procurar atendimento, por causa da sua intimidade e vergonha (Nygaard et al. 2003; Whitehead 2005; Makol et al. 2008; Aitola et al. 2010).

O POP se refere à perda de suporte para o útero, a bexiga, o cólon ou reto, ou até mesmo para o intestino delgado, levando à descida (prolapso) de um ou mais destes órgãos através da parede da vagina, ocasionada pela disfunção dos elementos de estabilização dinâmica e estática da pelve e períneo (Aytan et al. 2014; Corton, 2009). Essa é uma condição comum que afeta a vida de milhões de mulheres (Alperin, 2010), com prevalência de 5 e 10% (Milsom et al. 2017). No entanto, num estudo realizado com 1320 mulheres foi detectado POP em 27,1% delas, e o estudo apontou uma associação com obesidade, paridade, parto vaginal, macrossomia e menopausa (Aytan et al. 2014). O POP é comumente descrito como sendo acima do intróito, no intróito, ou além do intróito vaginal, na presença ou ausência da manobra de Valsalva (Milsom et al. 2009), que possivelmente tem uma relação estreita com a paridade/trabalho de parto.

O suporte direto aos órgãos pélvicos (uretra, bexiga, útero e reto) é fornecido pela vagina e indiretamente pelas estruturas envolvidas no suporte vaginal, com destaque para o MLA e o tecido conjuntivo associado à vagina e a parede lateral pélvica (Norton 1993; DeLancey 1993; Corton 2005); danos a

qualquer componente deste complexo pode resultar na perda do suporte vaginal e no POP (DeLancey 2007; Alperin et al. 2010).

#### **1.4. FATORES DE RISCO PARA AS DISFUNÇÕES DO ASSOALHO PÉLVICO**

Além do envelhecimento, o parto vaginal, a multiparidade, a cirurgia pélvica, a menopausa, a obesidade e a atividade física de alta intensidade constituem fatores de risco para o surgimento das disfunções do AP nas mulheres (Parazzine et al. 2000; Abrams et al. 2009; Abrams et al. 2013; Abrams et al. 2017).

Talvez até mais do que a idade, a obesidade é o fator de risco mais claramente estabelecido para a IU em mulheres (Milson et al. 2013). Em uma ampla gama de estudos, mulheres obesas têm aproximadamente o dobro do risco de desenvolver IU e, apesar da complexa interação entre peso e outros fatores de risco para essa incontinência, tem-se evidências muito robustas para apoiar o papel causal do índice de massa corporal (IMC) no desenvolvimento da IU (Milson et al. 2013). Um estudo mostrou que o IMC foi significativamente mais alto no grupo de mulheres incontinentes em relação ao grupo continente (Amaro et al. 2008). Outros estudos mostram que a perda de peso está associada à melhora ou resolução da IUE e IUU (Subak et al. 2009; Wing et al. 2010).

Outro fator de risco a considerar é o parto vaginal. Este é uma das principais causas de disfunções do AP feminino (IU, IF/IA e POP), as quais são consideradas sequelas inevitáveis para algumas mulheres que sofrem lesões durante esse tipo de parto (Ashton-Miller & DeLancey 2009). A gravidez ocasiona, com o aumento do útero, além de mudanças na posição dos órgãos abdominopélvicos, uma sobrecarga para o AP (O'Boyle et al. 2005); no entanto, é durante o trabalho de parto vaginal, que são observados o aumento da força de compressão, estiramento e cisalhamento que podem danificar o MLA, estruturas fasciais de suporte dos órgãos pélvicos e o nervo pudendo (Dietz & Wilson 2005; Lien et al. 2005), de forma mais grave em algumas mulheres, podendo ter, tais eventos, um papel importante no desenvolvimento das disfunções pélvicas (Anderson 1984; Snooks et al. 1984; Snooks et al. 1985; Snooks et al. 1986; Allen et al. 1990; Tetzschner et al. 1995; Amaro et al. 2003; Whitehead et al. 2009).

De uma forma geral, mesmo na ausência da gestação e paridade, as mulheres podem apresentar disfunções pélvicas por conta de outros fatores de risco. No entanto, a proporção de múltiparas com incontinências e prolapsos é

destacadamente maior em relação às nulíparas (Cardozo et al. 2005; Santos et al. 2006; Abrams et al. 2009; Milson et al. 2017). Dentre as múltiparas as disfunções pélvicas estão relacionadas ao número mais alto de partos vaginais (Amaro et al. 2003; Whitehead et al. 2009; Koelbl et al. 2009) pela repetição de exposição aos eventos inerentes e aos fatores potencialmente lesivos nos partos desse tipo ou até mesmo na sua tentativa (Dietz & Wilson 2005). Portanto, múltiplas gestações e múltiplos partos podem aumentar o risco para o desencadeamento das disfunções pélvicas, sejam logo após o parto ou mais tarde na vida da mulher (Milson et al. 2013).

A multiparidade, como já relatado, constitui um grande fator de risco para todas as disfunções do AP feminino. O estudo do efeito da multiparidade no AP, na vagina, no reto-ânus e na uretra em ratas Wistar, realizado por Silva (2017), contribuiu para relacionar as alterações encontradas com o desenvolvimento de afecções de órgãos da pelve e períneo.

Frente ao aumento da expectativa de vida do ser humano, sem dúvidas haverá também um crescimento no surgimento das afecções pélvicas, uma vez que sua incidência aumenta com a idade (Herschorn et al. 2008; Abrams et al. 2009). Considerando a demanda de cuidados para essas disfunções, projetou-se um aumento de 35% entre 2010 e 2030 (Nygaard 2015).

As disfunções do AP produzem elevados custos orçamentários da saúde em todo mundo (Minassian et al. 2003; Abrams et al. 2009; Cheon & Maher 2013; Wu et al. 2011; Coyne et al. 2014; Bharucha et al. 2015; Powell et al. 2018; Xu et al. 2012) e segundo Moore et al. (2013) o aumento com os gastos assistenciais está diretamente relacionado à IU.

## **1.5. TRATAMENTO DAS DISFUNÇÕES DO ASSOALHO PÉLVICO**

Como já relatado, o AP está relacionado aos sistemas urinário, genital e intestinal, podendo as disfunções se manifestarem na continência urinaria, fecal e anal, no suporte de órgãos pélvicos e na função sexual.

O tratamento das disfunções pélvicas (incontinências e prolápsos) pode ser cirúrgico ou conservador, este último podendo compreender o uso de medicamentos, de pessários, mudança do estilo de vida, perda de peso e fisioterapia (Bø et al. 1999; Scarlett 2004; Berghmans 2006; Norton 2009; Wing et al. 2010; Abrams et al. 2013; Moore et al. 2013; Pedraza 2014; Abrams et al. 2017).

A fisioterapia frequentemente é considerada como tratamento conservador de primeira escolha, por ser não invasivo, por proporcionar melhora clínica, por ser seguro, pela possibilidade de ser combinado a outros tratamentos e pelos custos de moderados a baixos (Berghmans 2006).

A eletroestimulação (EE), um recurso da fisioterapia, tem sido utilizada para o tratamento de diferentes afecções, sobretudo no aparelho locomotor (Gobbo et al., 2014), nas disfunções do AP (Rosenbaum 2011; Bliss et al. 2017; Min et al. 2017; Nambiar et al. 2018; Li et al. 2020), como também na hipertonia ou hipotonia muscular, hipotrofia, parestesia, plegia, desnervações, restrições na amplitude de movimento, dor aguda e crônica, cicatrização de feridas e edema (Robertson et al. 2009; Maffiuletti 2010; Gobbo et al. 2014). A EE está geralmente vinculada para terapia de uma determinada afecção, mas pode ser utilizada como recurso educativo em indivíduos saudáveis, para conscientização dos músculos da região da pelve e do períneo (Pedraza et al. 2014).

A EE consiste na aplicação de estímulos elétricos intermitentes, de baixos níveis de corrente, através de um ou mais eletrodos posicionados nas proximidades dos pontos selecionados, objetivando a obtenção de contrações musculares (Hultman et al. 1983; Robertson et al. 2009; Maffiuletti 2010; Gobbo et al. 2014).

A EE no AP foi originalmente proposta e aplicada por Cadwell (1963), que conseguiu o retorno do controle do esfíncter anal numa mulher de 60 anos, portadora de IF há 23 anos, provavelmente em decorrência do parto vaginal, e a redução da perda de urina numa outra mulher de 65 anos, com IU há 20 anos.

Na pelve feminina, a EE pode ser aplicada por sonda introduzida tanto na vagina (EE intravaginal ou transvaginal) quanto no canal anal (EE intra-anal ou transanal) e os eletrodos podem ser posicionados de modo a obter contato com uma quantidade significativa de fibras do nervo pudendo (Amaro et al. 2003).

Estudos em ratas Wistar nulíparas mostraram que a EE transvaginal (EV) e transanal (EA) foram efetivas, causando melhora estrutural nos tecidos de órgãos pélvicos (Sousa 2017; Sousa et al. 2017), aumento da força de contração dos MAPs, indicando fortalecimento desses músculos (Sousa. 2017; Wyndaele & Poortmans 2006); aumento da densidade capilar e do número de fibras musculares do tipo II (Wyndaele & Poortmans 2006).

Nas últimas décadas, a EE tem sido utilizada no tratamento conservador de afecções que acometem a pelve e períneo, mas apesar de haver trabalhos analisando sua eficácia na clínica, as opiniões são divergentes/conflitantes (Bernardes 2000; Trujen et al. 2001; Correia et al. 2011; Friedman 2012; Moore et al. 2013; Chêne et al. 2013; Faiena et al 2015; Stewart et al 2017; Nambiar et al. 2018) pela falta de mais estudos científicos que esclareçam seus efeitos diretos nos tecidos dessas regiões (Sousa 2017; Wyndaele & Poortmans 2006). Portanto, considerando que é escasso o conhecimento acerca das modificações morfológicas efetivadas diretamente pela EE nos tecidos que compõem o AP e órgãos relacionados; que é praticamente inviável a realização de estudos microscópicos prospectivos nessa região em humanos vivos (Abramowitch et al. 2009; Wieslander et al. 2009); que a utilização de modelos animais é consagrada pela literatura e que o rato de laboratório tem sido um dos pilares da pesquisa biomédica (Sengupta 2013), além de ser o animal que demonstrou ter mais semelhanças dos tecidos da região pélvica com os de humanos (Alperin et al. 2014), e ainda demonstrar as modificações ocasionadas pela gestação/parto (Alperin et al. 2015; Silva 2017), optou-se por utilizar ratas Wistar, tornando viável a captação de informações acerca das respostas morfofuncionais à aplicação da EE nesses tecidos. Assim, o presente estudo se propôs a avaliar o efeito da EV na histomorfometria dos MAPs e nos tecidos associados à vagina, à uretra e ao reto de ratas Wistar múltiparas e nulíparas. Tal estudo em ratas Wistar múltiparas, até onde pesquisamos, é inédito. O estudo buscou contribuir para as abordagens preventivas/terapêuticas/curativas que visem melhorias na qualidade de vida e dignidade de mulheres acometidas pelas entidades clínicas disfuncionais do AP.

## **2. OBJETIVOS**

## **2.1. OBJETIVO GERAL**

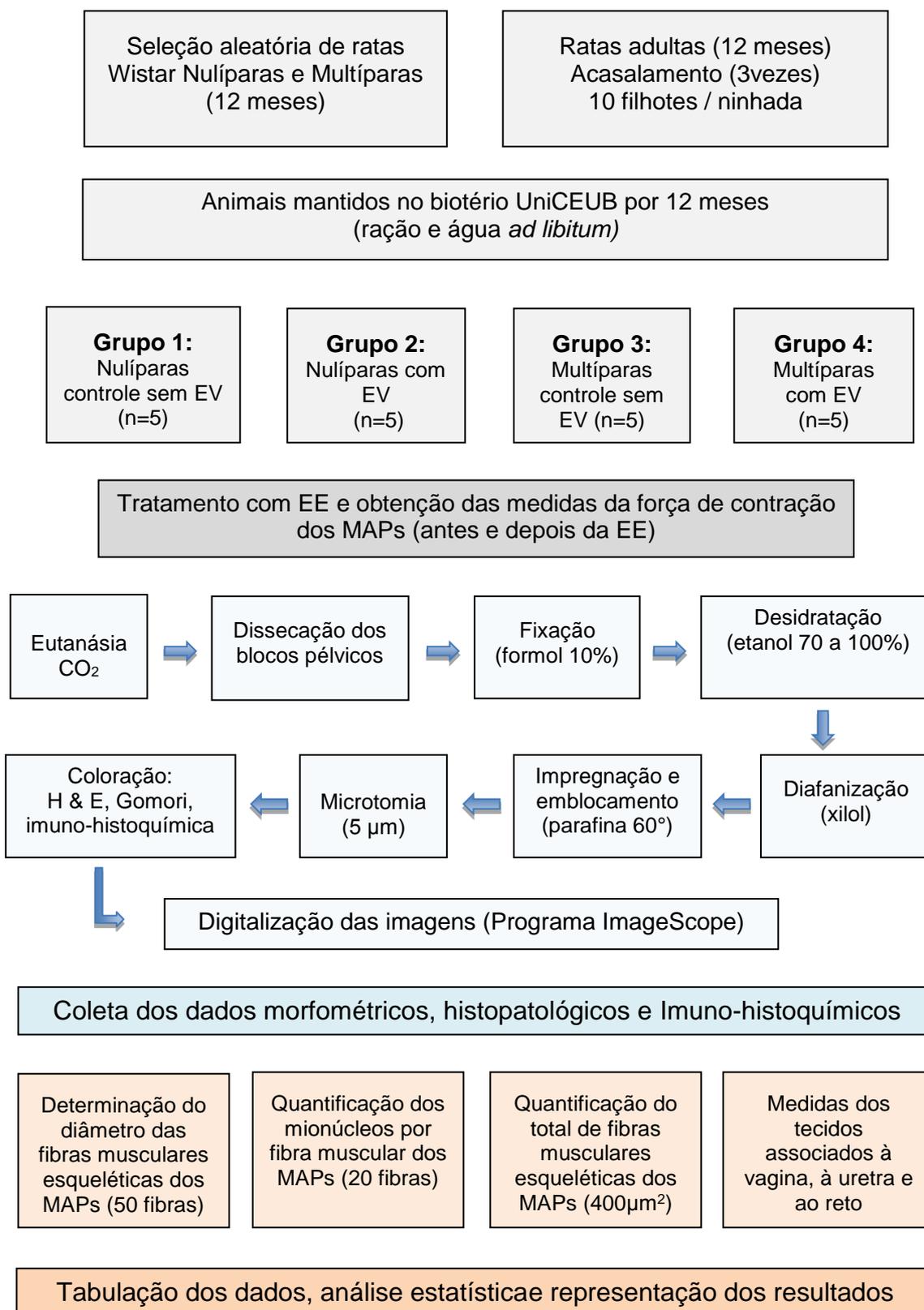
Avaliar o efeito da eletroestimulação transvaginal (EV) na histomorfometria da musculatura do AP (MAP) e nos tecidos associados à vagina, à uretra e ao reto de ratas Wistar múltíparas e nulíparas.

## **2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Determinar a força de contração muscular antes e após a EV nos MAPs;
- Determinar o diâmetro das fibras dos MAPs;
- Quantificar o número de mionúcleos por fibra dos MAPs;
- Quantificar as fibras dos MAPs;
- Determinar as medidas dos tecidos epitelial, conjuntivo e muscular associados à vagina, à uretra e ao reto;
- Verificar a presença de alterações morfológicas nos tecidos (análise histopatológica);
- Determinar semiquantitativamente as células do tecido conjuntivo (leucócitos e fibroblastos/fibrócitos);
- Determinar por imuno-histoquímica o efeito da EV na proliferação celular nos tecidos epitelial, conjuntivo, muscular liso dos órgãos pélvicos e muscular estriado dos MAPs.

### **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, experimental e prospectivo de caráter longitudinal, realizado nos Laboratórios de Anatomia e Histologia da Área de Morfologia da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília (UnB) e no Laboratório de Ciências do Centro Universitário de Brasília (LABOCIEN/UniCEUB). O referido estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do UniCEUB.

Para o experimento e durante a execução, foram observados e seguidos o disposto na Lei Federal 11.794, de 8 de outubro de 2008 e nas demais normas aplicáveis à utilização de animais para a pesquisa, especialmente nas resoluções do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e nos princípios éticos definidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA),

### 3.3. TIPO DE ANIMAIS

Os animais utilizados nos ensaios eram não isogênicos, ratas da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*) múltiparas e nulíparas com 12 meses de idade. As ratas múltiparas tiveram 3 gestações, com 10 filhotes em média por ninhada. Esses animais, provenientes do alojamento do Biotério do UniCEUB, foram mantidos, em temperatura controlada (23 °C), em ciclo claro/escuro de 12 horas e com alimentação a base de ração balanceada e água potável *ad libitum*. O cálculo amostral do presente estudo esteve dentro das normas estabelecidas pelo COBEA.

### 3.4. GRUPOS DE ESTUDO

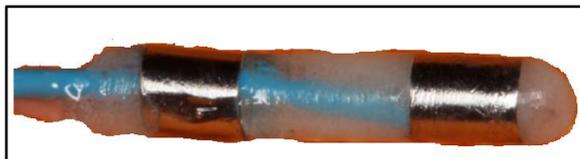
De conformidade com o cálculo amostral e para permitir a análise estatística adequada os grupos de estudo contendo 5 (cinco) animais por grupo foram alocados aleatoriamente. Os grupos foram constituídos de ratas **Nulíparas Controle** (n=5); **Nulíparas com EV** (n=5); **Múltiparas Controle** (n=5) e **Múltiparas com EV**

(n=5), com finalidade de determinar e comparar o efeito da EV nos MAPs e nos tecidos associados à vagina, à uretra e ao reto:

- **Nulíparas Controle (NC).**            **Nulíparas com EV (NEV).**
- **Múltiparas Controle (MC).**        **Múltiparas com EV (MEV).**

### 3.5. ELETROESTIMULAÇÃO TRANSVAGINAL (EV)

Foram utilizadas sondas adaptadas às dimensões da vagina de ratas Wistar produzidas e padronizadas pelos estudos de Sousa (2017), cujo modelo pode ser visualizado na figura 2, para a aplicação da EE via cavidade desse órgão. Em cada uma delas foi utilizado 2 (dois) 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 de cada sonda foi de 12.0 mm. O aparelho eletroestimulador utilizado foi Dualpex 961 QUARK® modelo URO.



**Figura 2.** Fotografia da sonda de EV para ratas Wistar (Sousa, 2017).

A técnica de aplicação da sonda de EV nas ratas Wistar foi seguida de acordo com o realizado nos estudos de Sousa (2017), com os mesmos parâmetros baseados no método idealizado por Wyndaele e Poortmans (2006). Seguindo os estudos de Sousa (2017) optou-se também no presente estudo pela contenção manual dos animais sem nenhuma sedação dos mesmos. Tal procedimento consistiu-se em posicionar cada rata sobre a palma de uma das mãos do pesquisador, ao mesmo tempo em que se tracionava a pele da nuca com os dedos indicador e polegar, realizando uma preensão bidigital, enquanto com a outra mão,

tracionava-se a cauda. As ratas, contidas dessa forma, não eram impedidas de respirar nem de realizar pequenos movimentos isométricos.

Logo após a contenção das ratas e seu posicionamento em decúbito dorsal, outro pesquisador introduzia a sonda do eletroestimulador, previamente lubrificada com gel condutor, na vagina delas. A emissão de rangidos, enrijecimento da cauda ou movimentos corporais bruscos dos animais, que significariam procedimentos dolorosos, considerando-se os parâmetros da estimulação elétrica (Sousa, 2017) e em concordância com o método utilizado por Wyndaele e Poortmans (2006), foram todos observados durante as sessões de EV. Apesar de ter esses conhecimentos para se evitar procedimentos dolorosos, os pesquisadores precisaram se familiarizar com os animais, por um período de uma semana, no intuito de adquirir condicionamento com a conduta de rotina da inserção da sonda de EV, para atenuar o estresse que tal procedimento poderia ocasionar.

Para essa EV foi utilizada uma corrente bifásica simétrica retangular com largura de pulso de 700 ms e frequência de 50 Hz, com intensidade de 2 mA ou até causar a contração visível ao observador, mas sem causar sofrimento ao animal conforme os estudos de Bø et al. (1999) e de Wyndaele e Poortmans (2006).

As ratas foram submetidas a 30 (trinta) sessões de EV em conformidade com o protocolo de tratamento prescrito para o fortalecimento dos MAPs (Bø et al. 1999). Tais sessões aconteceram 5 (cinco) vezes por semana em dias úteis e durante 3 (três) semanas consecutivas, sendo 2 (duas) vezes a cada dia, cada sessão com a duração de 6 (seis) minutos e com intervalo de 5 (cinco) minutos de repouso entre elas. O tempo decorrido entre a passagem da corrente/contração muscular e sua interrupção/repouso muscular (On/Off) foi de 5 (cinco) e 10 (dez) segundos, respectivamente.

### 3.6. FORÇA DE CONTRAÇÃO DOS MAPs ANTES E APÓS EV

Para a medição da força dos MAPs, foi introduzida no reto-ânus das ratas Wistar nulíparas e múltiparas (estudo pareado) a sonda do manômetro do eletromiógrafo de pressão, elaborado por Sousa (2017).

Os passos para o registro da pressão basal intra-anal foram os seguintes: 1) introdução da sonda do manômetro no reto-ânus; 2) insuflação da sonda intra-anal; 3) observação e registro da pressão basal intra-anal durante 120 segundos (tônus basal).

Os registros da força ocorreram em três momentos durante a sessão de EE: o primeiro registrou a pressão (tônus) basal do AP sem a inserção da sonda de EV; o segundo capturou a pressão (tônus reflexo) do AP no momento da inserção da sonda de EV, porém sem passagem de corrente elétrica; o terceiro gravou a pressão (tônus evocado) do AP no momento da passagem da corrente elétrica pela sonda EV (Figura 3). A medição da força de contração do AP ocorreu concomitantemente à sessão de EV. Os parâmetros utilizados para a EE foram os mesmos descritos no item 3.5.



**Figura 3.** Desenho esquemático do registro da força muscular no momento das pressões basal, reflexa e evocada.

### 3.7. EUTANÁSIA DOS ANIMAIS E OBTENÇÃO DO MATERIAL

Finda a última sessão de EV, no dia seguinte, os animais foram acondicionados em câmara onde a concentração de CO<sub>2</sub> foi de 40%. Os animais faleceram por depressão excessiva do sistema nervoso central e hipóxia. O uso

desse método de eutanásia por ser rápido, indolor, de baixo custo e por manter os tecidos sem resíduos químicos, foi o escolhido. Uma vez falecidos, os animais foram dissecados com a remoção dos blocos pélvicos mantendo-se os órgãos associados e preservando-se todo o períneo com sua pele. As inserções dos MAPs no anel pélvico foram mantidas. Em seguida, todos os blocos obtidos foram fixados em solução de formalina a 10% e depois submetidos ao processamento para a obtenção dos cortes histológicos.

### **3.8. PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO E OBTENÇÃO DAS IMAGENS**

Os espécimes removidos e fixados, conforme descrito no item 3.7, foram processados para as análises em microscopia de luz. Inicialmente, foram lavados e desidratados em soluções crescentes de álcool a 70%, 80%, 90% e absoluto, sendo em cada solução por um período de 60 minutos, exceto na solução de álcool absoluto, que foi repetida por três vezes de igual período de 60 minutos cada. Após tal etapa, foram diafanizados em xilol em 3 banhos, com duração de 60 minutos cada, e impregnados em parafina na temperatura entre 56-60°C, também em 3 banhos, de 60 minutos cada, para a confecção dos blocos de parafina. Uma vez obtido o endurecimento total dos blocos de parafina, foram resfriados e fatiados no micrótomo para obtenção de cortes dos tecidos na espessura de 5 µm. Em seguida, os cortes dos tecidos a serem analisados ao microscópio de luz, foram corados com as seguintes técnicas: 1) hematoxilina & eosina, para avaliar a arquitetura dos tecidos; 2) tricrômico de Gomori, para identificar fibras de colágeno e musculares; 3) imunomarcção com o anticorpo primário Ki67 para quantificar a proliferação celular. Os cortes histológicos foram digitalizados e capturados com o equipamento *Aperio ScanScope®* e avaliados no programa *ImageScope version 12.1.0.5029* (*Aperio Technologies Inc, Vista, CA, USA*) por um único observador, no aumento de 20x.

### **3.9. OBTENÇÃO DOS DADOS HISTOMORFOMÉTRICOS**

Os dados histomorfométricos foram obtidos nos tecidos epitelial, conjuntivo e muscular conforme descrito abaixo.

#### **3.9.1. DETERMINAÇÃO DO DIÂMETRO DAS FIBRAS MUSCULARES ESQUELÉTICAS DOS MAPs**

Para determinar o diâmetro das fibras musculares esqueléticas dos MAPs foram selecionadas áreas representativas em secções transversais digitalizadas. Utilizou-se a ferramenta de medida de comprimento em micrômetro do programa *ImageScope version 12.1.0.5029* no aumento de 20x, onde se mediu o diâmetro maior e menor, num total de 50 fibras com formato poligonal, por amostra. O diâmetro médio das fibras musculares esqueléticas dos MAPs foi calculado pela soma da média do maior e menor diâmetros, dividido por dois, em cada amostra.

#### **3.9.2. QUANTIFICAÇÃO DO TOTAL DE FIBRAS MUSCULARES DOS MAPs**

Para quantificar o total de fibras musculares esqueléticas dos MAPs foram delimitadas quatro áreas equidistantes de 400  $\mu\text{m}^2$  nas secções transversais representativas digitalizadas, no aumento de 20x, em cada amostra.

#### **3.9.3. QUANTIFICAÇÃO DOS MIONÚCLEOS DAS FIBRAS MUSCULARES DOS MAPs**

Para quantificar o número de mionúcleos por fibra muscular esquelética dos MAPs, foram escolhidas 20 fibras no total por amostra, nas secções transversais representativas digitalizadas.

#### **3.9.4. MEDIDAS DOS TECIDOS EPITELIAL, CONJUNTIVO E MUSCULAR ASSOCIADOS À VAGINA, À URETRA E AO RETO**

Para determinar a medida em espessura dos tecidos epitelial, conjuntivo e muscular da vagina, da uretra e do reto foi utilizada a ferramenta de medida de comprimento do programa *ImageScope version 12.1.0.5029* nas imagens das secções histológicas digitalizadas. Foram tomadas as médias das espessuras de tais tecidos em quatro pontos equidistantes (paredes anterior, posterior e laterais) das secções histológicas dos animais de todos os grupos.

#### **3.9.5. ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA E HISTOLÓGICA**

A análise histopatológica (qualitativa) foi realizada por um único examinador em 4 (quatro) campos equidistantes ( $200 \mu\text{m}^2/\text{campo}$ ) nas secções histológicas coradas pela hematoxilina e eosina. O tipo de infiltrado inflamatório e a presença ou não de alterações morfológicas, hemorragia, degeneração e ou necrose nos tecidos examinados, foram considerados.

Para a análise histológica semiquantitativa utilizou-se 4 (quatro) campos equidistantes ( $200 \mu\text{m}^2/\text{campo}$ ) para os leucócitos e numa área equivalente a  $700 \mu\text{m}^2$  para os fibroblastos/fibrócitos nas secções histológicas coradas com hematoxilina e eosina. As análises foram feitas por um único observador nas mucosas da vagina, da uretra e do reto.

#### **3.9.6. ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA**

Para a análise imuno-histoquímica dos tecidos foram coletadas secções histológicas sequenciais de  $2 \mu\text{m}$  de espessura aderidas em lâminas de vidro previamente silanizadas (Easy Path Diagnósticos, Indaiatuba, São Paulo, Brasil). Em seguida, os cortes foram desparafinados em xilol (3 banhos de 2 minutos), desidratados em álcool etílico absoluto (6 banhos de 1 minuto) e álcool etílico a 95% (2 banhos de 1 minuto) e reidratados em água destilada (3 banhos de 1 minuto).

Considerando que a parafinização dos espécimes mascara os sítios antigênicos das células, a recuperação antigênica se deu pela imersão das lâminas em cuba vaporizada contendo tampão citrato com 0,2% de *Tween* 20, previamente aquecido a 95°C por 20 minutos. Em seguida, as lâminas foram resfriadas a temperatura ambiente por 15 minutos e lavadas vigorosamente com tampão TBS (Tris Buffered Saline = Solução salina tamponada Tris = tri-tamponado, pH 7,3 e cloreto de sódio em água destilada) acrescido de *Tween* 20; o líquido excedente foi removido com o auxílio de um papel absorvente. Posteriormente, fez-se o bloqueio da peroxidase endógena para evitar reações inespecíficas. Para isso, as lâminas foram imersas em solução aquosa de peróxido de hidrogênio a 10% (solução de bloqueio) por 10 minutos (2 banhos). Em seguida, foram lavadas com tampão TBS, três vezes, para remover o excesso da solução de bloqueio. O líquido excedente foi removido com auxílio de um papel absorvente.

Nas etapas seguintes, os cortes foram tratados com 50 µL de anticorpo primário Ki67 produzidos em coelho (clone: SP6, Biocare Medical, Concord-CA, United States), previamente diluído na proporção de 1:80 em tampão TBS. Nessas condições as lâminas foram incubadas em uma cuba umidificada durante 18 horas a 4 °C. Finalizada a incubação, as lâminas foram lavadas vigorosamente com tampão TBS/*Tween* 20 e as secções histológicas foram reincubadas com 50 µL do ligante, ou seja, do anticorpo secundário biotinado anti-coelho (Envision Flex + Mouse Linker, DAKO, Califórnia, United States) por 30 minutos à temperatura ambiente. Finalizada essa incubação, as lâminas foram novamente lavadas com o tampão TBS/*Tween* 20 e o excesso de líquido foi retirado com auxílio de um papel absorvente.

Realizadas essas etapas, e caso existissem no tecido o antígeno específico, seriam formados imunocomplexos antígeno alvo + anticorpo primário + anticorpo secundário biotinado. Para visualizar os imunocomplexos, as secções histológicas foram incubadas com uma solução comercial de Envision Flex Horseradish

peroxidase (HRP) (DAKO, Califórnia, United States) por 30 minutos à temperatura ambiente e, em seguida, com outra solução comercial com DAB (diaminobenzidina) e peróxido de hidrogênio (Envision Flex DAB + Chromogen) por mais 10 minutos.

Em seguida, as lâminas, depois de lavadas 3 vezes em água corrente sob baixa pressão, foram contracoradas com hematoxilina de Harris por 30 segundos, novamente lavadas em água corrente por 5 minutos, desidratadas com álcool absoluto (5 banhos), diafanizadas com xilol (3 banhos) e finalmente protegidas com lamínulas aderidas com resina sintética (Enthelan®, Sigma-Aldrich).

Com a ligação da estreptavidina à biotina presente no anticorpo secundário biotinado, a peroxidase, via peroxidação, reage com o peróxido de hidrogênio e a DAB, permitindo a amplificação do sinal, formando um complexo de cor acastanhado e visualização em microscopia óptica.

Para fins de positividade foi considerada apenas a coloração acastanhada nuclear. Para a coleta dos dados foram quantificados o total de imunomarcações numa área equivalente a  $66 \mu\text{m}^2$  das secções histológicas dos espécimes obtidos dos grupos. Os resultados foram expressos em total de imunomarcações/espécime/ $66 \mu\text{m}^2$ .

### **3.10. 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 comparações entre dois grupos, foi usado o teste t ou Mann-Whitney para dados normais ou não normais, respectivamente (estudo não pareado), e os teste t ou Wilcoxon para os dados normais ou não normais, respectivamente (estudo pareado). Para as múltiplas comparações utilizou-se os testes de ANOVA (distribuição normal) ou Kruskal-Wallis (distribuição não normal). Diferenças de  $p < 0,05$  foram consideradas significantes. As análises foram

realizadas empregando-se o programa Prism® 5 Software Package (GraphPad, USA, 2005).

#### **4. RESULTADOS**

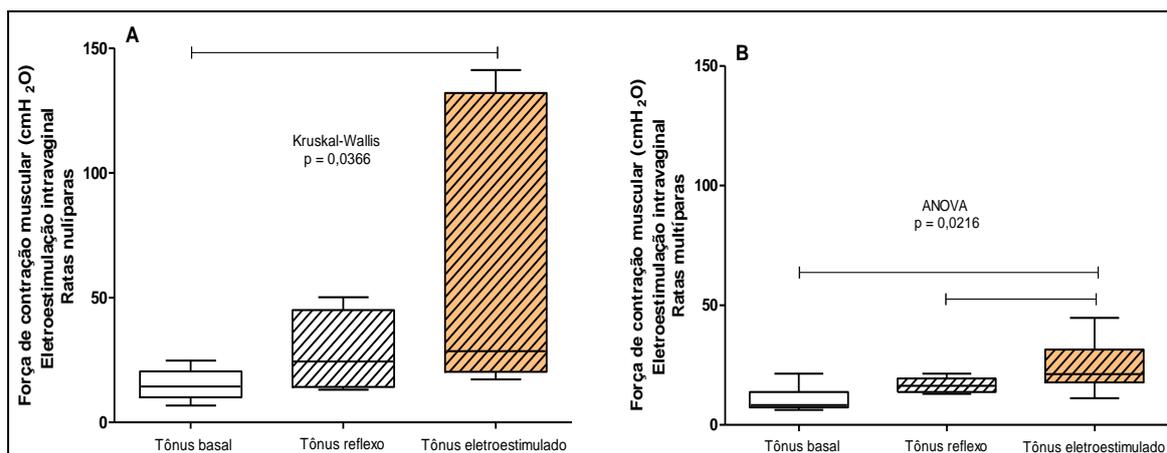
#### 4.1. AVALIAÇÃO DO EFEITO DA EV NA FORÇA DOS MÚSCULOS DO ASSOALHO PÉLVICO (MAPs)

Para avaliar o efeito da EV na força dos MAPs dos grupos de ratas Wistar nulíparas e múltiparas, foram obtidos os registros eletromiográficos de pressão do tônus muscular basal (TB), tônus muscular reflexo (TR) e tônus muscular evocado pela eletroestimulação (TE).

No grupo de nulíparas, os resultados mostraram que, quando comparado ao TB (14,4cmH<sub>2</sub>O), a EV induziu o aumento da mediana da força de contração muscular (TE = 28,5 cmH<sub>2</sub>O). Não houve diferença entre o TR (24,4cmH<sub>2</sub>O) e os demais tônus. (Kruskal-Wallis,  $p = 0,0366$ ) (Figura 4 A).

No grupo de múltiparas, a média  $\pm$  DP do TE (24,2  $\pm$  10,9 cmH<sub>2</sub>O) foi maior do que TB (10,6  $\pm$  5,6 cmH<sub>2</sub>O) e do que o TR (16,5  $\pm$  3,2 cmH<sub>2</sub>O). (ANOVA,  $p = 0,0216$ ) (Figura 4 B).

Os resultados mostraram também uma tendência estatística para menor TE no grupo de múltiparas (MEV = 24,2  $\pm$  10,9 cmH<sub>2</sub>O), na comparação com o TE do grupo de nulíparas (NEV = 66,6  $\pm$  60,2 cmH<sub>2</sub>O) (Teste t,  $p = 0,0927$ ), o que resultou numa tendência para ~ 64% de diferença entre ambos.



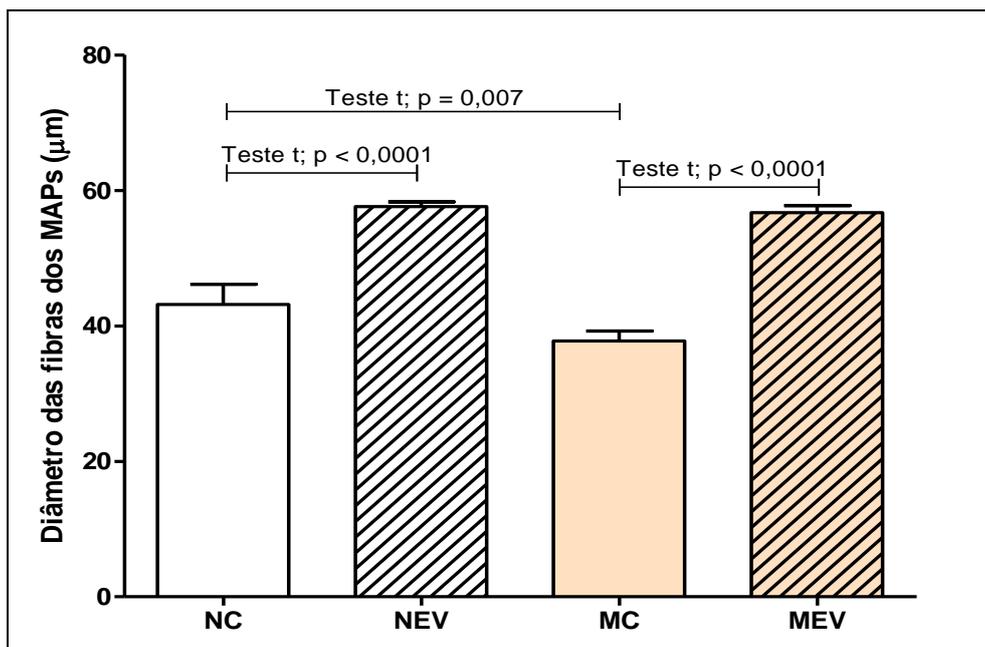
**Figura 4.** Força de contração dos MAPs avaliada pelo tônus basal (TB), reflexo (TR) e eletroestimulado (TE) de ratas Wistar nulíparas (A) e múltiparas (B). Os resultados mostraram aumento da força dos MAPs das nulíparas e múltiparas após a eletroestimulação ( $p < 0,05$ ); o TR não diferiu do TB e TE nas nulíparas, enquanto que nas múltiparas o TR foi similar ao TB e menor que o TE. Estão mostrados as medianas e os desvios padrão.

## **4.2. AVALIAÇÃO DO EFEITO DA EV NOS MAPs**

Para avaliar o efeito da EV nos MAPs, foram obtidos o total de fibras musculares esqueléticas em quatro áreas equidistantes de  $400 \mu\text{m}^2$ , o diâmetro de 50 fibras musculares estriadas esqueléticas e o total de mionúcleos em 20 fibras, nas secções histológicas de cada rata Wistar dos grupos de nulíparas e múltiparas com ou sem eletroestimulação.

### **4.2.1. DIÂMETRO DAS FIBRAS**

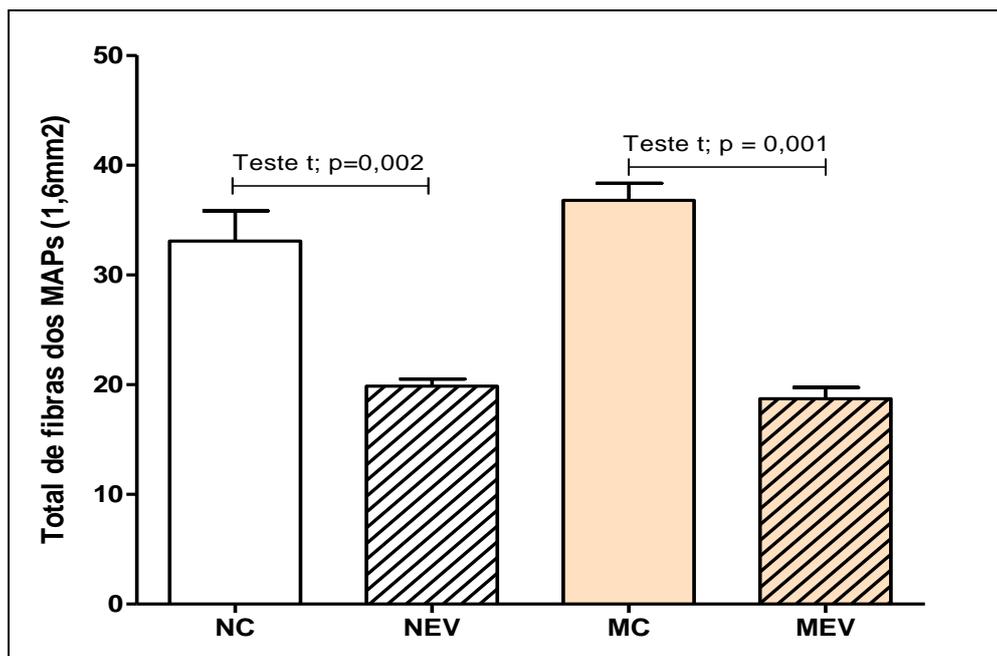
Os resultados, analisados pelo Teste t, mostraram para os grupos de nulíparas que a EV causou aumento nos diâmetros das fibras musculares estriadas esqueléticas (NEV =  $57,6 \pm 0,6 \mu\text{m}$ ), em comparação com o seu respectivo grupo controle (NC =  $43,1 \pm 3,0 \mu\text{m}$ ) ( $p < 0,0001$ ). Similarmente, observou-se maior diâmetro das fibras no grupo eletroestimulado de múltiparas (MEV =  $56,8 \pm 1,2 \mu\text{m}$ ) na comparação com seu respectivo grupo controle (MC =  $37,8 \pm 1,5 \mu\text{m}$ ) ( $p < 0,0001$ ). Ainda, quando foram comparados os grupos controles de nulíparas e múltiparas, os resultados mostraram menor diâmetro das fibras musculares no grupo de múltiparas (MC =  $37,8 \pm 1,5 \mu\text{m} < \text{NC} = 43,1 \pm 3,0 \mu\text{m}$ ) ( $p = 0,007$ ). Não houve diferenças entre os grupos eletroestimulados (NEV  $\approx$  MEV) ( $p > 0,005$ ) (Figuras 5 e 8).



**Figura 5.** Diâmetro das fibras dos MAPs de ratas Wistar nulíparas e múltiparas, submetidas ou não à eletroestimulação. Os resultados, analisados pelo Teste t, mostraram que na comparação com seus respectivos grupos controles de nulíparas e múltiparas, a eletroestimulação pela via transvaginal causou aumento no diâmetro das fibras (NEV > NC e MEV > MC) ( $p < 0,0001$ ). Também, houve menor diâmetro das fibras no grupo MC, na comparação com o grupo NC (MC < NC) ( $p = 0,007$ ). Não houve diferenças entre os grupos eletroestimulados (NEV  $\approx$  MEV) ( $p > 0,005$ ). Estão mostrados as médias e os desvios padrão.

#### 4.2.2. TOTAL DAS FIBRAS

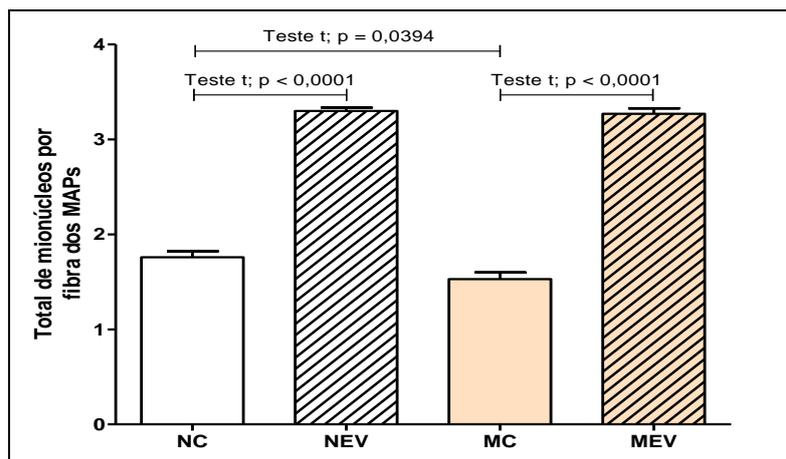
Os resultados, analisados pelo Teste t, mostraram que o total das fibras musculares estriadas esqueléticas foi maior nos grupos controles na comparação com seus respectivos grupos eletroestimulados (NC =  $33,0 \pm 6,1$  > NEV =  $19,5 \pm 1,4$  e MC =  $36,8 \pm 3,5$  > MEV =  $18,7 \pm 2,3$ ) ( $p < 0,05$ ). Não houve diferenças entre os grupos controles (NC  $\approx$  MC) nem entre os grupos eletroestimulados (NEV  $\approx$  MEV) ( $p > 0,05$ ) (Figuras 6 e 8).



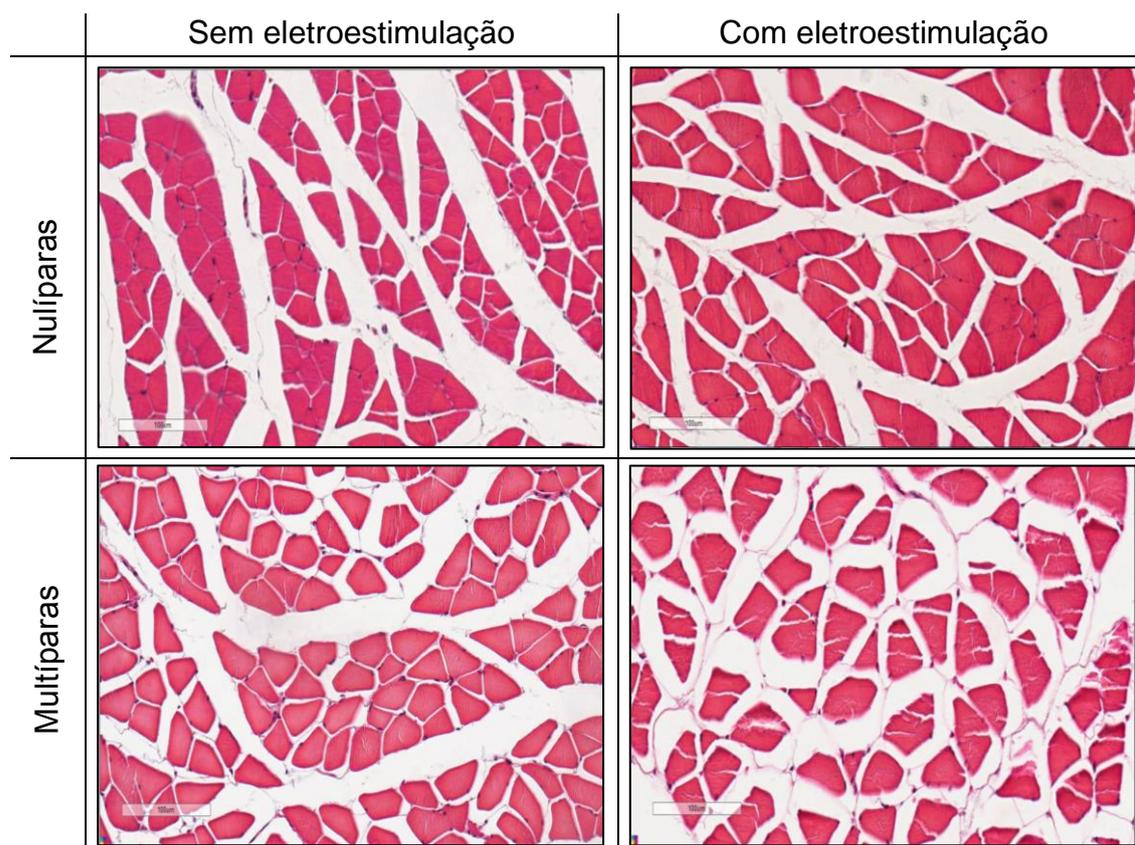
**Figura 6.** Total de fibras dos MAPs de ratas Wistar nulíparas e múltíparas, submetidas ou não à eletroestimulação. Os resultados pelo Teste T mostraram maior número de fibras nos grupos controles na comparação com seus respectivos grupos eletroestimulados (NC > NEV; MC > MEV) ( $p < 0,05$ ). Não houve diferenças entre os grupos controles (NC  $\approx$  MC) nem entre os grupos eletroestimulados (NEV  $\approx$  MEV) ( $p > 0,05$ ). Estão mostrados as médias e os desvios padrão.

#### 4.2.3. TOTAL DE MIONÚCLEOS

Os resultados, analisados pelo Teste t, mostraram maior número de mionúcleos nos grupos eletroestimulados em relação aos seus respectivos grupos controles de nulíparas (NEV =  $3,3 \pm 0,0 > NC = 1,7 \pm 0,1$ ) e de múltíparas (MEV =  $3,3 \pm 0,1 > MC = 1,5 \pm 0,2$ ) ( $p < 0,0001$ ). Ainda, quando foram comparados os grupos controles, o número de mionúcleos foi maior no grupo de nulíparas do que no de múltíparas (NC =  $1,7 \pm 0,1 > MC = 1,5 \pm 0,2$ ) ( $p = 0,0394$ ). Não houve diferenças entre os grupos eletroestimulados (NEV  $\approx$  MEV) ( $p > 0,005$ ) (Figuras 7 e 8).



**Figura 7.** Total de mionúcleos das fibras dos MAPs de ratas Wistar nulíparas e múltíparas, submetidas ou não à eletroestimulação. Os resultados, analisados pelo Teste t, mostraram maior número de mionúcleos nos grupos eletroestimulados de nulíparas (NEV > NC) e de múltíparas (MEV > MC) ( $p < 0,0001$ ). Na comparação com os grupos controles, os mionúcleos foram mais numerosos no grupo das nulíparas do que no das múltíparas (NC > MC) ( $p = 0,0394$ ). Não houve diferenças entre os grupos eletroestimulados (NEV  $\approx$  MEV) ( $p > 0,005$ ). Estão mostrados as médias e os desvios padrão.



**Figura 8.** Fotomicrografias das fibras musculares estriadas esqueléticas dos MAPs de ratas Wistar nulíparas e múltíparas, com ou sem eletroestimulação. Observar maior número de fibras musculares e menor diâmetro nas nulíparas e múltíparas sem eletroestimulação (esquerda) e fibras em menor número e maior diâmetro nas nulíparas e múltíparas com eletroestimulação (direita). Coloração: Hematoxilina e Eosina (HE); barra de aumento = 100  $\mu\text{m}$ .

### **4.3. AVALIAÇÃO DO EFEITO DA EV NAS CAMADAS DA VAGINA**

Para avaliar o efeito da EV nos tecidos que compõem a vagina, foram tomadas as médias das espessuras dos tecidos epitelial, conjuntivo e muscular, em quatro pontos equidistantes (paredes anterior, posterior e laterais) das secções histológicas das ratas Wistar dos grupos controles de nulíparas e múltiparas (NC e MC) e dos respectivos grupos eletroestimulados (NEV e MEV).

#### **4.3.1. EPITÉLIO**

Os resultados, analisados pelo Teste t, mostraram maior espessura do tecido epitelial no grupo controle de nulíparas na comparação com seu respectivo grupo eletroestimulado (NC =  $155,0 \pm 17,3 \mu\text{m}$  > NEV =  $102,5 \pm 27,5 \mu\text{m}$ ) ( $p < 0,05$ ). Não houve diferenças entre os grupos controle e eletroestimulado de múltiparas (MC =  $134,5 \pm 68,7 \mu\text{m}$   $\approx$  MEV =  $111,2 \pm 36,8 \mu\text{m}$ ). Do mesmo modo, não houve diferenças entre os grupos controle de nulíparas e múltiparas (NC  $\approx$  MC) nem entre os grupos eletroestimulados (NEV  $\approx$  MEV) ( $p > 0,05$ ) (Figuras 9 A e 10).

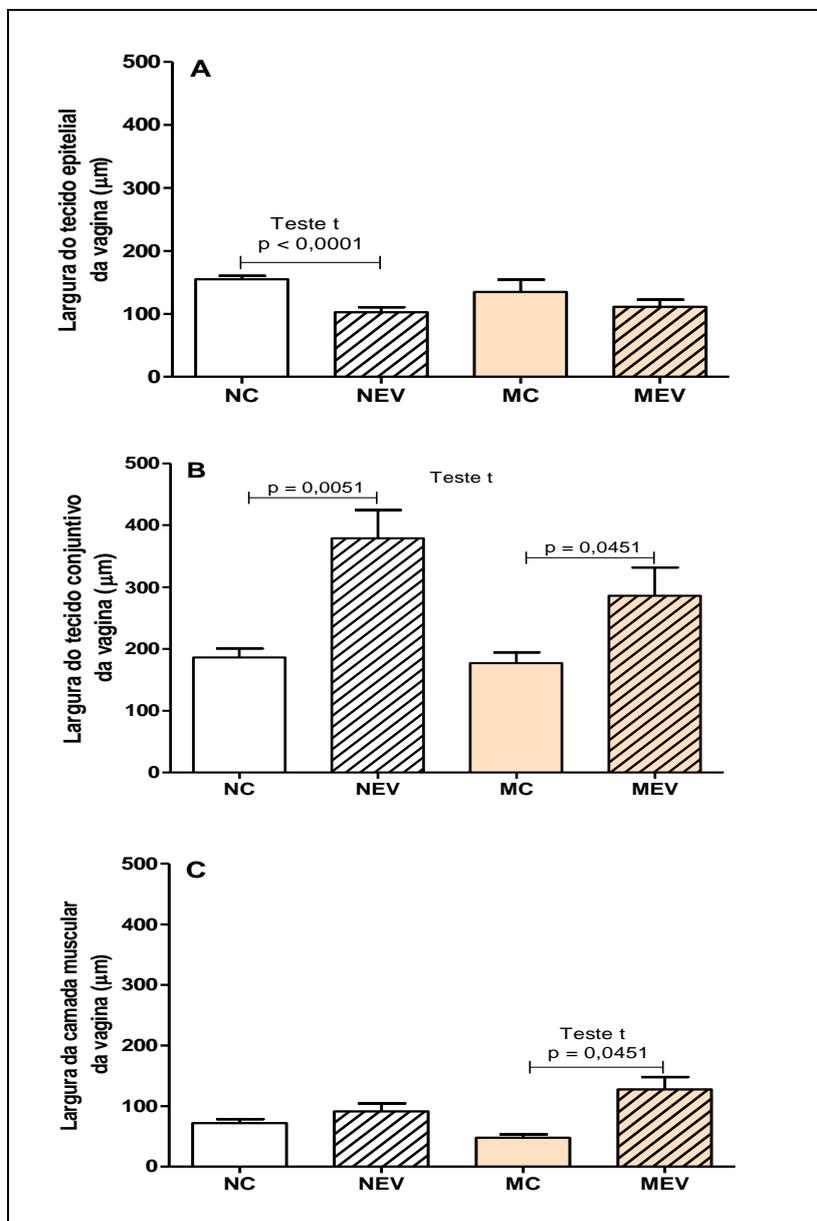
#### **4.3.2. TECIDO CONJUNTIVO**

Os resultados, analisados pelo Teste t, mostraram maior espessura do tecido conjuntivo subepitelial no grupo eletroestimulado de nulíparas, na comparação com seu respectivo grupo controle (NEV =  $378,8 \pm 112,6 \mu\text{m}$  > NC =  $185,0 \pm 32,6 \mu\text{m}$ ) e também no grupo eletroestimulado de múltiparas na comparação com seu respectivo grupo controle (MEV =  $285,7 \pm 91,7 \mu\text{m}$  > MC =  $177,0 \pm 38,0 \mu\text{m}$ ) ( $p < 0,05$ ). Não houve diferenças entre os grupos controles de nulíparas e múltiparas (NC  $\approx$  MC) nem entre os grupos respectivos eletroestimulados (NEV  $\approx$  MEV) ( $p > 0,05$ ) (Figuras 9 B e 10).

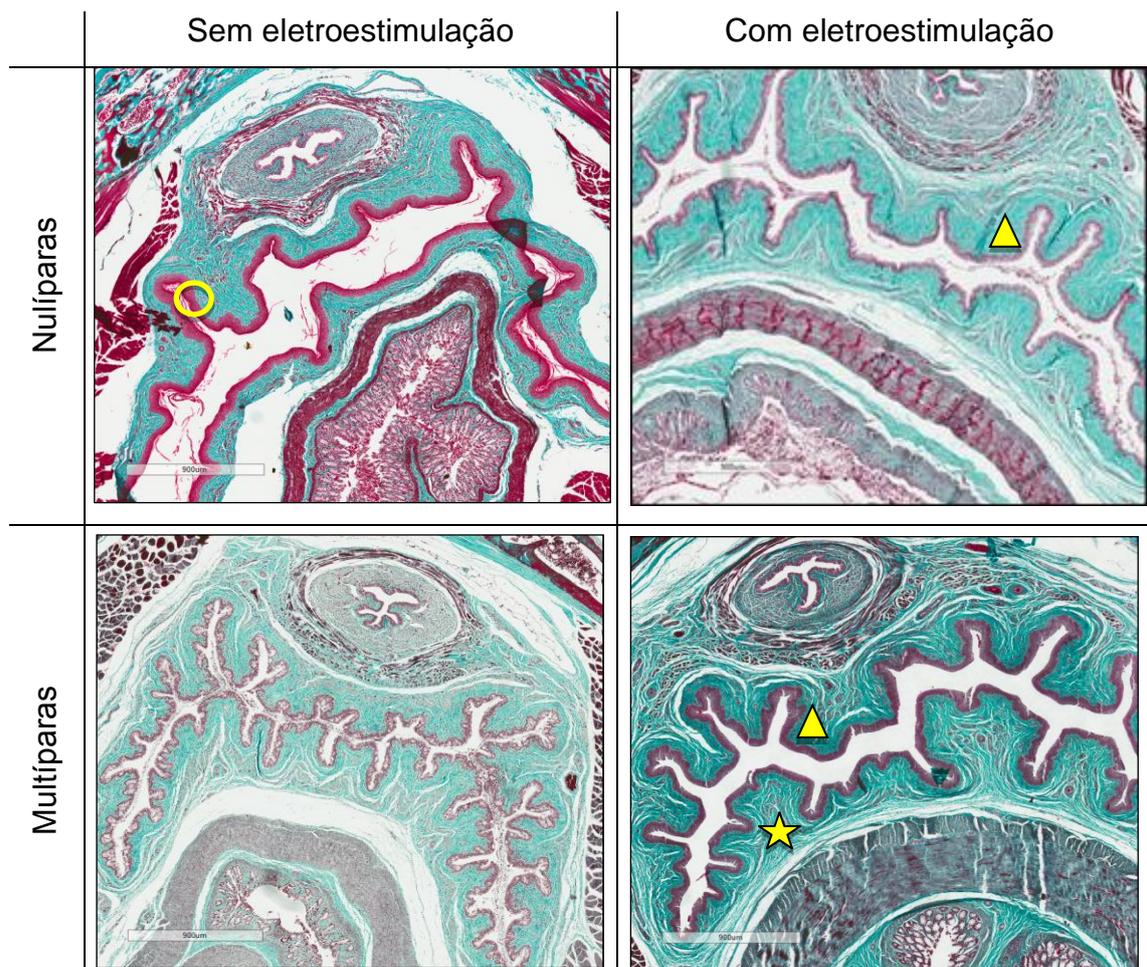
#### **4.3.3. CAMADA MUSCULAR**

Os resultados, analisados pelo Teste t, mostraram maior espessura da camada muscular no grupo eletroestimulado de múltiparas em comparação com o seu respectivo grupo controle (MEV =  $127,3 \pm 72,4 \mu\text{m}$  > MC =  $47,8 \pm 10,9 \mu\text{m}$ ) ( $p < 0,05$ ). Não houve diferenças entre o grupo eletroestimulado de nulíparas em comparação com seu respectivo grupo controle (NEV =  $91,6 \pm 49,9 \mu\text{m}$   $\approx$  NC =  $71,9 \pm 22,8 \mu\text{m}$ ) ( $p > 0,05$ ), assim como entre os grupos controles de nulíparas e

múltiparas (NC  $\approx$  MC) ( $p > 0,05$ ) e entre os grupos respectivos eletroestimulados (NEV  $\approx$  MEV) ( $p > 0,05$ ) (Figuras 9 C e 10).



**Figura 9.** Espessura dos tecidos epitelial (A), conjuntivo (B) e muscular (C) da vagina de ratas Wistar nulíparas e múltiparas, submetidas ou não à eletroestimulação. Os resultados, analisados pelo Teste t, mostraram maior espessura do epitélio no grupo controle de nulíparas do que no respectivo grupo eletroestimulado (NC > NEV) ( $p < 0,05$ ). Para o tecido conjuntivo, houve maior espessura nos grupos eletroestimulados de nulíparas e múltiparas em relação aos seus respectivos grupos controles (NEV > NC; MEV > MC) ( $p < 0,05$ ) e para o tecido muscular, os resultados mostraram maior espessura no grupo eletroestimulado de múltiparas em relação ao seu respectivo grupo controle (MEV > MC) ( $p < 0,05$ ). Estão mostrados as médias e os desvios padrão.



**Figura 10.** Fotomicrografias de secções histológicas da vagina de ratas Wistar nulíparas e múltiparas, com ou sem eletroestimulação, representativas dos resultados. Na nulípara sem eletroestimulação (controle) (acima/esquerda), observar maior espessura do epitélio (círculo) na comparação com a nulípara com eletroestimulação (acima/direita). Na nulípara eletroestimulada (acima/direita) observar maior espessura do tecido conjuntivo (triângulo) na comparação com a nulípara sem eletroestimulação (controle) (acima/esquerda). Na múltipara com eletroestimulação (abaixo/direita) notar maior espessura do tecido conjuntivo (triângulo) e muscular (estrela), na comparação com a múltipara sem eletroestimulação (controle) (abaixo/esquerda). Coloração: Tricrômico de Gomori; barra de aumento = 900 µm.

#### 4.4. AVALIAÇÃO DO EFEITO DA EV NAS CAMADAS DA URETRA

Para avaliar o efeito da EV nos tecidos que compõem a uretra, foram tomadas as médias das espessuras dos tecidos epitelial, conjuntivo e muscular, em quatro pontos equidistantes (paredes anterior, posterior e laterais) das secções histológicas das ratas Wistar dos grupos controles de nulíparas e múltiparas (NC e MC) e dos respectivos grupos eletroestimulados (NEV e MEV).

#### **4.4.1. EPITÉLIO**

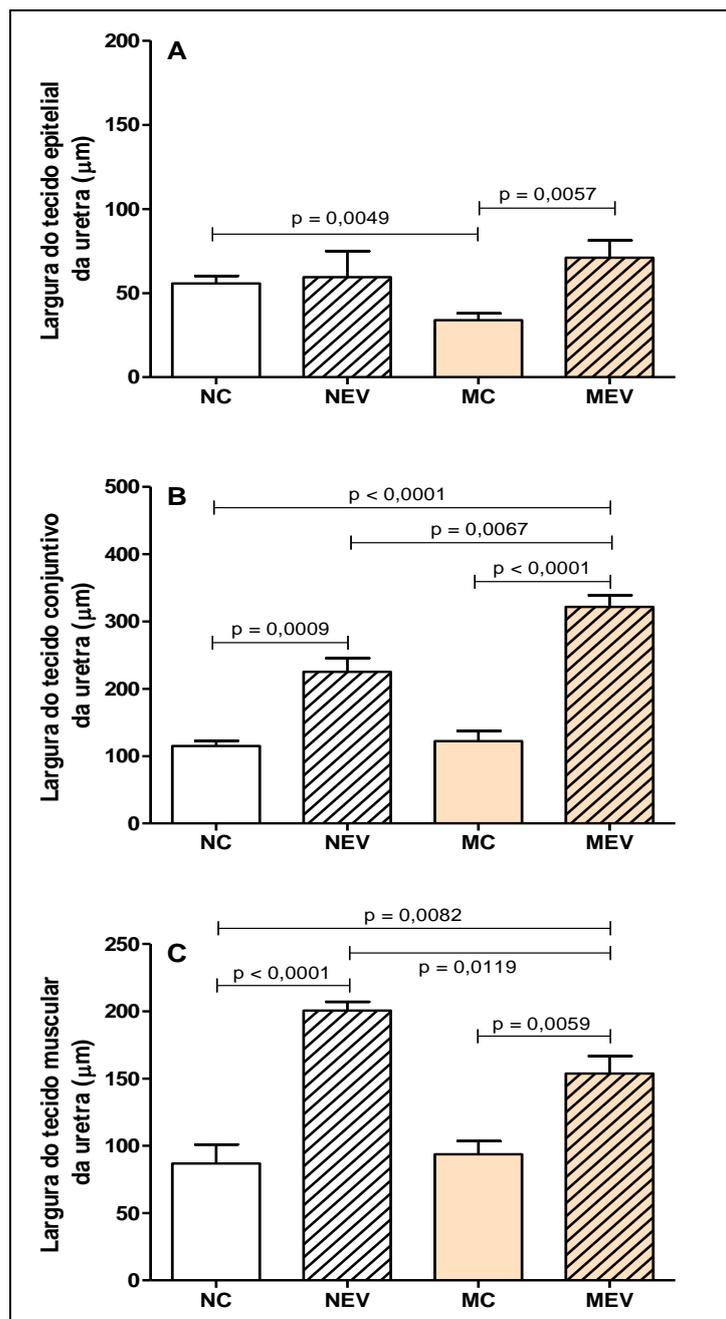
Os resultados, analisados pelo Teste t, mostraram maior espessura do tecido epitelial no grupo controle de nulíparas na comparação com o grupo controle de múltíparas (NC =  $55,8 \pm 9,6 \mu\text{m}$  > MC =  $33,9 \pm 10,0 \mu\text{m}$ ) ( $p < 0,05$ ). Também houve maior espessura do tecido epitelial no grupo eletroestimulado de múltíparas em relação ao seu respectivo grupo controle (MEV =  $71,0 \pm 23,0 \mu\text{m}$  > MC =  $33,9 \pm 10,0 \mu\text{m}$ ) ( $p < 0,05$ ). Não houve diferenças entre o grupo controle de nulíparas e seu respectivo grupo eletroestimulado (NC =  $55,8 \pm 9,6 \mu\text{m}$   $\approx$  NEV =  $59,5 \pm 34,6 \mu\text{m}$ ) ( $p > 0,05$ ) (Figuras 11 A e 12).

#### **4.4.2. TECIDO CONJUNTIVO**

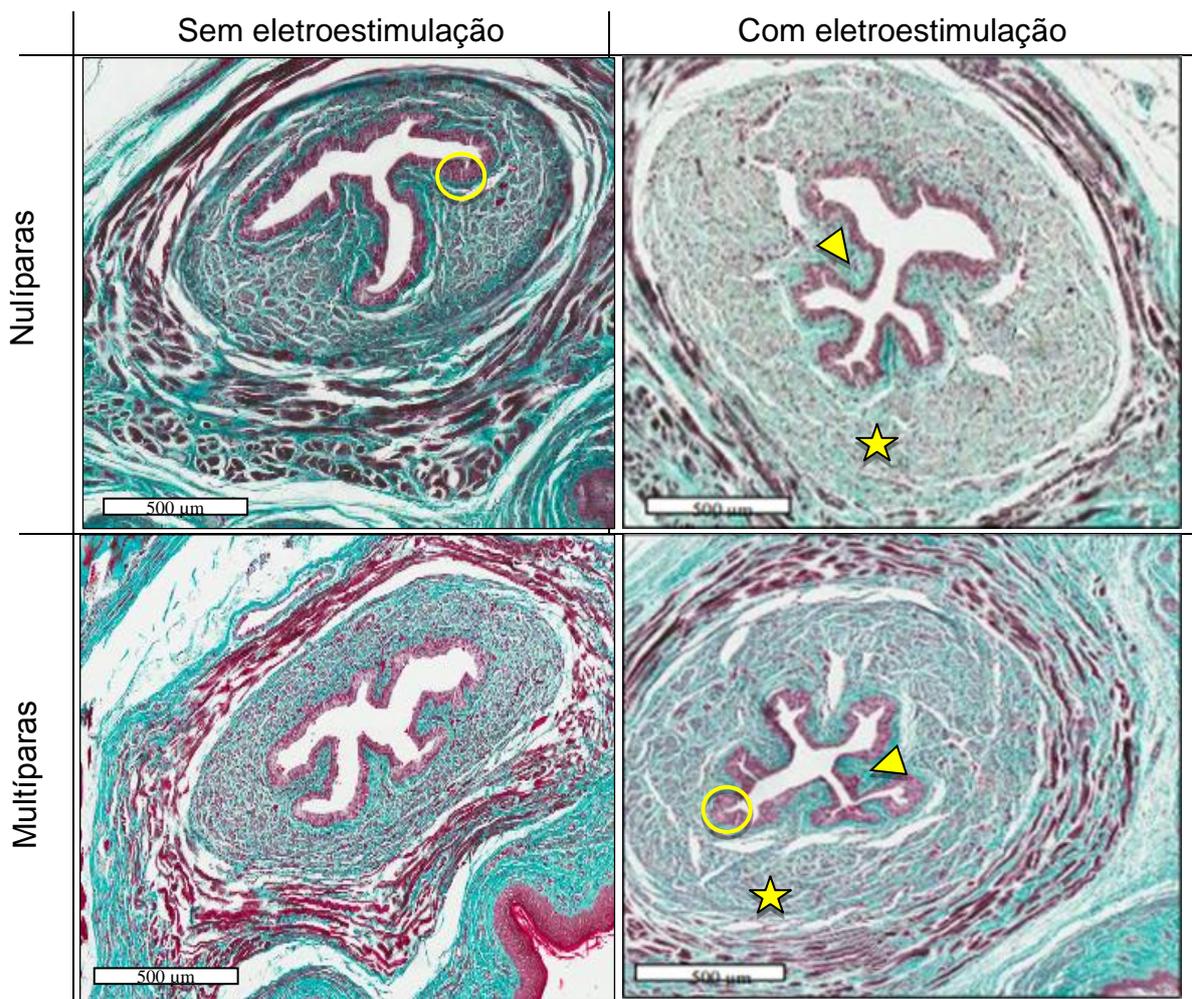
Os resultados, analisados pelo Teste t, mostraram maior espessura do tecido conjuntivo subepitelial nos grupos eletroestimulados na comparação com seus respectivos grupos controles de nulíparas (NEV =  $225,3 \pm 45,3 \mu\text{m}$  > NC =  $115,0 \pm 17,5 \mu\text{m}$ ) e de múltíparas (MEV =  $321,6 \pm 38,4 \mu\text{m}$  > MC =  $122,5 \pm 33,3 \mu\text{m}$ ) ( $p < 0,05$ ). Os resultados também mostraram maior espessura no grupo MEV na comparação com os grupos NC e NEV ( $p < 0,05$ ). Não houve diferenças entre os grupos controles de nulíparas e múltíparas (NC  $\approx$  MC) ( $p > 0,05$ ) (Figuras 11 B e 12).

#### **4.4.3. CAMADA MUSCULAR**

Os resultados, analisados pelo Teste t, mostraram maior espessura da camada muscular nos grupos eletroestimulados, na comparação com seus respectivos grupos controles de nulíparas (NEV =  $200,5 \pm 14,5 \mu\text{m}$  > NC =  $86,8 \pm 31,8 \mu\text{m}$ ) e de múltíparas (MEV =  $153,8 \pm 28,8 \mu\text{m}$  > MC =  $93,8 \pm 21,8 \mu\text{m}$ ) ( $p < 0,05$ ). Os resultados também mostraram maior espessura no grupo eletroestimulado de múltíparas, na comparação com o grupo controle de nulíparas (MEV =  $153,8 \pm 28,8 \mu\text{m}$  > NC =  $86,8 \pm 31,8 \mu\text{m}$ ) ( $p < 0,05$ ), assim como maior espessura no grupo NEV na comparação com o grupo MEV ( $p < 0,05$ ). Não houve diferenças entre os grupos controles de nulíparas e múltíparas (NC  $\approx$  MC) ( $p > 0,05$ ) (Figuras 11 C e 12).



**Figura 11.** Espessura dos tecidos epitelial (A), conjuntivo (B) e muscular (C) da uretra de ratas Wistar nulíparas e múltíparas, submetidas ou não à eletroestimulação. Os resultados, analisados pelo teste t, mostraram maior espessura do epitélio no grupo controle de nulíparas do que no grupo controle de múltíparas (NC > MC) ( $p < 0,05$ ). De igual modo, o grupo de múltíparas eletroestimulado obteve maior espessura do que o seu respectivo grupo controle (MEV > MC) ( $p < 0,05$ ). No tocante ao tecido conjuntivo, os resultados pelo Teste t, mostraram maior espessura nos grupos eletroestimulados de nulíparas e múltíparas em relação aos seus respectivos grupos controles (NEV > NC; MEV > MC) ( $p < 0,05$ ). Também o grupo MEV mostrou maior espessura do tecido conjuntivo do que NC e NEV ( $p < 0,05$ ). Para o tecido muscular, os resultados pelo Teste t, mostraram maior espessura nos grupos eletroestimulados de nulíparas e múltíparas em relação aos seus respectivos grupos controles (NEV > NC; MEV > MC) ( $p < 0,05$ ). Além disso, o grupo MEV demonstrou maior espessura do tecido muscular em relação ao grupo NC ( $p < 0,05$ ), assim como o grupo NEV demonstrou maior espessura do tecido muscular que o grupo MEV ( $p < 0,05$ ). Estão mostrados as médias e os desvios padrão.



**Figura 12.** Fotomicrografias de secções histológicas de uretra de ratas Wistar nulíparas e múltiparas, com ou sem eletroestimulação, representativas dos resultados. Observar no animal do grupo NC (acima/esquerda) maior espessura do tecido epitelial (círculo) na comparação com o do grupo MC (abaixo/esquerda) (NC >MC). Observar também maior espessura dos tecidos conjuntivo (triângulo) e muscular (estrela) em NEV (acima/direita) do que em NC (acima/esquerda) (NEV > NC). Também o tecido muscular (estrela) em NEV tem maior espessura do que em MEV (abaixo/direita) (NEV > MEV). Em MEV, observar maior espessura dos tecidos epitelial (círculo), conjuntivo (triângulo) e muscular (estrela), na comparação com MC (MEV > MC). Também MEV tem maior espessura do tecido conjuntivo do que NEV e NC. Coloração: tricrômico de Gomori; barra de aumento = 500 µm.

#### 4.5. AVALIAÇÃO DO EFEITO DA EV NAS CAMADAS DO RETO

Para avaliar o efeito da EV nos tecidos que compõem o reto, foram tomadas as médias das espessuras dos tecidos epitelial, conjuntivo e muscular, em quatro pontos equidistantes (paredes anterior, posterior e laterais) das secções histológicas das ratas Wistar dos grupos controles de nulíparas e múltiparas (NC e MC) e dos respectivos grupos eletroestimulados (NEV e MEV).

#### **4.5.1. EPITÉLIO**

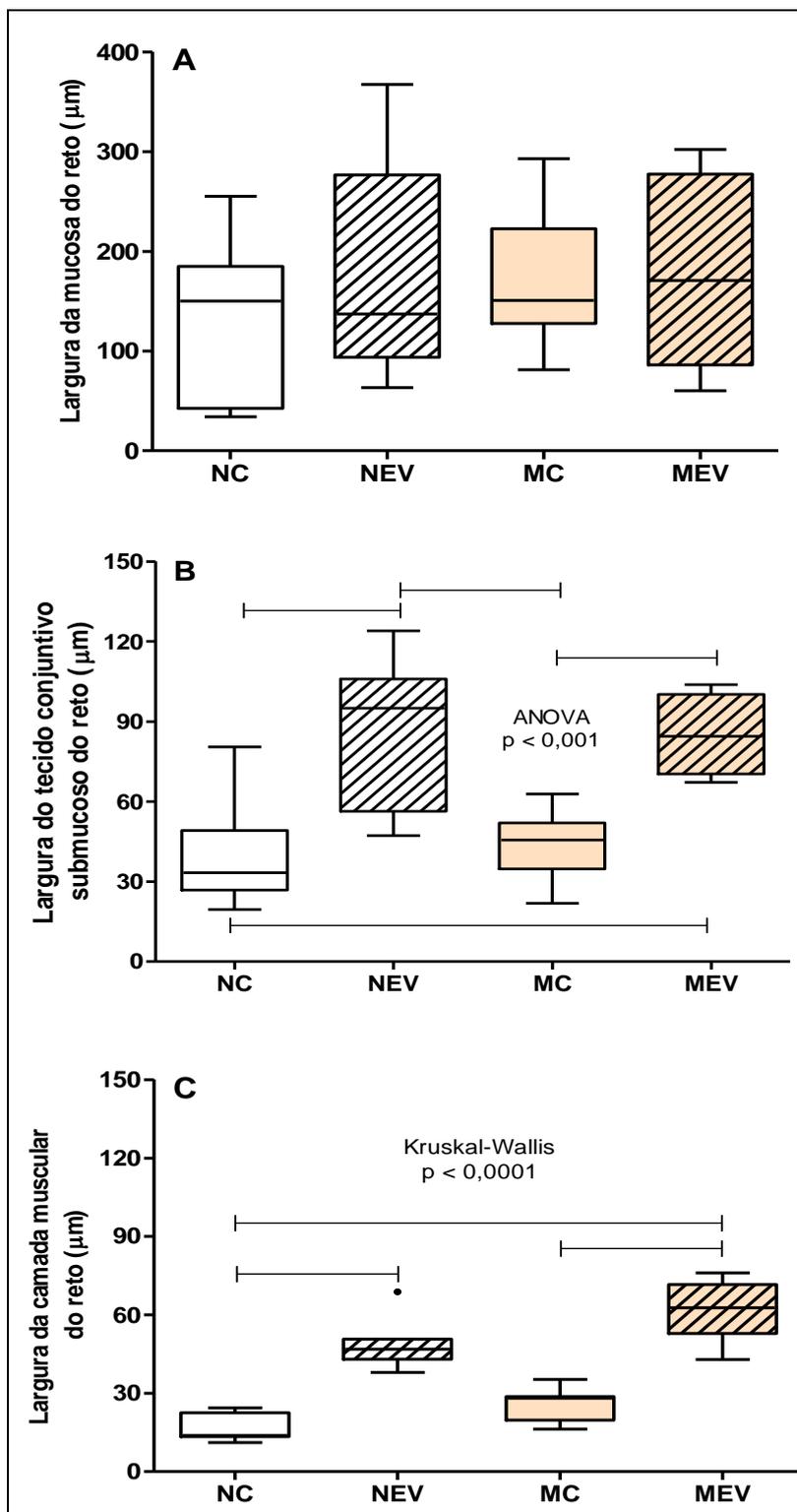
Para a espessura do tecido epitelial, os resultados pelo teste Mann Whitney mostraram que não houve diferenças entre os grupos controle de nulíparas (NC =  $128,6 \pm 78,9$ ) e múltíparas (MC =  $167,8 \pm 61,4$ ) ( $p > 0,05$ ) nem entre os respectivos grupos eletroestimulados (NEV =  $179,5 \pm 107,8$  e MEV =  $174,8 \pm 92,9$ ) ( $p > 0,05$ ) (Figuras 13 A e 14).

#### **4.5.2. TECIDO CONJUNTIVO**

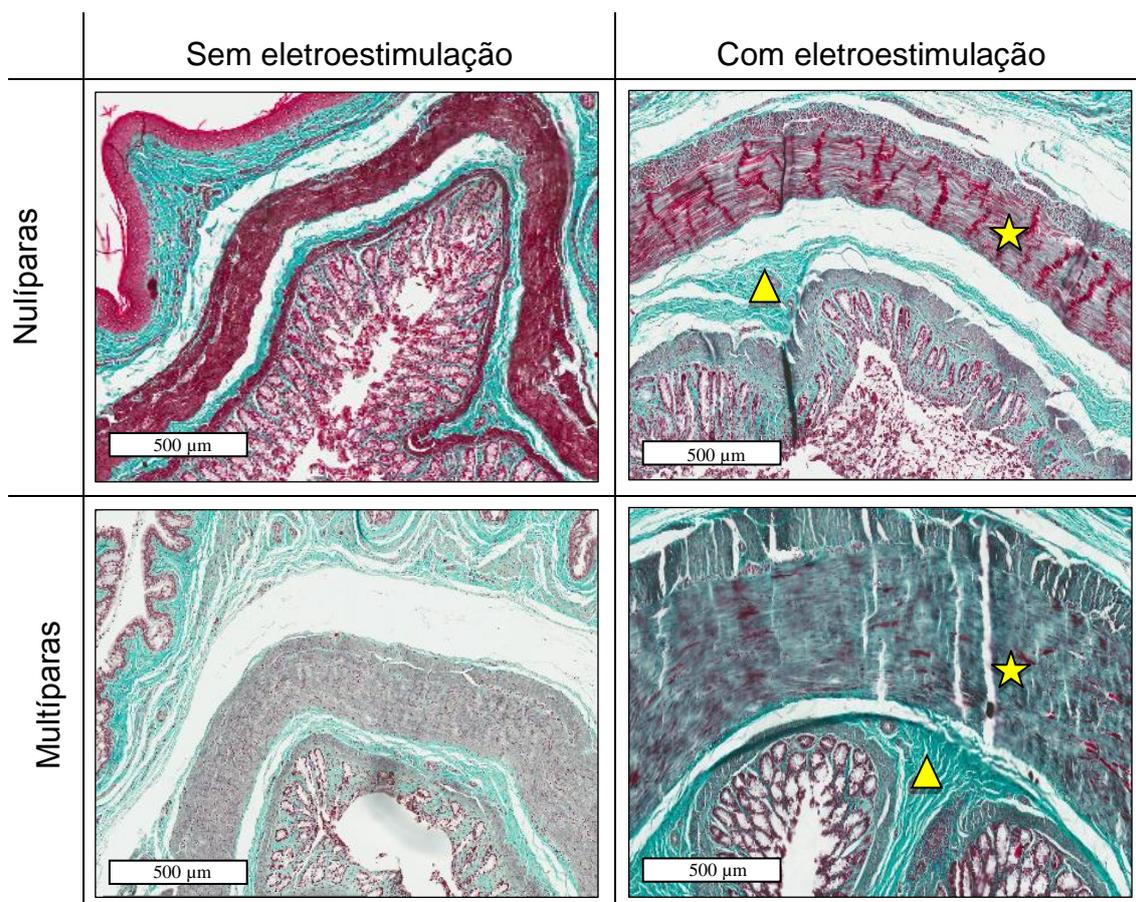
Para a espessura do tecido conjuntivo, os resultados analisados pelo teste de ANOVA, seguido pelo método de Student-Newman-Keuls, mostraram maior espessura nos grupos eletroestimulados, na comparação com seus respectivos grupos controles de nulíparas (NEV =  $84,3 \pm 28,1 \mu\text{m} > \text{NC} = 39,7 \pm 18,5 \mu\text{m}$ ) ( $p < 0,05$ ) e de múltíparas (MEV =  $85,0 \pm 14,9 \mu\text{m} > \text{MC} = 43,9 \pm 12,2 \mu\text{m}$ ) ( $p < 0,05$ ). Os resultados também mostraram maior espessura no grupo MEV, na comparação com o grupo NC, assim como houve maior espessura no grupo NEV do que no grupo MC ( $p < 0,05$ ). Não houve diferenças entre os grupos controles de nulíparas e múltíparas (NC  $\approx$  MC) ( $p > 0,05$ ) nem entre os grupos respectivos eletroestimulados (NEV  $\approx$  MEV) ( $p > 0,05$ ) (Figuras 13 B e 14).

#### **4.5.3. CAMADA MUSCULAR**

Para a espessura do tecido muscular, os resultados analisados pelo teste Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn, mostraram maior espessura nos grupos eletroestimulados, na comparação com seus respectivos grupos controles de nulíparas (NEV =  $46,8 \mu\text{m} > \text{NC} = 13,8 \mu\text{m}$ ) ( $p < 0,05$ ) e de múltíparas (MEV =  $62,8 \mu\text{m} > \text{MC} = 28,1 \mu\text{m}$ ) ( $p < 0,05$ ). Os resultados também mostraram maior espessura no grupo MEV na comparação com o grupo NC ( $p < 0,05$ ). Não houve diferenças entre os grupos controles de nulíparas e múltíparas (NC  $\approx$  MC) ( $p > 0,05$ ), nem entre os grupos eletroestimulados (NEV  $\approx$  MEV) ( $p > 0,05$ ) (Figuras 13 C e 14).



**Figura 13.** Espessura dos tecidos epitelial (A), conjuntivo (B) e muscular (C) do reto de ratas Wistar nulíparas e múltíparas, submetidas ou não à eletroestimulação. Os resultados mostraram maior espessura do tecido conjuntivo e muscular nos grupos eletroestimulados comparado aos seus respectivos grupos controles (NEV > NC; MEV > MC) ( $p < 0,05$ ). O tecido conjuntivo do grupo NEV foi maior do que o do grupo MC (NEV > MC) ( $p < 0,05$ ) assim como o tecido conjuntivo do grupo MEV foi maior do que o do grupo NC (MEV > NC) ( $p < 0,05$ ). O tecido muscular do grupo MEV foi maior que o do grupo NC (MEV > NC) ( $p < 0,05$ ). Estão mostradas as medianas, quartis, valores máximos, mínimos e extremos.



**Figura 14.** Fotomicrografias de secções histológicas do reto de ratas Wistar nulíparas e múltiparas, com ou sem eletroestimulação, representativas dos resultados. A eletroestimulação causou aumentos nas camadas de conjuntivo (triângulo) e muscular (estrela) de nulípara (NEV, acima/direita) e múltipara (MEV, abaixo/direita) em relação aos respectivos controles (NC, acima/esquerda e MC, baixo/direita). Também o grupo NEV mostrou tecido conjuntivo mais espesso que o grupo MC assim como o grupo MEV mostrou o tecido muscular mais espesso que o grupo NC. Coloração: tricrômico de Gomori; barra de aumento = 500 µm.

#### 4.6. AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA (QUALITATIVA) E HISTOLÓGICA (SEMIQUANTITATIVA) DO TECIDO CONJUNTIVO

Para a análise histopatológica (qualitativa) utilizou-se 4 (quatro) campos equidistantes (200 µm<sup>2</sup>/campo) nas secções histológicas coradas pela hematoxilina e eosina.

Para a análise histológica (semiquantitativa) utilizou-se 4 (quatro) campos equidistantes (200 µm<sup>2</sup>/campo) para os leucócitos e numa área equivalente a 700 µm<sup>2</sup> para os fibroblastos/fibrócitos nas secções histológicas coradas com hematoxilina e eosina.

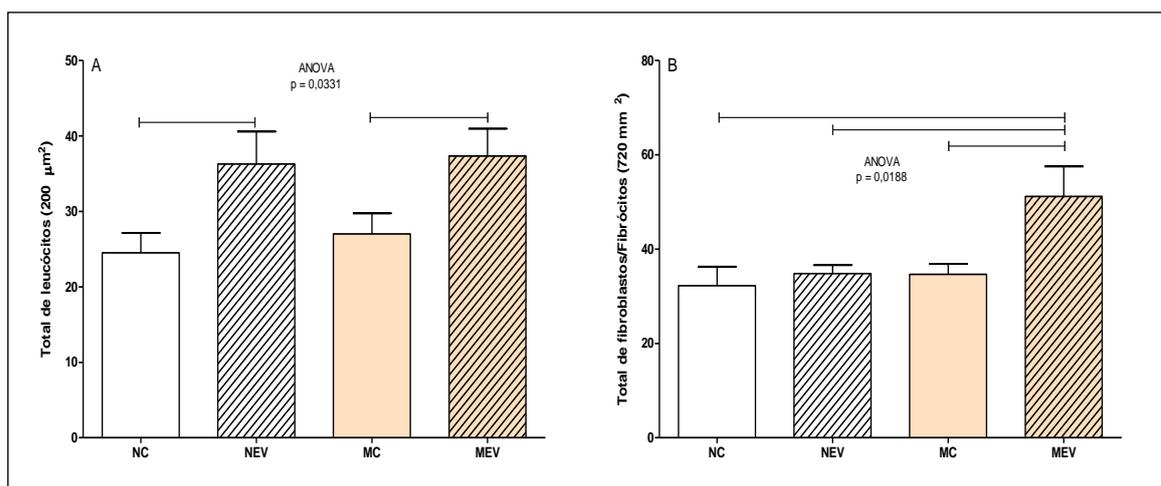
#### 4.6.1. ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA (QUALITATIVA)

Os resultados mostraram que as ratas dos 4 grupos (NC, NEV, MC, MEV) apresentaram os três órgãos (vagina, uretra e reto) preservados e sem a presença de alterações morfológicas, hemorragia, degenerações e/ou necrose nos tecidos associados. Observou-se que os leucócitos presentes nas mucosas eram, granulócitos, linfócitos e macrófagos dispersos ou em aglomerações que não caracterizavam a presença maior ou menor de processo inflamatório.

#### 4.6.2. ANÁLISE HISTOLÓGICA (SEMIQUANTITATIVA)

As análises semiquantitativas mostraram maior número de leucócitos nas mucosas das ratas dos grupos NEV ( $36,3 \pm 11,4$  céls/200  $\mu\text{m}^2$ ) e MEV ( $37,3 \pm 8,9$  céls/200  $\mu\text{m}^2$ ), na comparação com seus respectivos grupos controles (NC =  $24,5 \pm 10,0$  céls/200  $\mu\text{m}^2$ ; MC =  $27,0 \pm 5,5$  céls/200  $\mu\text{m}^2$ ) (ANOVA,  $p = 0,0331$ ) (Figura 15 A).

Para os fibroblastos/fibrócitos os resultados mostraram maior número no tecido conjuntivo do grupo MEV ( $51,2 \pm 15,7$  céls/700  $\mu\text{m}^2$ ), na comparação com seu respectivo controle (MC =  $34,7 \pm 5,5$  céls/700  $\mu\text{m}^2$ ). Houve também maior número de fibroblastos/fibrócitos no grupo MEV do que nos grupos NEV ( $34,8 \pm 4,1$  céls/700  $\mu\text{m}^2$ ) e NC ( $32,3 \pm 8,1$  céls/700  $\mu\text{m}^2$ ) (ANOVA,  $p = 0,0186$ ) (Figura 15 B).



**Figura 15.** Total de leucócitos (A) fibrócitos/fibroblastos (B) presentes nas mucosas da vagina, uretra e do reto de ratas Wistar, nulíparas e múltíparas, com ou sem eletroestimulação. Os resultados mostraram maior número de leucócitos nos grupos NEV e MEV, do que nos seus respectivos grupos controle (NC e MC) (ANOVA,  $p < 0,05$ ). Também, houve maior número de fibroblastos/fibrócitos no grupo MEV comparado aos grupos MC, NEV e NC. (ANOVA,  $p < 0,05$ ). Estão mostradas as médias e os desvios padrão.

## **4.7. AVALIAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR NOS MAPs E NOS TECIDOS ASSOCIADOS AOS ÓRGÃOS PÉLVICOS**

Para a análise imuno-histoquímica utilizou-se o anticorpo primário Ki67 que pela imunomarcação (coloração acastanhada) dos núcleos foi possível avaliar quantitativamente a proliferação celular numa área equivalente a  $66 \mu\text{m}^2$  das secções histológicas. Os resultados foram expressos em total de imunomarcações/ $66 \mu\text{m}^2$

A tabela 1 e figura 16 mostram os resultados da imunomarcação com Ki67 para o epitélio, conjuntivo, endotélio, e células musculares lisas dos órgãos pélvicos e esqueléticas dos MAPs.

### **4.7.1. EPITÉLIO**

Os resultados, analisados pela ANOVA, mostraram maior imunomarcação (Ki67+) nas células epiteliais da camada basal no grupo eletroestimulado de múltiparas (MEV), na comparação com os grupos controle de nulíparas (NC) e de múltiparas (MC) e com o grupo eletroestimulado de nulíparas (NEV) ( $p < 0,05$ ). Não houve diferenças entre os grupos controle (NC  $\approx$  MC), tampouco entre o grupo controle e eletroestimulado de nulíparas (NC  $\approx$  NEV) ( $p > 0,05$ ).

### **4.7.2. TECIDO CONJUNTIVO**

Os resultados, analisados pelo teste Kruskal-Wallis, mostraram maior imunomarcação (Ki67+) nos fibroblastos do tecido conjuntivo no grupo MEV na comparação com os grupos controle de nulíparas e múltiparas (NC  $<$  MEV  $>$  MC); e com o grupo eletroestimulado de nulíparas (MEV  $>$  NEV).

### **4.7.3. ENDOTÉLIO**

Os resultados, analisados pelo teste de ANOVA, mostraram maior número de células endoteliais Ki67+ no grupo controle de nulíparas do que no grupo controle das múltiparas (NC  $>$  MC); também, os grupos MEV e NEV apresentaram mais células endoteliais Ki67+ do que o grupo MC (NEV  $>$  MC  $<$  MEV) ( $p < 0,05$ ).

### **4.7.4. CÉLULAS MUSCULARES LISAS**

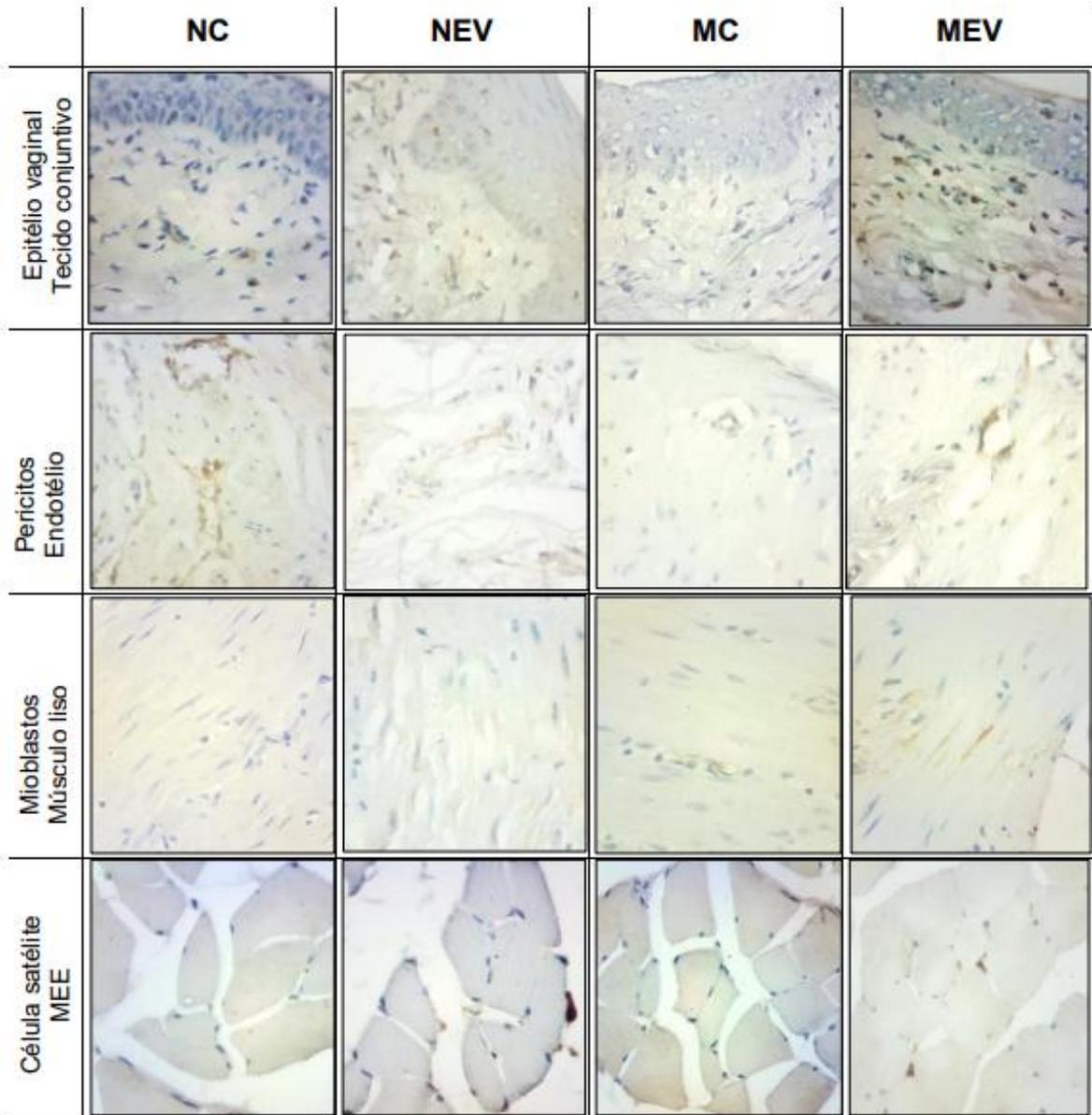
Os resultados, analisados pelo teste Kruskal-Wallis, mostraram maior imunomarcação (Ki67+) nas células musculares lisas do grupo MEV, na comparação com os grupos MC, NC e NEV ( $p < 0,05$ ). Não houve diferenças entre os grupos controles (NC  $\approx$  MC) ( $p > 0,05$ ).

#### 4.7.5. CÉLULAS MUSCULARES ESTRIADAS

Os resultados, analisados pelo teste Kruskal-Wallis, mostraram maior imunomarcção nas células musculares esqueléticas dos MAPs no grupo eletroestimulado de múltiparas, na comparação com o seu respectivo grupo controle (MEV > MC), assim como no grupo de nulíparas eletroestimuladas, na comparação com o seu respectivo grupo controle (NEV > NC); não houve diferenças entre os grupos controles de nulíparase múltiparas (NC ≈ MC).

**Tabela 1.** Total de células marcadas com Ki67 nos tecidos associados aos órgãos pélvicos e MAPs.

<b>Imunomarcção com Ki67</b>	<b>Grupos</b>	<b>% Células marcadas</b> Mediana ou média ± DP (célis/66 µm <sup>2</sup> )	<b>Teste</b> <b>Valor de p</b>
<b>Células epiteliais camada basal</b>	NC	1,3 ± 0,8	ANOVA p = 0,0033 NC < MEV > MC NEV < MEV
	NEV	2,3 ± 1,9	
	MC	2,4 ± 2,1	
	MEV	6,3 ± 3,4	
<b>Fibroblastos</b>	NC	43,0	Kruskal-Wallis p = 0,0002 NC < MEV > MC MEV > NEV
	NEV	32,5	
	MC	34,0	
	MEV	50,0	
<b>Células endoteliais</b>	NC	45,7 ± 17,5	ANOVA p = 0,0001 NC > MC NEV > MC < MEV
	NEV	39,7 ± 11,4	
	MC	3,6 ± 3,7	
	MEV	29,3 ± 22,8	
<b>Células musculares lisas</b>	NC	0,1	Kruskal-Wallis p = 0,0011 NC < MEV > MC MEV > NEV
	NEV	2,0	
	MC	0,4	
	MEV	5,3	
<b>Células musculares esqueléticas</b>	NC	0,6	Kruskal-Wallis p = 0,0001 MEV > MC ; NEV > NC NC ≈ MC
	NEV	16,7	
	MC	0,5	
	MEV	12,5	



**Figura 16.** Fotomicrografias de secções histológicas dos MAPs e da vagina de ratas Wistar nulíparas e múltíparas, com ou sem eletroestimulação, representativas dos resultados da imunomarcção com o anticorpo primário Ki67. Em destaque os núcleos das células corados em castanho, após imuno-histoquímica positiva. 400x de aumento.

## 4.8. SUMÁRIO DOS RESULTADOS

Para uma melhor visualização dos resultados, na tabela 2 estão sintetizados os resultados do estudo.

**Tabela 2.** Sumário dos resultados

Parâmetros morfológicos	Órgãos	NC	NEV	MC	MEV	Análise Estatística*
<b>Força de contração muscular (tônus evocado) (cm H<sub>2</sub>O)</b>		14	29	11±6	24±11	NEV > NC ; MEV > MC
<b>Músculos do assoalho pélvico</b>	Diâmetro (µm)	43±3	58±1	38±2	57±1	NEV > NC ; MEV > MC NC > MC
	Total de fibras	33±6	20±1	37±4	19±2	NC > NEV ; MC > MEV
	Total de mionúcleos	2±0	3±0	2±0	3±0	NEV > NC ; MEV > MC
<b>Espessura do epitélio (µm)</b>	Vagina	155±17	103±28	135±69	111±37	NC > NEV
	Uretra	56±10	60±35	34±10	71±23	NC > MC < MEV
	Reto	129±79	180±108	168±61	175±93	NC ≈ NEV ≈ MC ≈ MEV
<b>Espessura do tecido conjuntivo (µm)</b>	Vagina	185±33	379±113	177±38	286±92	NEV > NC ; MEV > MC
	Uretra	115±18	225±45	123±33	322±38	NEV > NC; MEV > MC, NC e NEV
	Reto	40±19	84±28	44±12	85±15	NC < NEV > MC; MEV > MC
<b>Espessura da camada muscular</b>	Vagina	72±23	92±50	48±11	127±72	MEV > MC
	Uretra	87±32	201±15	94±22	154±29	NC < NEV > MEV; MEV > MC
	Reto	14	47	28	63	NC < MEV > MC; NEV > NC
<b>Total de leucócitos (célis/200 µm<sup>2</sup>)</b>		27±10	36±11	27±6	37±9	MEV > MC, NEV > NC
<b>Total de fibroblastos (célis/700 µm<sup>2</sup>)</b>		32±8	35±4	35±6	51±16	MEV > MC, NC e NEV
<b>Imunomarcacão com Ki67 (célis/66µm<sup>2</sup>)</b>	Epitélio	1±1	2±2	2±2	6±3	MEV > MC, NEV e NC
	Fibroblasto	43	33	34	50	MEV > MC, NEV e NC
	Células endoteliais	46±18	40±11	4±4	29±23	NC > MC NEV > MC < MEV
	Células musculares esqueléticas	1	17	1	13	MEV > MC NEV > NC
	Células musculares lisas	0	2	0	5	NC < MEV > MC MEV > NEV

(\*) estão representados os resultados cujos valores de p foram menores do que 0,05

## **5. DISCUSSÃO**

Considerando a importância do AP na manutenção do fechamento do hiato urogenital (Corton 2009), na sustentação dos órgãos pélvicos, na manutenção das continências (urinária, fecal e anal), na função sexual (Strohbehn 1998) e tendo em vista que alterações estruturais e/ou funcionais dos MAPs podem causar as disfunções pélvicas que levam à perda da qualidade de vida dos indivíduos afetados (Wall 1993), o presente estudo avaliou o efeito da EV nos MAPs e tecidos associados à vagina, à uretra e ao reto de ratas Wistar nulíparas e múltiparas.

Como reportado, são vários os fatores de risco para o surgimento das disfunções do AP, dentre esses, destacam-se o envelhecimento, obesidade e a atividade física de alta intensidade na população em geral, mas nas mulheres, os fatores de risco são acrescidos pela multiparidade e parto vaginal (Abrams et al. 2013; Abrams et al. 2017). Assim, o presente estudo avaliou o efeito da EV em ratas Wistar com 12 meses de idade, na tentativa de elucidar os benefícios, tanto em ratas nulíparas quanto em múltiparas, diretamente na histomorfometria dos MAPs e dos tecidos associados à vagina, à uretra e ao reto, que compõem as paredes desses órgãos pélvicos. De uma forma geral a EV afetou estruturalmente os tecidos analisados, aumentando a espessura das camadas das paredes desses órgãos pélvicos, exceto do epitélio da vagina, e ocasionou o aumento da força de contração muscular evocada (tônus eletroestimulado) pela hipertrofia dos MAPs e consequente fortalecimento dos mesmos, o qual é observado, no uso desse tratamento conservador da fisioterapia, na prática clínica, em mulheres com incontinência (Correia et al. 2011). Nossos resultados em ratas nulíparas corroboraram com os dos estudos de Sousa (2017) e de Wyndaele e Poortmans (2006), O presente estudo em ratas Wistar múltiparas, até onde pesquisamos, é inédito.

Considerando ainda a impossibilidade da realização de estudos histomorfológicos prospectivos em humanos vivos (Abramowitch et al. 2009; Wieslander et al. 2009), espera-se que os resultados do presente estudo

contribuam para dirimir as opiniões e achados divergentes/conflitantes reportados na literatura (Sarmiento et al. 2022).

## **5.1. CONSIDERAÇÕES SOBRE A MULTIPARIDADE, A PARIDADE E AS DISFUNÇÕES DO AP**

No parto vaginal, dentre os fatores considerados potencialmente lesivos para as estruturas do AP destacam-se a macrosomia fetal (> 4.000 g), o segundo estágio do trabalho de parto prolongado, o uso de instrumentos como fórceps e ventosa (extração a vácuo), a ruptura perineal de terceiro grau (grave, atingindo o esfíncter anal) e a episiotomia, principalmente a mediana pelo risco de lacerar o esfíncter anal (Snooks et al. 1986; Ashton-Miller & DeLancey 2009; Dietz & Wilsom 2005; Vieira et al. 2008; Martinho et al. 2019).

Estudos de imagens de ressonância magnética forneceram evidências de que as regiões do AP que experimentam mais alongamento durante o segundo estágio do trabalho de parto correm maior risco de lesão, especialmente com uso de fórceps, e o músculo pubococcígeo, o mais curto e mais medial do MLA, apresentou a maior tensão tecidual com uma relação de alongamento de 3,26 (Ashton-Miller & DeLancey 2009).

Para Dietz e Wilsom (2005) ao revisarem as evidências disponíveis, pareceu-lhes que havia motivos suficientes para supor que o parto vaginal (ou mesmo a sua tentativa) poderia causar danos ao nervo pudendo ou seus ramos, ao esfíncter anal, ao MLA e/ou estruturas fasciais de suporte dos órgãos pélvicos. Ainda pareceu-lhes haver poucas dúvidas de que o parto vaginal pode ter efeitos negativos significativos sobre o nervo pudendo e seus ramos em algumas mulheres, pois a extensão da deterioração resultante na função nervosa parece estar associada ao comprimento do segundo estágio do trabalho de parto, em vez do modo de parto, implicando que mesmo uma tentativa de parto vaginal que termine em uma cesariana de emergência, após a dilatação completa, pode ter

efeito adverso na inervação do AP. Portanto, há indícios que o parto vaginal parece ser um fator precipitante para desnervação do AP, de forma mais grave em algumas mulheres, podendo ter um papel importante no desenvolvimento das disfunções pélvicas (Anderson 1984; Snooks et al.1984; Snooks et al. 1985; Snooks et al. 1986; Allen et al. 1990; Tetzschner et al. 1995).

A gravidez e o parto parecem ser importantes fatores associados com o desenvolvimento de IU na mulher e, portanto, todas as mulheres que tiveram um filho ou mais filhos, podem ser consideradas "em risco" de desenvolver essa disfunção em uma data posterior (Moore et al. 2013). A gravidez ocasiona, com o aumento do útero, além de mudanças na posição dos órgãos abdominopélvicos, uma sobrecarga para o AP (O'Boyle et al. 2005). Os indícios que o parto vaginal seja um fator precipitante para lesões estruturais e disfunções pélvicas, observado em algumas mulheres (Dietz e Wilsom 2005), não pôde ser comprovado nas ratas múltiparas do grupo controle do presente estudo que tiveram três gestações e aproximadamente 10 filhotes por ninhada, mas os tecidos epitelial, conjuntivo e muscular apresentaram menor espessura nestas ratas múltiparas do grupo controle em comparação com o grupo de ratas múltiparas com EV.

Com relação aos tipos de parto, estudos apontaram proteção para as disfunções pélvicas no parto cesário em relação ao parto vaginal (MacLennan et al. 2000; Dietz & Wilsom 2005; Milsom et al. 2013). No entanto, outros concluíram que há pouca proteção em relação ao parto cesário de urgência (após a dilatação completa) em relação ao eletivo (Milsom et al. 2013). Apesar do efeito protetor do parto cesário eletivo, para muitas mulheres o início da incontinência ocorre durante o período gestacional, em função das alterações fisiológicas temporárias, mas que podem indicar uma predisposição para a IU (Milsom et al. 2013). Sabe-se que a gravidez induz adaptações específicas na vagina e em seus tecidos de suporte que proporcionam maior distensibilidade vaginal para facilitar a passagem do feto, mas ocorrem à custa de maior suscetibilidade à lesão no caso em que a distensibilidade

máxima seja excedida, resultando em danos evidentes ou subclínicos, seguidos de recuperação incompleta (Alperin et al. 2010).

Na pesquisa de Melville et al. (2005), o parto vaginal com uso de instrumentos (ventosa ou fórceps) foi um dos fatores de risco fortemente associado à probabilidade de ocorrência de incontinência fecal (IF).

Driusso et al. (2020) numa revisão sistemática com meta-análise para responder à pergunta se existem diferenças na função muscular do AP em curto prazo após parto cesáreo e parto vaginal em primíparas, conseguiu demonstrar que não houve diferença na força de contração dos MAPs avaliada por manometria vaginal. No entanto, os autores identificaram a redução da força dos MAPs em mulheres submetidas a episiotomia ou parto vaginal instrumentado, quando comparado com mulheres submetidas ao parto cesáreo. Além disso, os autores sugeriram estudos longitudinais e períodos longos de seguimento para fortalecer a qualidade das evidências e fornecer provas mais conclusivas para orientar a prática clínica.

Em relação ao número de partos, Amaro et al. (2003) mostraram em seu estudo que das mulheres com IU, 95% eram multíparas, sendo que 77% delas tiveram parto vaginal. Como reportado, o aumento da paridade está associado ao maior risco de incontinências, sendo que a IU de urgência ou a IF, estão relacionadas ao maior número de partos vaginal (Amaro et al. 2003; Whitehead et al. 2009; Koelbl et al. 2009). Além da prevalência da incontinência urinária de esforço (IUE) persistente é significativamente maior em multíparas do que em nulíparas (Cardozo et al. 2005; Santos et al. 2006; Milson et al. 2017).

Além das incontinências, os estudos sugerem que o parto vaginal é um fator de risco importante também para os prolapsos de órgãos pélvicos (POP) e suas perturbações associadas na função urinária, intestinal e sexual (Bump & Norton 1998; Jelovsek et al. 2007). Segundo Alperin et al. (2010) a maioria das mulheres não desenvolve sintomas de prolapso por anos ou décadas após o parto vaginal.

Para Ashton-Miller e DeLancey (2009), características específicas da lesão durante o parto vaginal influenciam se uma mulher desenvolve prolápio mais tarde na vida. O estudo em modelo biomecânico, desenvolvido por esses mesmos autores, revelou que quanto maior o comprometimento muscular pubovisceral (músculo pubococcígeo), maior o prolapso da parede anterior da vagina (cistocele). Handa et al. (2019) concluíram em seu estudo que a forte associação entre POP e avulsão do MLA pode ser explicada em grande parte por um hiato maior e fraqueza muscular após a avulsão, como consequência do parto vaginal.

As análises qualitativas, no presente estudo, mostraram que nos grupos de nulíparas e multíparas, com ou sem eletroestimulação, os três órgãos (reto, vagina e uretra) analisados estavam preservados, sem a presença de alterações morfológicas, hemorragias, degenerações e ou necrose nos tecidos associados, ou ainda presença de infiltrado inflamatório. Também, houve aumento da força de contração nas ratas eletroestimuladas (tônus evocado) indicando boa resposta dos MAPs à EV por conta da hipertrofia que foi possível acontecer nesses tecidos do AP.

## **5.2. EFEITO DA ELETROESTIMULAÇÃO NOS TECIDOS PÉLVICOS**

Na análise dos efeitos da EE, Min et al. (2017) e Havton et al. (2019), demonstraram que variáveis como intensidade de corrente, pulso e localidade da intervenção são fatores preditivos na indução de efeito terapêutico deste recurso da fisioterapia. Esses achados são corroborados nos estudos de Min et al. (2017), em que, após a EE com frequência de 20 e 50 Hz, camundongos fêmeas apresentaram aumento significativo na expressão proteica de colágeno, fortalecimento da musculatura pélvica e regiões perineais, evidenciando que o limiar de intensidade da corrente elétrica pode ser fator responsável por esses achados.

No presente estudo, os resultados indicaram que o aumento nos componentes dos tecidos, sobretudo, o conjuntivo e o muscular influenciou favoravelmente na força de contração nas ratas eletroestimuladas após 30 sessões com frequência de 50 Hz. Além dos tecidos musculares e conjuntivos, a EV favoreceu também a proliferação de células epiteliais e endoteliais.

### **5.2.1. TECIDO MUSCULAR**

Os resultados obtidos para as ratas nulíparas e múltiparas mostraram que a aplicação de 30 sessões de EV com largura de pulso de 700ms, frequência de 50 Hz e intensidade de 2 mA foi suficiente para proporcionar maior espessura do tecido muscular esquelético estriado dos MAPs, com repercussão na força de contração muscular avaliada pelo tônus evocado pela EV. Como já foi relatado, os achados de aumento de espessura dos MAPs e aumento da força de contração muscular nas ratas NEV do nosso estudo, corroboraram com os achados de Souza (2017) e de Wyndaele e Poortmans (2006). O acréscimo (recrutamento) de fibras musculares esqueléticas do tipo II foi observado por Wyndaele & Poortmans (2006) e concluíram que a EE intermitente é eficaz e tem influência nas fibras rápidas nos músculos pélvicos de ratos.

O presente estudo sugere que o aumento do tônus evocado pela EV foi reflexo direto do aumento da espessura (hipertrofia) do tecido muscular esquelético estriado dos MAPs avaliada pelas medidas dos diâmetros das fibras, total de fibras e quantificação dos mionúcleos nos grupos com EV (nulíparas com EV = NEV e múltiparas com EV = MEV), na comparação com seus respectivos grupos controles (nulíparas controle = NC e múltiparas controle = MC).

Os MAPs, como se sabe, são constituídos de fibras musculares estriadas multinucleadas, com os núcleos situados na periferia do citoplasma. Além disso, são células diferenciadas permanentes, de modo que não podem mais se dividir. Entretanto, os músculos esqueléticos adultos de mamíferos são fisiologicamente

capazes de crescer, de aumentar o volume (sofrer hipertrofia) e também, em caso de lesões, de regenerar suas fibras, cujos processos adaptativos são atribuídos a uma população de células (Hawke & Garry 2001), que foram observadas pela primeira em 1961 por Mauro e Katz quando estudavam músculo de rã (Kartz 1961; Mauro 1961). Devido sua íntima associação com a periferia da fibra muscular esquelética, essas células foram denominadas de células-satélite (CS) por Mauro (1961). Mais especificamente, elas residem, estão encravadas em reentrâncias, entre a membrana plasmática (sarcolema) da miofibra esquelética e sua lâmina basal (externa) circundante e contínua (Mauro 1961; Muir et al. 1965). Mauro (1961) ao descrever pela primeira vez as CS, especulou que tais células poderiam ser remanescentes do desenvolvimento embrionário da célula muscular multinucleada que resulta do processo de fusão de mioblastos individuais. Muitos estudos, além de trabalhos de revisão, sobre as CS *in vitro* e *in vivo* foram publicados desde então. Vários estudos comprovaram por meios diretos ou indiretos que as células satélites adultas se originam de células multipotenciais do somito (Bentzinger et al. 2012).

Muir et al. (1965) evidenciaram pela primeira vez que as CS, monucleadas, fusiformes, com citoplasma muito escasso, não são contínuas com suas fibras musculares, ou seja, são entidades separadas. Nenhum outro tipo de célula está localizado nesta posição (Schultz & McCormick 1994). O eixo longo da célula satélite é paralelo ao eixo longo da fibra muscular e seu comprimento pode chegar a 25  $\mu\text{m}$ , mas sua largura é inferior a 5  $\mu\text{m}$  (Muir et al. 1965).

As CS do músculo esquelético maduro representam uma população pequena, morfológicamente possuindo poucas organelas, núcleo pequeno e cromatina condensada, caracterizando sua quiescência e estado transcricional inativo, ou seja, mitoticamente em repouso (fase G<sub>0</sub>) (Schultz et al. 1978; Hawke & Garry 2001). Entretanto, em resposta a estímulos, as CS quiescentes tornam-se ativadas, sendo induzidas a proliferar, se diferenciar, podendo se fundir com as miofibras preexistentes, incorporando a elas novos mionúcleos, favorecendo o

crescimento em volume (hipertrofia) delas que é acompanhado por um grande aumento no número de mionúcleos, ou podem se unir para formar novas miofibras durante a regeneração no caso de danos (Schultz & McCormick 1994; Hawke & Garry 2001; Zammit et al. 2002; Petrella 2008; Dumont et al. 2015; Rocheteau et al. 2015; Giordani et al. 2018; Sousa-Victor et al. 2022). Os achados nos estudos de Petrella et al. (2008), sugeriram que a adição de mionúcleos por meio de recrutamento de CS pode ser necessária para atingir uma hipertrofia substancial (crescimento robusto) da miofibra em humanos, ou seja, a hipertrofia é impulsionada pela ativação de CS e adição de mionúcleos mediada por elas. Os núcleos derivados das CS começam a sintetizar proteínas musculares (miofibrilas) específicas que aumentam o volume das fibras musculares, caracterizando a hipertrofia, através da formação de novos sarcômeros, em posição externa às miofibrilas existentes (Bentzinger et al. 2012).

O músculo esquelético é um tecido que apresenta importante plasticidade, respondendo, de forma adaptativa, a diferentes condições fisiológicas, na tentativa de manter sua homeostase, dispondo de um conjunto de moléculas reguladoras interligadas em vias de sinalização intracelulares que controlam a massa muscular (hipertrofia) e o processo de regeneração (Yin et al. 2013). Várias vias de sinalização estão envolvidas na regulação da massa muscular esquelética. A via do fator de crescimento semelhante à insulina-1 (Insulin-like Growth Factor-1) (IGF-1) / Akt (proteína quinase B) e a via  $\beta$ -adrenérgica são reguladores positivos do crescimento do músculo esquelético (Barton-Davis et al. 1999; Hitachi & Tsuchida, 2004). A via IGF-1/Akt desempenha um papel central na hipertrofia deste músculo (Hitachi & Tsuchida, 2004). O IGF-1 é um hormônio circulante, que se origina das atividades metabólicas do fígado, além de ser sintetizado no músculo esquelético, atuando na regulação do crescimento e manutenção da massa muscular (Clemmons, 2009). No músculo esquelético, as CS produzem e secretam IGF-1 que estimula a sua proliferação e diferenciação em mioblastos e fusão desses a

uma fibra preexistente para promover a hipertrofia muscular. Além disso, o IGF-1, além de estimular a síntese de proteínas e hipertrofia, inibe a degradação de proteínas (Clemmons, 2009).

A identificação das CS quiescentes pode ser realizada através de várias técnicas, entre as quais a análise da expressão de marcadores moleculares nucleares e de superfície, especialmente os componentes da família Paired box protein, como o Pax7 (Yin et al. 2013). Quando as CS são ativadas, essas proteínas desencadeiam a expressão dos fatores de regulação miogênica (MRFs, do inglês Myogenic Regulatory Factor), que são: o fator miogênico 5 (Myf5); o fator de diferenciação miogênica 1 (MyoD); a miogenina (MyoG) e o fator regulador miogênico 4 (MrF4), que estimulam a transcrição de genes músculo específicos durante a miogênese, proliferação, diferenciação celular, crescimento e regeneração (Holterman & Rudnicki, 2005; Bentzinger et al. 2012; Dumond et al. 2015). O Myf5 e o MyoD são específicos das CS ativadas em proliferação (Dumond et al. 2015). Evidências sugerem que o MyoD e o Myf5 promovem a ativação das CS e a sua diferenciação em mioblastos, enquanto a MyoG e o MrF4 promovem a maturação da fibra muscular (Yin et al. 2013). As CS podem ser subclassificadas de acordo com a expressão de Myf5, um marcador miogênico. As CS, que nunca manifestaram a expressão de Myf5, são consideradas células-tronco satélites (CS tronco), que se dividem simetricamente, originando duas células filhas idênticas à CS mãe, mantendo o nicho de CS tronco e auxiliando no processo de crescimento e regeneração muscular a longo prazo (Kuang et al. 2007; Yin et al. 2013). As CS que já expressaram Myf5, são consideradas CS miogênicas e sofrem um processo de divisão celular assimétrico, originando uma célula filha que não expressa Myf5 (CS tronco) e outra na qual esse fator é expresso (CS miogênica). As CS miogênicas estão comprometidas com a diferenciação durante o crescimento e regeneração muscular (Kuang et al. 2007; Yin et al. 2013). Portanto, a heterogeneidade das células satélites, atualmente apoiada por diferentes estudos,

está baseada na existência de subpopulações, uma destinada a manter o pool de CS tronco (predisposta a autorrenovação) e outra que progride para a linhagem miogênica (CS miogênica) precursora para o surgimento de mioblastos (Beauchamp et al. 2000; Collins et al. 2005; Kuang et al. 2007; Petrella 2008; Sacco et al. 2008; Rocheteau et al. 2012; Dumont et al. 2015).

Exercícios resistidos e ou com sobrecarga mecânica, e fatores locais de crescimento tecidual induzem o aumento da atividade de CS com consequente aumento de mionúcleos, resultando na produção maior da síntese proteica e consequente aumento da área seccional da fibra (hipertrofia) muscular esquelética (Barton-Davis et al. 1999; Bellamy et al. 2014; Bazgir et al. 2017; Petrella et al. 2008).

A EE, objetivando a obtenção de contrações musculares, mediante a aplicação de estímulos intermitentes de baixos níveis de corrente, também tem demonstrado ser eficaz na indução de hipertrofia dos MAPs de ratas Wistar, conforme resultados dos estudos de Souza (2017), de Windaele & Poortmans (2006) e, atualmente, nos resultados do presente estudo.

Pelo exposto, os efeitos proporcionados pela EV nos MAPs das ratas Wistar múltiparas (MEV) e nulíparas (NEV), no presente estudo, comparado com as nulíparas e múltiparas controle (NC e MC), provavelmente foram decorrentes da liberação de um conjunto de moléculas reguladoras interligadas em vias de sinalização intracelulares pela ativação das CS quiescentes; pela secreção de fatores de crescimentos, principalmente o IGF-1; pela expressão de proteínas, especialmente da família Paired box (Pax7) que por conseguinte desencadearam a expressão dos MRFs (MyoD, Myf5, MioG e MrF4) para que houvesse a diferenciação e proliferação de CS precursoras miogênicas para formar mioblastos adultos, que se fundem à fibra muscular pré-existente, incorporando novos mionúcleos, resultando em um aumento na quantidade deles na miofibra, que passam a produzir novas miofibrilas (novos sarcômeros) onde o aumento dessas

proteínas específicas, acrescido às miofibrilas pré-existentes, ocasiona o aumento de volume/diâmetro dessas miofibrilas, caracterizando a hipertrofia dos MAPs. Isso pode esclarecer os resultados nas ratas MEV e NEV que mostraram aumento do número de mionúcleos e do diâmetro das fibras dos MAPs. Por conta do diâmetro aumentado das fibras musculares, ou seja, por terem apresentado maior área de secção transversa e aumento do volume, elas ocuparam maior área (espaço) por campo microscópico, o que ocasionou uma contagem de menor número do total de fibras nas ratas MEV e NEV em comparação com as ratas NC e MC.

Finalmente, na comparação das ratas MEV com as NEV o fato de não ter havido diferenças significativas na histomorfometria dessas ratas, significa dizer que o efeito da EV nas ratas MEV foi tão eficaz quanto nas ratas NEV. Esse resultado foi muito importante para mostrar que as ratas MEV, mesmo na possibilidade de existência de alterações anteriores nos MAPs, inerentes às múltiplas gestações e múltiplos partos, responderam satisfatoriamente à EV, igualhando-se aos efeitos observados nas ratas NEV, sem gestações e partos. No presente estudo não foi observado lesões estruturais como rompimento celular no tecido muscular nas ratas com EV, mas apesar disso, essas não puderam ser descartadas totalmente, principalmente nas ratas MEV. O músculo esquelético em resposta a lesões repetidas mostra capacidade de obter uma regeneração completa e de restaurar a arquitetura celular (Shi e Garry, 2006). Tal capacidade de suportar lesões múltiplas implica no reabastecimento do pool de células satélites durante o processo regenerativo (Moss e Leblond 1971; Schultz & Jaryszak 1985; Schultz 1996). Talvez isso explique a resposta das ratas MEV diante de possíveis lesões repetidas pela multiparidade e múltiplos partos, ou seja, a EV pode ter induzido o reabastecimento do pool de células satélites nas MEV para ocorrer uma resposta semelhante à das NEV em relação a hipertrofia dos MAPs.

Embora o resultado da hipertrofia ter sido semelhante nas ratas MEV e NEV, e repercutido no aumento do tônus evocado nestas ratas, foi evidenciada uma

tendência estatística para a diferença na força de contração muscular evocada pela EV entre as múltiparas (MEV =  $24,2 \pm 10,9$  cmH<sub>2</sub>O) e entre as nulíparas (NEV =  $66,6 \pm 60,2$  cm H<sub>2</sub>O) (Teste t,  $p = 0,0927$ ). Esse resultado pode ser explicado por possíveis alterações estruturais pontuais no grupo de ratas MEV pelas múltiplas gestações e múltiplos partos (com mais de 10 filhotes em cada parto), que diminuiu em 64% o tônus evocado pela EV, na comparação com as ratas NEV. Sugere-se que em estudos futuros o número de animais por grupo seja maior para comprovar ou afastar essa tendência.

A identificação das CS pode ser realizada por imunomarcção em tecidos com técnicas histológicas de rotina, utilizando-se marcadores moleculares expressos tanto nas CS quiescentes quanto nas CS ativadas em processo de divisão celular para formar mioblastos. No presente estudo, analisamos o número de CS em processo de proliferação celular com o anticorpo primário Ki67, ou seja, sem marcadores específicos. O anticorpo Ki67 é amplamente utilizado como um marcador nuclear para calcular a quantidade de proliferação de células tumorais na histopatologia (Gerdes et al. 1991; MacCallum & Hall 2000). O Ki67 é uma proteína não histona expressa nos núcleos durante a divisão celular. Portanto, as CS estando em proliferação (em divisão celular), teriam seus núcleos imunomarcados pelo anticorpo contra a proteína Ki67 e corados em castanho, ou seja, mostrariam uma imunohistoquímica positiva. Como era de se esperar, os grupos de ratas MEV e NEV mostraram maior imunomarcção Ki67 positiva nos núcleos das células satélites das fibras musculares estriadas dos MAPs na comparação com seus respectivos grupos controle (MEV > MC; NEV > NC).

Ainda falando de tecido muscular, nosso estudo demonstrou o efeito positivo da EV no aumento da espessura da túnica muscular lisa associada aos três órgãos pélvicos (vagina, uretra e reto) nas ratas MEV em relação às ratas de seu respectivo grupo controle (MC).

Na uretra e no reto, as ratas MEV superaram a espessura desta túnica muscular em relação ao grupo de ratas NC.

Na avaliação imunohistoquímica com o anticorpo primário Ki76, o presente estudo também mostrou maior quantidade de mioblastos associados ao tecido muscular liso das ratas MEV e NEV, na comparação com seus respectivos grupos controle (MC e NC). Embora o ganho estrutural do músculo liso não reflita na força de contração muscular, essa camada integra os tecidos dos órgãos pélvicos e esse ganho se soma ao dos demais tecidos e mostra a amplitude dos efeitos da EE.

Rowlands e Cooper-White (2008) observaram que a EE promoveu hiperplasia de células musculares lisas via expressão de alfa actina e cadeia pesada de miosina de músculo liso (SMMHC) em vaso sanguíneo.

Considera-se que a hiperplasia da túnica muscular lisa da vagina, aumentando sua espessura, resulte num desempenho melhor tanto no suporte ativo deste órgão quanto na capacidade contrátil frente às forças compressivas e distensivas da cavidade abdominopélvica (DeLancey 1992).

### **5.2.2. TECIDO CONJUNTIVO**

Os resultados do presente estudo mostraram que a EV aumentou a espessura do tecido conjuntivo associado aos três órgãos pélvicos (vagina, reto e uretra) das ratas MEV e NEV em relação aos seus respectivos grupos controle (MEV > MC; NEV > NC). Nossos resultados corroboraram com os resultados obtidos nas ratas nulíparas do estudo de Sousa (2007) uma vez que o estudo com múltiparas está sendo feito somente agora no presente estudo. Embora o ganho estrutural do tecido conjuntivo não reflita na força de contração muscular, essa camada integra os tecidos dos órgãos pélvicos e esse ganho se soma ao dos demais tecidos e novamente mostra a amplitude dos efeitos da EE.

Na análise semiquantitativa, o resultado mostrou maior número de fibroblastos/fibrócitos nas mucosas das ratas MEV em relação aos demais grupos (NC < MEV > NEV).

Especificamente, na presença de lesões ou remodelação tecidual os fibroblastos proliferam e aumentam os fatores de crescimento, como os fatores de crescimento de fibroblastos FGF-1 e FGF-2 (Peplow & Baxter 2012), mas além desses, estão presentes o fator de crescimento transformador (TGF), fator de crescimento semelhante à insulina (IGF), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento de queratinócitos (KGF) e fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), que em conjunto, induzem a diferenciação dos monócitos em macrófagos para remover células mortas, mas também, estimulam a proliferação de células tronco, promovem a formação de novos vasos sanguíneos e liberam mediadores inflamatórios (Pierce & Mustoe 1995).

Quanto ao efeito da EE, os achados de Rouabhia et al. (2013) mostraram em cultivos celulares que a aplicação de doses de 50 e 200 mV/mm causou aumento no número de fibroblastos viáveis, promoveu o crescimento e migração de fibroblastos da pele e a transdiferenciação de fibroblasto para miofibroblasto. Segundo estes autores, esses efeitos são possivelmente devido à maior expressão de fatores de crescimento de fibroblastos FGF-1 e FGF-2.

Considerando o ganho estrutural no tecido conjuntivo observado nas ratas MEV e NEV do nosso estudo, possivelmente, também esteja relacionado à proliferação e diferenciação de células mesenquimais em fibroblastos, como efeito da maior expressão de FGF-1 e FGF-2.

É possível também que o ganho estrutural na matriz extracelular do tecido conjuntivo das ratas NEV, uma vez que não houve diferença no total de fibroblastos quando comparado ao seu respectivo grupo controle (NC ≈ NEV), se deva ao fato da inexistência de gestações e partos nestes grupos de ratas, denotando maior hígidez dessas células nas nulíparas.

Nos processos de reparação tecidual há uma complexa sequência de eventos que culminam ou não com remodelação dos tecidos e que dependem da resposta imunitária individual à lesão, a presença ou não de agentes infecciosos e o uso de substâncias e/ou métodos que favoreçam esse processo. Dentre os fatores individuais, o processo inflamatório é fundamental para aportar no sítio lesionado um conjunto de células de defesa que atuam, tanto na proteção contra agentes infecciosos, quanto na sinalização celular. Dessa forma, tem-se o aumento no aporte de leucócitos e proliferação de fibroblastos que, por um conjunto de sinalizadores celulares como as glicoproteínas, imunoglobulinas, citocinas, fatores de crescimento e micropartículas circulantes, atuam na modulação da resposta angiogênica e reparadora em leitos lesados (Niewland 2007; Dulmovits & Herman 2012).

Embora a análise qualitativa não tenha demonstrado infiltrado inflamatório nas mucosas dos órgãos analisados, a análise quantitativa demonstrou maior número de células migratórias (leucócitos granulócitos e agranulócitos) nas mucosas das ratas MEV e NEV, na comparação com seus respectivos grupos controle (MEV > MC; NEV > NC). A presença de maior número de leucócitos nas ratas MEV e NEV, principalmente nas mucosas da vagina, onde as sondas estavam posicionadas na luz desse órgão, talvez possa ser explicada pela possível ocorrência do fenômeno eletrotaxia (movimento de organismos ou células sob influência da eletricidade).

Finalmente, foi observado inúmeras células mesenquimais Ki67<sup>+</sup> adjacentes aos capilares, que são as responsáveis pela formação de novas células endoteliais (pericitos), indicando que a EV favoreceu o surgimento de novos vasos sanguíneos. Um dos aspectos da renovação tecidual e/ou reparação de lesões é a formação de novos vasos sanguíneos (angiogênese). Sabe-se que a EE tem a capacidade de acelerar a reparação de lesões, ativando as vias de sinalização da angiogênese e pela proliferação de fibroblastos. Isso foi demonstrado num estudo in vitro, em que

a EE ativou a via de sinalização da proteína quinase ativada por mitogênio (MAPK), desencadeando o surgimento de novos vasos sanguíneos (Rajendran et al. 2021). Além disso, Bai et al. (2011) mostrou que células endoteliais humanas sob EE são induzidas a expressarem o receptor para o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e, conseqüentemente, regulam positivamente a secreção de VEGF e a migração de células endoteliais.

### **5.2.3. TECIDO EPITELIAL**

No nosso estudo, na uretra, houve aumento do epitélio das ratas MEV em comparação com o seu respectivo controle (MC). Na vagina não houve aumento da espessura do epitélio nas ratas MEV e NEV em relação às MC e NC respectivamente. No reto não houve diferenças entre os grupos.

Cui et al. (2021) demonstraram que a proliferação de queratinócitos e sua secreção de citocinas e fatores de crescimento podem ser ativados pela EE para favorecer a cicatrização de lesões cutâneas. Também observaram em cultivos de queratinócitos eletroestimulados que estes exibiram maior capacidade de proliferação e secreção de interleucinas (IL-6, IL-1 $\alpha$  e IL-8), regulador de crescimento oncogênico (GRO $\alpha$ ), FGF2 (fator de crescimento de fibroblastos) e VEGF-A (fator de crescimento endotelial vascular); além disso, os queratinócitos aumentaram a produção de queratina decorridas 6 h da EE.

O resultado do aumento do espessamento do epitélio na uretra das MEV pode indicar que a EV ocasionou maior expressão de citocinas e fatores de crescimento, favorecendo o ganho estrutural no tecido epitelial de revestimento neste órgão.

O resultado na vagina, de não ter produzido o aumento da espessura da camada epitelial nas ratas NEV corroborou com o resultado do estudo de Sousa (2017). Segundo este autor, provavelmente o não crescimento do epitélio na vagina das ratas nulíparas eletroestimuladas deveu-se ao fato da introdução da sonda,

assim como a manipulação e ajustes durante as sessões, terem sido feitas na própria luz desse órgão, além do fato que a EE promove adaptações biofísicas e bioquímicas no tecido. Do mesmo modo poderíamos transferir tal explicação para o resultado de não ter havido aumento do epitélio na vagina das MEV do nosso estudo, por terem também na luz da vagina a sonda de EE. Além disso, poderia ser acrescido, talvez, o fato de terem tido múltiplos partos, com vários filhotes em cada parto atravessando a luz deste órgão.

A imunomarcção com o Ki67 mostrou que as células epiteliais basais dos epitélios de revestimento das MEV, encontravam-se em maior quantidade do que nos demais grupos (NC < MEV > NC: MEV > NEV) indicando uma resposta positiva na renovação epitelial, até mesmo na vagina onde a sonda estava posicionada na luz desse órgão. Portanto, embora na vagina essa renovação epitelial não tenha resultado em aumento do espessamento da camada epitelial, a imunomarcção Ki67 positiva nas células basais demonstrou que não houve dano pela EV à renovação do epitélio de revestimento deste órgão, apesar da sonda estar posicionada na sua luz.

Considerando a interação entre os órgãos pélvicos e o AP, acredita-se que a aplicação de 30 sessões de EV com largura de pulso de 700 ms, frequência de 50 Hz e intensidade de 2 mA favoreceu o ganho de elementos teciduais estruturais, com reflexos positivos na sustentação e função destes órgãos e na força de contração dos MAPs. Acreditamos também que o presente estudo, corroborando com o estudo de outros (Wyndaele & Poortmans 2006; Sousa 2007), com efeito positivo da EV em ratas Wistar, tanto em múltiparas quanto em nulíparas, possa contribuir para reforçar sua aplicabilidade na prevenção/tratamento/cura das disfunções do AP para uma melhor qualidade de vida das mulheres, principais portadoras destas afecções.

## **6. CONCLUSÃO**

Os resultados da comparação entre os grupos de ratas Wistar nulíparas e múltíparas (controle x intervenção) permitem concluir que a EV:

- Aumentou a força de contração dos MAPs em nulíparas e múltíparas;
- Aumentou a espessura dos MAPs (hipertrofia muscular) em nulíparas (NEV > NC) e múltíparas (MEV > MC) pela mitose das células satélites e aumento no diâmetro das fibras;
- Não aumentou a espessura do epitélio de revestimento na vagina das nulíparas (NEV < NC) nem nas múltíparas (MEV < MC) mas aumentou na uretra das múltíparas (MEV > MC);
- Aumentou a espessura do tecido conjuntivo associado aos três órgãos (vagina, uretra e reto) nas nulíparas (NEV > NC) e múltíparas (MEV > MC);
- Aumentou a espessura da camada muscular (músculo liso) na vagina, na uretra e no reto das múltíparas (MEV > MC), assim como na uretra e no reto das nulíparas (NEV > NC);
- Aumentou o total de leucócitos/200  $\mu\text{m}^2$ ) nas mucosas das nulíparas (NEV > NC) e múltíparas (MEV > MC);
- Aumentou o total de fibroblastos/fibrócitos/700  $\mu\text{m}^2$ ) nas mucosas das múltíparas, na comparação com os demais grupos (MEV > MC; MEV > NC; MEV > NEV);
- Houve maior imunomarcção Ki67+ nas células epiteliais basais, endoteliais, musculares lisas e nos fibroblastos no grupo das múltíparas, na comparação com seu grupo controle (MEV > MC);
- Houve maior imunomarcção Ki67+ nas células satélites dos MAPs nas nulíparas (NEV > NC) e múltíparas (MEV > MC).

Considerando o conjunto dos resultados no presente estudo, ficou comprovado que a aplicação de 30 sessões de EV com largura de pulso de 700 ms, frequência de 50 Hz e intensidade de 2 mA favoreceu o ganho estrutural,

sobretudo, nos tecidos conjuntivo e muscular, com reflexos diretos no aumento da força de contração muscular dos MAPs. Os resultados mostraram a efetividade da EV tanto em ratas Wistar nulíparas quanto em múltiparas. Tal fato pode apontar para o reforço do seu uso na prática clínica, visando o fortalecimento do AP e o controle da continência exercida pelos órgãos pélvicos. Concluindo, esses resultados podem contribuir para uma maior aceitação do seu uso na prevenção/tratamento/cura das disfunções do AP, melhorando a qualidade de vida das mulheres, que são as mais frequentemente atingidas por tais afecções.

## **7. PERSPECTIVAS E LIMITAÇÕES**

O presente estudo foi realizado para avaliar o efeito da EV no AP e órgãos pélvicos de ratas Wistar múltíparas e nulíparas objetivando esclarecer tal efeito diretamente na histomorfometria dos tecidos que fazem parte destas estruturas pélvicas, tendo em vista que é escasso o seu conhecimento e praticamente inviável a realização de estudos microscópicos prospectivos nessa região em humanos vivos. Além disso, buscou-se responder questionamentos sobre a aplicabilidade da EV diante dos problemas relativos às disfunções do AP. Poucos são os trabalhos na literatura com os quais se pode comparar os resultados do presente estudo em ratas Wistar nulíparas. Nosso estudo, pela primeira vez, até onde foi pesquisado, utilizou a EV em ratas Wistar múltíparas, para avaliar seu efeito na histomorfometria do AP e dos tecidos associados à vagina, à uretra e ao reto, tendo em vista possíveis alterações inerentes a múltiplas gestações e múltiplos partos, que trazem riscos importantes para o aparecimento das disfunções pélvicas.

A escolha de ratas Wistar para o presente estudo, como já foi mencionado, deveu-se ao fato do rato de laboratório ser o animal que demonstrou ter mais semelhanças dos tecidos da região pélvica com os de humanos.

Ficou demonstrado pelos resultados do nosso estudo que a EV afetou positivamente os tecidos, tendo em vista a hipertrofia alcançada nas fibras musculares esqueléticas dos MAPs, refletindo no aumento da sua força, e o aumento de espessura (ganho estrutural) das camadas que constituem os órgãos pélvicos (vagina, uretra e reto) tanto nas ratas Wistar múltíparas quanto nas nulíparas. Também ficou comprovado que a EV não causou danos nos tecidos submetidos, apontando para a segurança desta intervenção.

Todos os resultados do presente estudo apontam para o potencial que a EE possui para a viabilização de seu uso terapêutico, principalmente nas mulheres, sejam múltíparas ou nulíparas, que estejam sob risco de desenvolver ou que já tenham comprovada a disfunção pélvica, visando melhorias na qualidade de vida delas.

O presente estudo, apesar dos resultados positivos obtidos, teve algumas limitações que foram impostas principalmente pela falta de recursos financeiros e pelas dificuldades de ordem técnica e laboratorial. Dentre as limitações podemos citar: 1) a falta de tipagem das fibras musculares esqueléticas dos MAPs, para podermos comparar com os resultados de outros pesquisadores que encontraram um recrutamento de fibras tipo II sob efeito da EE; 2) a falta de utilização de marcadores específicos para células satélites ativadas (miogênicas); 3) a não utilização de colorações específicas para fibras colágenas, elásticas e reticulares para analisar a matriz extracelular produzida que, além da contagem aumentada dos fibroblastos obtida no nosso estudo, contribuiria para acrescentar dados para o resultado do aumento da espessura do tecido conjuntivo; 4)  $n = 5$ , tanto para os grupos de múltiparas (MC e MEV) quanto para os de nulíparas (NC e NEV), que pode, inclusive, ter influenciado no resultado do tônus muscular evocado que mostrou uma tendência estatística para menor nas ratas MEV em relação às NEV. Com relação ao número de ratas por grupo ( $n=5$ ), não foi possível ser maior tendo em vista a determinação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA), a qual analisou e aprovou o presente estudo. Essa comissão, de acordo com a recomendação vigente, sinalizou reduzir o uso de animais para inibir exageros de eutanásia e uso indevido de recursos financeiros.

Sugerimos que nos próximos estudos essas limitações possam ser dirimidas.

## **7. 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; 144: 146-58.
2. Abrams P, Cardozo L, Khoury S, Wein A, editors. *Incontinence: 4th International Consultation on Incontinence.* Paris. July 5-8, 2008 Health Publications Ltd; 2009.
3. Abrams P, Cardozo I, Khoury S, Wein A, editors. *Incontinence: 5th International Consultation on Incontinence.* Paris: February, 2012 IC5UD-EAU; 2013.
4. Abrams P, Cardozo I, Wagg A, Wein A, editors. *Incontinence: 6th International Consultation on Incontinence.* Tokyo. September, 2016 ICS ICUD; 2017.
5. Aitola P, Lehto K, Fonsell R, Huhtala H. Prevalence of faecal incontinence in adults aged 30 years or more in general population. *Colorectal Dis.* 2010;12: 687-91.
6. Allen RE, Hosker GL, Smith AR, Warrell DW. Pelvic floor damage and childbirth: a neurophysiological study. *Br J Obstet Gynaecol.* 1990;97:770-9.
7. Alperin M, Feola A, Duerr R, Moalli P, Abramowitch S. Pregnancy and delivery-induced biomechanical changes in rat vagina persist postpartum. *Int Urogynecol J.* 2010;21:1169-74.
8. 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.
9. Alperin M, Lawley DM, Esparza MC, Lieber RL. Pregnancy-induced adaptations in the intrinsic structure of rat pelvic floor muscles. *Am J Obstet Gynecol.* 2015;213:191-7.
10. Amaro JL, Gameiro MO, Padovani CR. Treatment of urinary stress incontinence by intravaginal electrical stimulation and pelvic floor physiotherapy. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct.* 2003;14:204-8.

11. Amaro JL, Macharelli CA, Kawano PR, Padovani CR, Aragon F, Yamamoto HA, et al. Prevalência e implicações da incontinência urinária e fecal em mulheres. *Femina*. 2008;36:505-10.
12. Anderson RS. A neurogenic element to urinary genuine stress incontinence. *Br J Obstet Gynaecol*. 1984;91:41-5.
13. Ashton-Miller JA, DeLancey JOL. Functional anatomy of the female pelvic floor. *Ann N Y Acad Sci*. 2007;1101:266-96.
14. Ashton-Miller JA, Delancey JOL. On the biomechanics of vaginal birth and common sequelae. *Annu Rev Biomed Eng*. 2009;11:163-76.
15. Ashton-Miller JA, Howard D, DeLancey JOL. The Functional Anatomy of the Female Pelvic Floor and Stress Continence Control System. *Scand J Urol Nephrol Suppl*. 2001;207:1-7.
16. Aytan H, Ertunç D, Tok EC, Yaşa O, Nazik H. Prevalence of pelvic organ prolapse and related factors in a general female population. *Turk J Obstet Gynecol*. 2014;11:176-180.
17. Bai H, Forrester JV, Zhao M. DC electric stimulation upregulates angiogenic factors in endothelial cells through activation of VEGF receptors. *Cytokine*. 2011;55:110-115.
18. Barton-Davis ER, Shoturma DI, Sweeney HL. Contribution of satellite cells to IGF-I induced hypertrophy of skeletal muscle. *Acta Physiol Scand*. 1999; 167:301-5.
19. Bazgir B, Fathi R, Rezazadeh Valojerdi M, Mozdziak P, Asgari A. Satellite Cells Contribution to Exercise Mediated Muscle Hypertrophy and Repair. *Cell J*. 2017;18:473-84.
20. Beauchamp JR, Heslop L, Yu DS, Tajbakhsh S, Kelly RG, Wernig A, et al. Expression of Cd34 and Myf5 defines the majority of quiescent adult skeletal muscle satellite cells. *J. Cell Biol*. 2000;151:1221-1234.
21. Bellamy LM, Joanisse S, Grubb A, Mitchell CJ, McKay BR, Phillips SM, Baker S, Parise G. The acute satellite cell response and skeletal muscle hypertrophy following resistance training. *PLoS One*. 2014;4:e109739.

22. Bentzinger CF, Wang YX, Rudnicki MA. Building muscle: molecular regulation of myogenesis. *Cold Spring Harbor Perspect Biology*. 2012;4:a008342.
23. Berghmans B. El papel del fisioterapeuta pélvico. *Actas Urológicas Españolas*. 2006;30:110-122.
24. Bernardes NO, Péres FR, Souza EL, Souza OL. Métodos de tratamento utilizados na incontinência urinária de esforço genuína: um estudo comparativo entre cinesioterapia e eletroestimulação endovaginal. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2000;22:49-54.
25. Bezerra LR, Vasconcelos JA, Vasconcelos CT, Karbage SA, Lima AC, Frota IP, et al. Prevalence of unreported bowel symptoms in women with pelvic floor dysfunction and the impact on their quality of life. *Int Urogynecol J*. 2014;25: 927-33.
26. Bharucha AE, Zinsmeister AR, Locke GR, Seide BM, McKeon K, Schleck CD, et al. Prevalence and burden of fecal incontinence: a population-based study in women. *Gastroenterology*. 2005;129:42-9.
27. Bharucha AE, Dunivan G, Goode PS, Lukacz ES, Markland AD, Matthews CA, et al. Epidemiology, pathophysiology, and classification of fecal incontinence: state of the science summary for the National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases (NIDDK) workshop. *Am J Gastroenterol*. 2015;110:127-36.
28. Bliss DJ, Mimura T, Berghmans B, Bharucha A, Chiarioni G, Emmanuel A, et al. Assessment and conservative management of faecal incontinence and quality of life in adults. In: Abrams P, Cardozo I, Wagg A, Wein A, editors. *Incontinence: 6th International Consultation on Incontinence*. Tokyo. September, 2016 ICS ICUD; 2017, p.1993-2085.
29. Bø K, Talseth T, Holme I. Single blind, randomised controlled trial of pelvic floor exercises, electrical stimulation, vaginal cones, and no treatment in management of genuine stress incontinence in women. *BMJ*. 1999;318:487-93.

30. Brown HW, Wexner SD, Segall MM, Brezoczky KL, Lukacz ES. Accidental bowel leakage in the mature women's health study: prevalence and predictors. *Int J Clin Pract.* 2012;66:1101-8.
31. Bump RC, Norton PA. Epidemiologia e história natural da disfunção do assoalho pélvico. *Obstet Gynecol Clin North Am.* 1998;25:723-746.
32. Caldwell KP. The electrical control of sphincter incompetence. *Lancet.* 1963; 2:174-5.
33. Cardozo L, Coyne KS, Versi E. Validation of the urgency perception scale. *BJU Int.* 2005;95:591-6.
34. Chêne G, Mansoor A, Jacquetin B, Mellier G, Douvier S, Sergent F, et al. Female urinary incontinence and intravaginal electrical stimulation: an observational prospective study. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2013; 170:275-80.
35. Cheon C, Maher C. Economics of pelvic organ prolapse surgery. *Int Urogynecol J.* 2013;24:1873-6.
36. Clemmons DR. Role of IGF-I in skeletal muscle mass maintenance. *Trends Endocrinol Metab.* 2009;20:349-56.
37. Collins CA, Olsen I, Zammit PS, Heslop L, Petrie A, Partridge TA, et al. Stem cell function, self-renewal, and behavioral heterogeneity of cells from the adult muscle satellite cell niche. *Cell.* 2005;122:289-301.
38. Correia GN, Bossini PS, Driusso P. Eletroestimulação intravaginal para o tratamento da incontinência urinária de esforço: revisão sistemática. *Femina.* 2011;39:223-30.
39. Corton MM. Anatomy of the pelvis: how the pelvis is built for support. *Clin Obstet Gynecol.* 2005;48:611-26.
40. Corton MM. Anatomy of pelvic floor dysfunction. *Obstet Gynecol Clin North Am.* 2009;36:401-19.
41. Cosma S, Ferraioli D, Mitidieri M, Ceccaroni M, Zola P, Micheletti L, et al. A simplified fascial model of pelvic anatomical surgery: going beyond parametrium-centered surgical anatomy. *Anat Sci Int.* 2021;96:20-9.

42. 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.
43. Cui S, Rouabhia M, Semlali A, Zhang Z. Effects of electrical stimulation on human skin keratinocyte growth and the secretion of cytokines and growth factors. *Biomedical Materials.* 2021;16.
44. DeLancey JOL. Anatomic aspects of vaginal eversion after hysterectomy. *Am J Obstet Gynecol.* 1992;166:1717-1728.
45. DeLancey JOL. Anatomy and biomechanics of genital prolapse. *Clin Obstet Gynecol.* 1993;36:897-909.
46. DeLancey JOL. Structural aspects of the extrinsic continence mechanism. *Obstet Gynecol.* 1988;72:296-301.
47. DeLancey JOL. Structural support of the urethra as it relates to stress urinary incontinence: the hammock hypothesis. *Am J Obstet Gynecol.* 1994;170: 1713-20.
48. 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.
49. Dietz HP, Wilson PD. Childbirth and pelvic floor trauma. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2005;19:913-24.
50. Ditah I, Devaki P, Luma HN, Ditah C, Njei B, Jaiyeoba C, et al. Prevalence, trends, and risk factors for fecal incontinence in United States adults, 2005-2010. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2014;12:636-43.
51. Drake RL, Vogl AW, Mitchell AW. Gray's Anatomia para estudantes. Tradução de: Gray's anatomy for students, 3th ed Rio de Janeiro: Elsevier, 2015.
52. Driusso P, Beleza AC, Mira DM, Oliveira ST, Carvalho CR, Ferreira CH, et al. Are there differences in short-term pelvic floor muscle function after cesarean section or vaginal delivery in primiparous women? A systematic review with meta-analysis. *Int Urogynecol.* 2020;31:1497-1506.

53. Dulmovits BM, Herman IM. Microvascular remodeling and wound healing: a role for pericytes. *Int J Biochem Cell Biol.* 2012;44:1800-12.
54. Dumont NA, Bentzinger CF, Sincennes MC, Rudnicki MA. Satellite cells and skeletal muscle regeneration. *Compr Physiol.* 2015;5:1027-59
55. Dumont NA, Wang YX, Rudnicki MA. Intrinsic and extrinsic mechanisms regulating satellite cell function. *Development.* 2015;142:1572-81.
56. Eickmeyer SM. Anatomy and physiology of the pelvic floor. *Physical Medicine and Rehabilitation Clinics of North America.* 2017;28:455-60.
57. Friedman B. Conservative treatment for female stress urinary incontinence: simple, reasonable and safe. *Can Urol Assoc J.* 2012;6:61-3.
58. Faiena I, Patel N, Parihar JS, Calabrese M, Tunuguntla H. Conservative Management of Urinary Incontinence in Women. *Rev Urol.* 2015;17:129-39.
59. Gerdes J, Li L, Schlueter C, Duchrow M, Wohlenberg C, Gerlach C, et al. Immunobiochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferation-associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67. *Am J Pathol.* 1991;138:867-73.
60. Giordani L, Parisi A, Le Grand F. Satellite Cell Self-Renewal. *Curr Top Dev Biol.* 2018;126:177-203.
61. Gobbo M, Maffiuletti NA, Orizio C, Minetto MA. Muscle motor point identification is essential for optimizing neuromuscular electrical stimulation use. *J Neuroeng Rehabil.* 2014;25:11-17.
62. Gosling JA, Dixon JS, Critchley HO, Thompson SA. A comparative study of the human external sphincter and periurethral levator ani muscles. *Br J Urol.* 1981;53:35-41.
63. Guerquin B. The Ilio-coccygeus muscle (ICM) Does it have an enabling role in urination? *Anat Physiol.* 2017;7:S6-002.
64. Handa VL, Roem J, Blomquist JL, Dietz HP, Muñoz A. Pelvic organ prolapse as a function of levator ani avulsion, hiatus size and strength. *Am J Obstet Gynecol.* 2019;221:41-7.

65. Hawke TJ, Garry DJ. Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. *J Appl Physiol*. 2001;91:534-51.
66. Haylen BT, de Ridder D, Freeman RM, Swift SE, Berghmans B, Lee J, et al. An International Urogynecological Association (IUGA) / International Continence Society (ICS) joint report on the terminology for female pelvic floor dysfunction. *Neurourol Urodyn*. 2010;29:4-20.
67. Havton, L.A.; Christie, K.L.; Edgerton, V.R.; Gad, P.N. Noninvasive spinal neuromodulation to map and augment lower urinary tract function in rhesus macaques. *Exp. Neurol*. 2019;322:113033.
68. Heit M, Benson T, Russell B, Brubaker L. Levator ani muscle in women with genitourinary prolapse: indirect assessment by muscle histopathology. *Neurourol Urodyn*. 1996;15:17-29.
69. Herschorn S. Female Pelvic Floor Anatomy: The Pelvic Floor, Supporting Structures, and Pelvic Organs. *Rev Urol*. 2004;6:S2–S10.
70. Herschorn S, Gajewski J, Schulz J, Corcos J. A population-based study of urinary symptoms and incontinence: the Canadian Urinary Bladder Survey. *BJU Int*. 2008;101:52-8.
71. Hirata E, Fujiwara H, Hayashi S, Ohtsuka A, Abe S, Murakami G, et al. Intergender differences in histological architecture of the fascia pelvis parietalis: A cadaveric study. *Clin Anat*. 2011;24:469-77.
72. Hitachi K, Tchusida K. Role of microRNAs in skeletal muscle hypertrophy. *Front Physiol*. 2014;4:1-7.
73. Holterman CE, Rudnicki MA. Molecular regulation of satellite cell function. *Semin Cell Dev Biol*. 2005;16:575-84.
74. Hultman E, Sjöholm H, Jäderholm-Ek I, Krynicky J. Evaluation of methods for electrical stimulation of human skeletal muscle in situ. *Pflugers Arch*. 1983; 398:139-41.
75. Jelovsek JE, Maher C, Barber MD. Pelvic organ prolapse. *Lancet*. 2007;24; 369:1027-38.

76. Katz FRS. The termination of the afferent nerve fiber in the muscle spindle of the frog. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1961;243:221-25.
77. Koelbl H, Nitti V, Baessler K, Salvatore S, Sultan A, Yamaguchi O. Pathophysiology of Urinary Incontinence, Faecal Incontinence and Pelvic Organ Prolapse. In: Abrams P, Cardozo L, Khoury S, Wein A, editors. *Incontinence: 4th International Consultation on Incontinence.* Paris. July 5-8, 2008 Health Publications Ltd; 2009, p. 255-330.
78. Kuang S, Kuroda K, Le Grand F, Rudnicki MA. Asymmetric selfrenewal and commitment of satellite stem cells in muscle. *Cell.* 2007;129:999-1010.
79. Lawrence JM, Lukacz ES, Nager CW, Hsu JW, Luber KM. Prevalence and co-occurrence of pelvic floor disorders in community-dwelling women. *Obstet Gynecol.* 2008;111:678-85.
80. Lawson JO. Pelvic anatomy. I: Pelvic floor muscles. *Ann R Coll Surg Engl.* 1974;54:244-252.
81. Li W, Hu Q, Zhang Z, Shen F, Xie Z. Effect of different electrical stimulation protocols for pelvic floor rehabilitation of postpartum women with extremely weak muscle strength: Randomized control trial. *Medicine (Baltimore).* 2020; 99:19863.
82. Lien KC, Morgan DM, DeLancey JO, Ashton-Miller JA. Pudendal nerve stretch during vaginal birth: a 3D computer simulation. *Am J Obstet Gynecol.* 2005; 192:1669-76.
83. MacCallum DE, Hall PA. The biochemical characterization of the DNA binding activity of pKi67. *J Pathol.* 2000;191:286-98.
84. MacLennan AH, Taylor AW, Wilson DH, Wilson D. The prevalence of pelvic floor disorders and their relationship to gender, age, parity and mode of delivery. *BJOG.* 2000;107:1460-70.
85. Maffiuletti NA. Physiological and methodological considerations for the use of neuromuscular electrical stimulation. *Eur J Appl Physiol.* 2010;110:223-34.
86. Makol A, Grover M, Whitehead WE. Fecal incontinence in women: causes and treatment. *Womens Health.* 2008;4:517-28.

87. Martinho N, Friedman T, Turel F, Robledo K, Riccetto C, Dietz HP. Birthweight and pelvic floor trauma after vaginal childbirth. *Int Urogynecol JI*. 2019; 30: 985-90.
88. Mauro A. Satellite cell of skeletal muscle fibers. *J Biophys Biochem Cytol* 1961;9:493-98.
89. Melville JL, Fan MY, Newton K, Fenner D. Fecal incontinence in US women: a population-based study. *Am J Obstet Gynecol*. 2005;193:2071-76.
90. Messelink E.J. The overactive bladder and the role of the pelvic floor muscles. *BJU Int*. 1999;83:31-5.
91. Messelink B. Standardisation of terminology of pelvic floor muscle function and dysfunction: report from the pelvic floor clinical assessment group of the international continence society. *Neurourologyc and Urodynamics*. 2005;24: 374-80.
92. Meyer I, Richter HE. Impact of fecal incontinence and its treatment on quality of life in women. *Womens Health*. 2015;11:225-38.
93. Milsom I, Altman D, Cartwright R, Lapitan MC, Nelson R, Sillén U, et al. Epidemiology of Urinary Incontinence (UI) and other Lower Urinary Tract Symptoms (LUTS), Pelvic Organ Prolapse (POP) and Anal Incontinence (AI). In: Abrams P, Cardozo I, Khoury S, Wein A, editors. *Incontinence: 5th International Consultation on Incontinence*. Paris: Februly, 2012 ICUD-EAU; 2013, p.15-108.
94. Milsom I, Altman D, Cartwright R, Lapitan M.C, Nelson R, Sjöström S, et al. Epidemiology of Urinary Incontinence (UI) and other Lower Urinary Tract Symptoms (LUTS), Pelvic Organ Prolapse (POP) and Anal Incontinence (AI). In: Abrams P, Cardozo I, Wagg A, Wein A, editors. *Incontinence: 6th International Consultation on Incontinence*. Tokyo: September, 2016 ICUD-EAU; 2017, p.4-142.
95. 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, editors. *Incontinence.4th International Consultation on Incontinence*. Paris. July 5-8, 2008 Health Publications Ltd; 2009, p.35-111.

96. Milsom, I, Gyhagen, M. The Epidemiology, Natural History and Prevention of Pelvic Floor Disorders. *Glob. Libr. Women's Med.* 2014;1756-2228.
98. Min J, Li B, Liu C, Hong S, Tang J, Hu M, et al. Therapeutic Effect and Mechanism of Electrical Stimulation in Female Stress Urinary Incontinence. *Urology.* 2017;104:45-51.
100. Minassian VA, Drutz HP, Al-Badr A. Urinary incontinence as a worldwide problem. *Int J Gynaecol Obstet.* 2003;82:327-38.
101. Moore K, Dumouline C, Bradley C, Burgio K, Chambers T, Hagen S, et al. Adult conservative management. In: Abrams P, Cardozo I, Khoury S, Wein A, editors. *Incontinence: 5th International Consultation on Incontinence.* Paris: February, 2012 ICUD-EAU; 2013, p.1101-1228.
102. Moore KL, Dalley AF. *Anatomia orientada para clínica.* 4<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2011.
103. Moss FP, Leblond CP. Satellite cells as the source of nuclei in muscles of growing rats. *Anat.Rec.*1971;170:421-35.
104. Muir AR, Kanji AH, Allbrook D. The structure of the satellite cell in skeletal muscle. *J Anat.* 1965;99:435-44.
105. Nambiar AK, Bosch R, Cruz F, Lemack GE, Thiruchelvam N, Tubaro A, et al. EAU Guidelines on Assessment and Nonsurgical Management of Urinary Incontinence. *Eur Urol.* 2018;73:596-609.
106. Niewland R. Platelet-Derived Microparticles. In: Michelson AD, ed. *Platelets.* Second. Burlington: Elsevier; 2007:403-414.
107. Norton C, Whitehead D, Bliss DZ, Harari D, Lang J. Conservative and Pharmacological Management of Faecal Incontinence in Adults. In: Abrams P, Cardozo L, Khoury S, Wein A, editors. *Incontinence: 4th International Consultation on Incontinence.* Paris. July 5-8, 2008 Health Publications Ltd; 2009, p.1321-86.
108. Norton NJ. The Perspective of the Patient. *Gastroenterology.* 2004;126:S175-S79.
109. Norton PA. Pelvic floor disorders: the role of fascia and ligaments. *Clin Obstet Gynecol.* 1993;36:926-38.
110. Nygaard I. New directions in understanding how the pelvic floor prepares for and recovers from vaginal delivery. *Am J Obstet Gynecol.* 2015;213:121-2.

111. Nygaard I, Turvey C, Burns TL, Crischilles E, Wallace R. Urinary Incontinence and depression in middle-aged United States women. *Obstet Gynecol.* 2003;101:149-56.
112. O'Boyle AL, O'Boyle JD, Calhoun B, Davis GD. Pelvic organ support in pregnancy and postpartum. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct.* 2005;16: 69-72.
113. Parazzini F, Colli E, Origgi G, Surace M; Bianchi M, Benzi G. Risk factors for urinary incontinence in women. *European Urology.* 2000; 37: 637-43.
114. Pedraza R, Nieto J, Ibarra S, Haas EM. Pelvic muscle rehabilitation: a standardized protocol for pelvic floor dysfunction. *Adv Urol.* 2014; 2014:1-7.
115. Peng Y, Miller BD, Boone TB, Zhang Y. Modern Theories of Pelvic Floor Support. *Curr Urol Rep.* 2018;9:9.
116. Peplow PV, Baxter GD. Gene expression and release of growth factors during delayed wound healing: a review of studies in diabetic animals and possible combined laser phototherapy and growth factor treatment to enhance healing. *Photomed Laser Surg.* 2012;30:617-36.
117. 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.* 2008;104:1736-42.
118. Pierce GF, Mustoe TA. Pharmacologic enhancement of wound healing. *Annu Rev Med.* 1995;46:467-81.
119. Powell LC, Szabo SM, Walker D, Gooch K. The economic burden of overactive bladder in the United States: A systematic literature review. *Neurourol Urodyn.* 2018;37:1241-49.
120. Pownall ME, Gustafsson MK, Emerson CP Jr. Myogenic regulatory factors and the specification of muscle progenitors in vertebrate embryos. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2002;18:747-83.
121. 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;17:407-17.

122. Rajendran SB, Challen K, Wright KL, Hardy JG. Electrical Stimulation to Enhance Wound Healing. *J. Funct. Biomater.* 2021;12:40.
123. Robertson V, Ward A, Low J, Reed A. *Eletroterapia explicada: princípios e prática*. Tradução da quarta edição. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009.
124. Roch M, Gaudreault N, Cyr MP, Venne G, Bureau NJ, Morin M. The Female Pelvic Floor Fascia Anatomy: A Systematic Search and Review Academic. 2021;11;900.
125. Rocca RS. Functional anatomy of pelvic floor. *Arch Ital Urol Androl* 2016; 88:28-37.
126. Rocheteau P, Vinet M, Chretien F. Dormancy and quiescence of skeletal muscle stem cells. *Results Probl Cell Differ.* 2015;56:215-35.
127. Rocheteau P, Gayraud-Morel B, Siegl-Cachedenier I, Blasco MA, Tajbakhsh S. A subpopulation of adult skeletal muscle stem cells retains all template DNA strands after cell division. *Cell.* 2012;148:112-125.
128. Rosenbaum TY. Pelvic floor physiotherapy for women with urogenital dysfunction: indications and methods. *Minerva Urol Nefrol.* 2011;63:101-7.
129. Rouabhia M, Park H, Meng S, Derbali H, Zhang Z. Electrical stimulation promotes wound healing by enhancing dermal fibroblast activity and promoting myofibroblast transdifferentiation. *PLoS One.* 2013;8:e71660.
130. Rowlands AS, Cooper-White JJ. Directing phenotype of vascular smooth muscle cells using electrically stimulated conducting polymer. *Biomaterials.* 2008;29:4510-20.
131. Sacco A, Doyonnas R, Kraft P, Vitorovic S, Blau HM. Selfrenewal and expansion of single transplanted muscle stem cells. *Nature,* 2008;456:502-06.
132. Santos PC, Mendonça D, Alves O, Barbosa AM. Prevalência e impacto da incontinência urinária de stresse. Antes e durante a gravidez. *Acta Med Port.* 2006;19:349-56.
133. Sarmiento ALC, Sá BS, Vasconcelos AG, Arcanjo DD, Durazzo A, Lucarini M, Leite JRSA, Sousa HA, Kückelhaus SAS. Perspectives on the Therapeutic Effects of Pelvic Floor Electrical Stimulation: A Systematic Review. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 2022;19:14035.
134. Schultz, E. Satellite cell proliferative compartments in growing skeletal muscles. *Dev. Biol.* 1996;175:84-94.

135. Scarlett Y. Medical management of fecal incontinence. *Gastroenterology*. 2004;126:555-63.
136. Schultz E, Gibson MC, Champion T. Satellite cells are mitotically quiescent in mature mouse muscle: an EM and radioautographic study. *J Exp Zool*. 1978; 206:451-6.
137. Schultz E, Jaryszak DL. Effects of skeletal muscle regeneration on the proliferation potential of satellite cells. *Mech Ageing Dev*. 1985;30:63-72.
138. Schultz E, McCormick KM. Skeletal muscle satellite cells. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*. 1994;123:213-57.
139. Sengupta P. The Laboratory Rat: Relating Its Age With Human's. *Int J Prev Med* 2013;4:624-30.
140. Shi X, Garry DJ. Muscle stem cells in development regeneration and disease. *Genes & Development*. 2006; 20: 1692-1708.
141. Silva MG. Efeito da multiparidade nos tecidos dos órgãos pélvicos e perineais de ratas Wistar. Brasília. Dissertação [Mestrado em Ciências Médicas] - Faculdade de Medicina da UnB;2017.
142. Smith TM, Menees SB, Xu X, Saad RJ, Chey WD, Fenner DE. Factors associated with quality of life among women with fecal incontinence. *Int Urogynecol J*. 2013;24:493-9.
143. Snooks SJ, Badenoch DF, Tiptaft RC, Swash M. Perineal nerve damage in genuine stress urinary incontinence: an electrophysiological study. *Br J Urol*. 1985;57:422-26.
144. Snooks, SJ, Swash M, Henry MM, Setchell M. Risk factors in childbirth causing damage to the pelvic floor innervations. *Int J Colorect Dis*. 1986;1:20-4.
145. Snooks SJ, Swash M, Setchell M, Henry MM. Injury to innervation of pelvic floor sphincter musculature in childbirth. *The Lancet*. 1984;324:546-50.
146. Sousa HA. Efeitos da eletroestimulação na morfometria tecidual de pelve e períneo de ratas Wistar. Brasília. Tese [Doutorado em Ciências Médicas] - Faculdade de Medicina da UnB; 2017.

147. Sousa HA, Silva MG, Barbosa KP, Vianna LMS, Pacheco YG, Godoy JRP, Kuckelhaus SAS. Electrical stimulation structurally affects the tissues of the rectum and anus of nulliparous rats. *J Anat.* 2017;231:398-404.
148. Sousa-Victor P, García-Prat L, Muñoz-Cánoves P. Control of satellite cell function in muscle regeneration and its disruption in ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2022;23:204-26.
149. Stewart F, Berghmans B, Bø K, Glazener CM. Electrical stimulation with non-implanted devices for stress urinary incontinence in women. *Cochrane Database Syst Rev.* 2017;22:CD012.
150. Strohbehn K. Normal pelvic floor anatomy. *Obstetrics and Gynecology Clinics of North America.* 1998; 25: 683-705.
151. Subak LL, Wing R, West DS, Franklin F, Vittinghoff E, Creasman JM, et al. Weight loss to treat urinary incontinence in overweight and obese women. *N Engl J Med.* 2009;360:481-90.
152. Tetzschner T, Sørensen M, Rasmussen OO, Lose G, Christiansen J. Pudendal nerve damage increases the risk of fecal incontinence in women with anal sphincter rupture after childbirth. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 1995;74: 434-40.
153. Trujen G, Wyndaele J, Weler J. Conservative treatment of stress urinary incontinence in women: who will benefit? *Int Urogynecol J.* 2001;12:246-52.
154. Vieira LFC, Philippsen FG, Salcedo MMP, Picoloto ASB. Prolapsos genitais. In: Silveira GPG, organizador. 2 ed. São Paulo: Ginecologia baseada em evidências; 2008, p. 249-61.
155. Wall LL. The muscles of the pelvic floor. *Clinical obstetrics and Gynecology.* 1993;36:910-25.
156. Whitehead WE. Diagnosing and managing fecal incontinence: if you don't ask, they won't tell. *Gastroenterol.* 2005; 129:6.
157. Whitehead WE, Borrud L, Goode PS, Meikle S, Mueller ER, Tuteja A, et al. Fecal Incontinence in U.S. Adults: Epidemiology and Risk Factors. *Gastroenterology.* 2009;137:512-17.
158. Wieslander CK, Rahn DD, Mcintire DD, Acevedo AJF, Drewes PG, Yanagisawa H, et al. Quantification of pelvic organ prolapse in mice: vaginal

protease activity precedes increased MOPQ scores in fibulin 5 knockout mice. *Biol Reprod.* 2009;80:407-14.

159. Wing RR, West DS, Grady D, Creasman JM, Richter HE, Myers D, et al. Effect of weight loss on urinary incontinence in overweight and obese women: results at 12 and 18 months. *J Urol.* 2010;184:1005-10.
160. Wu JM, Kawasaki A, Hundley AF, Dieter AA, Myers ER, Sung VW. Predicting the number of women who will undergo incontinence and prolapse surgery, 2010 to 2050. *Am J Obstet Gynecol.* 2011;205:2305.
161. 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;17:444-48.
162. Xu X, Menees SB, Zochowski MK, Fenner DE. Economic cost of fecal incontinence. *Dis Colon Rectum.* 2012;55:586-98.
163. Yin H, Price F, Rudnicki MA. Satellite cells and the muscle stem cell niche. *Physiol Rev.* 2013;93:23-67.
164. Zammit PS, Heslop L, Hudon V, Rosenblatt JD, Tajbakhsh S, Buckingham ME, et al. Kinetics of myoblast proliferation show that resident satellite cells are competent to fully regenerate skeletal muscle fibers. *Exp. Cell Res.* 2002; 281:39-49.

## **8. ANEXOS**

## COMITÊ DE ÉTICA



1

Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/UniCEUB.

---

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



Perspective

## Perspectives on the Therapeutic Effects of Pelvic Floor Electrical Stimulation: A Systematic Review

Ana Lúcia Carneiro Sarmiento <sup>1</sup>, Bruno Silva Sá <sup>1,2</sup>, Andreanne Gomes Vasconcelos <sup>1,2</sup>, Daniel Dias Rufino Arcanjo <sup>3</sup>, Alessandra Durazzo <sup>4,\*</sup>, Massimo Lucarini <sup>4</sup>, José Roberto de Souza de Almeida Leite <sup>1</sup>, Hugo Alves Sousa <sup>1</sup> and Selma Aparecida Souza Kückelhaus <sup>1,5</sup>

<sup>1</sup> Research Center in Applied Morphology and Immunology (NuPMIA), Faculty of Medicine (FM), University of Brasília (UnB), Brasília 70910-900, DF, Brazil

<sup>2</sup> Department of Biomedicine, University Centre of the Federal District (UDF), Brasília 70390-045, DF, Brazil

<sup>3</sup> Laboratory of Functional and Molecular Studies in Physiopharmacology (LAFMOL),

Department of Biophysics and Physiology, Federal University of Piauí (UFPI), Teresina 64049-550, PI, Brazil

<sup>4</sup> CREA-Research Centre for Food and Nutrition, Via Ardeatina 546, 00178 Rome, Italy

<sup>5</sup> Correspondence: alessandra.durazzo@crena.gov.it (A.D.); selmak@unb.br (S.A.S.K.)

**Abstract:** Pelvic, perineal, and nervous lesions, which derive principally from pregnancy and childbirth, may lead to pelvic floor dysfunctions, such as organ prolapses and lesions in the nerves and muscles due to muscle expansion and physiology. It is estimated that 70% of women affected by this clinical picture have symptoms that do not respond to the classical treatments with antimuscarinic and anticholinergic drugs. Therefore, resorting to efficient alternatives and less invasive methods is necessary to assist this public health problem that predominantly affects the female population, which is more susceptible to the risk factors. This study aimed to perform an updated and comprehensive literature review focused on the effects of pelvic floor electrical stimulation, considering new perspectives such as a correlation between electric current and site of intervention and other molecular aspects, different from the present reviews that predominantly evaluate urodynamic aspects. For that purpose, PubMed and ScienceDirect databases were used to perform the search, and the *Methafi ordinatio* method was applied. With well-researched therapeutic effects, electrical stimulation induced promising results in histological, nervous, and molecular evaluations and spinal processes, which showed beneficial results and revealed new perspectives on ways to evoke responses in the lower urinary tract in a non-invasive way. Thus, it is possible to conclude that this type of intervention may be a non-invasive alternative to treat pelvic and perineal dysfunctions.

**Keywords:** pelvic floor electrical stimulation; muscle contraction; pelvic floor contraction



**Citation:** Sarmiento, A.L.C.; Sá, B.S.; Vasconcelos, A.G.; Arcanjo, D.D.R.; Durazzo, A.; Lucarini, M.; Leite, J.R.d.S.d.A.; Sousa, H.A.; Kückelhaus, S.A.S. Perspectives on the Therapeutic Effects of Pelvic Floor Electrical Stimulation: A Systematic Review. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2022**, *19*, 14035. <https://doi.org/10.3390/ijerph192114035>

Academic Editor: Barry Borran

Received: 12 September 2022

Accepted: 20 October 2022

Published: 28 October 2022

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

### 1. Introduction

During pregnancy and, principally, at childbirth, pelvic floor nerves and muscles reach alterations beyond the normal physiology, which are determinant for favoring childbirth but also induce pelvic and perineal muscle dysfunctions [1]. In this aspect, muscle and nerve expansion may induce the prolapse of pelvic organs, perineal lesion, and stress urinary incontinence, besides damaging the pudendal nerve, which may reflect on the innervation of the pelvic floor [2].

Stress urinary incontinence reaches 54.3% of pregnant women and is characterized by involuntary urine loss caused by abdominal pressure without detrusor muscle contraction [3]. In addition, muscular and vascular components contribute to urethral wall elasticity and pelvic floor innervation, but they also contribute to the conditions associated with this clinical picture [4]. Lower urinary tract dysfunction caused by neurological disorders, such as medullary lesions, sclerosis, and cerebrovascular accident, represents another clinical condition affecting urination efficiency, detrusor, and urethral sphincter contraction, bladder storage volume [5].