



Acta Ortopédica Brasileira

ISSN: 1413-7852

actaortopedicabrasileira@uol.com.br

Sociedade Brasileira de Ortopedia e
Traumatologia
Brasil

Quagliotti Durigan, João Luiz; Cancellero, Karina Maria; Guirro, Rinaldo Roberto de Jesus; Silva,
Carlos Alberto da; Ozores Polacow, Maria Luiza

Efeitos da estimulação elétrica neuromuscular no músculo sóleo de ratos: análise morfométrica e
metabólica

Acta Ortopédica Brasileira, vol. 16, núm. 4, 2008, pp. 238-241

Sociedade Brasileira de Ortopedia e Traumatologia
São Paulo, Brasil

Disponível em: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=65713427010>

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

redalyc.org

Sistema de Informação Científica

Rede de Revistas Científicas da América Latina, Caribe, Espanha e Portugal

Projeto acadêmico sem fins lucrativos desenvolvido no âmbito da iniciativa Acesso Aberto

EFEITOS DA ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA NEUROMUSCULAR NO MÚSCULO SÓLEO DE RATOS: ANÁLISE MORFOMÉTRICA E METABÓLICA

EFFECTS OF NEUROMUSCULAR ELECTRIC STIMULATION ON RATS' SOLEUS MUSCLE: A MORPHOMETRIC AND METABOLIC ANALYSIS

JOÃO LUIZ QUAGLIOTTI DURIGAN¹, KARINA MARIA CANCELLIERO², RINALDO ROBERTO DE JESUS GUIRRO³, CARLOS ALBERTO DA SILVA³, MARIA LUIZA OZORES POLACOW³

RESUMO

O objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito da estimulação elétrica neuromuscular (EE) fásica sobre os parâmetros morfométrico e metabólico do músculo sóleo de ratos, nos períodos de 3, 7 e 15 dias. Ratos *Wistar* foram divididos em 4 grupos (n=5): controle (C), EE por 3 dias (EE-3), 7 dias (EE-7) e 15 dias (EE-15). Foram analisado o conteúdo de glicogênio, massa muscular, área das fibras e densidade de área do tecido conjuntivo intramuscular. A análise estatística foi realizada pela ANOVA e Tukey ($p < 0,05$). Com relação à massa muscular, ocorreu aumento significativo no EE-15 de 11,55% comparado ao C. O conteúdo de glicogênio muscular não apresentou alterações significativas no EE-3 quando comparado ao C. Já o EE-7 e EE-15 demonstraram aumento significativo de 74,19% e 80,64%, respectivamente, comparados ao C. Na análise morfométrica, ocorreu aumento significativo no EE-15 de 16,23% em relação ao C. A densidade do tecido conjuntivo intramuscular não apresentou alterações significativas em todos os grupos submetidos à EE quando comparados com o C. A EE promoveu aumento das reservas de glicogênio nos períodos de 7 e 15 dias, bem como aumento na massa muscular, área das fibras e nas reservas de glicogênio no período de 15 dias.

Descritores: Terapia por estimulação elétrica; Ratos *Wistar*; Morfologia; Metabolismo; Fisioterapia.

Citação: Durigan JLQ, Cancelliero KM, Guirro RRJ, Silva CA, Polacow MLO. Efeitos da estimulação elétrica neuromuscular no músculo sóleo de ratos: análise morfométrica e metabólica. *Acta Ortop Bras.* [periódico na Internet]. 2008; 16(4): 238-241. Disponível em URL: <http://www.scielo.br/aob>.

SUMMARY

The aim of this work was to evaluate the effect of muscular electric stimulation (ES) on morphometric parameters of rats' soleus muscles for 3, 7 and 15 days. Rats were divided into four groups (n=5): control (C), ES for 3 days (ES-3), ES for 7 days (ES-7) and ES for 15 days (ES-15). Glycogen content, muscle mass, fibers area and area fraction of intramuscular connective tissue were assessed. The statistical analysis was performed by ANOVA and Tukey ($p < 0.05$). Regarding muscle mass, there was a significant increase in ES-15 (11.55%) compared to C. The glycogen content showed no significant changes in ES-3 when compared to C. ES-7 and ES-15 showed the significant increase of 74.19% and 80.64%, respectively, compared to C. In the morphometric analysis, increase in ES-15 (16.23%) compared to C was found. The area fraction of the intramuscular connective tissue did not show significant changes in all groups submitted to ES when compared to C. The ES fostered an increase of the glycogen content in 7 and 15 days, as well as increased muscle mass, fibers area and glycogen content in 15 days.

Keywords: Electric stimulation therapy; Rats *Wistar*; Metabolism; Physiotherapy.

Citation: Durigan JLQ, Cancelliero KM, Guirro RRJ, Silva CA, Polacow MLO. Effects of neuromuscular electric stimulation on rats' soleus muscle: a morphometric and metabolic analysis. *Acta Ortop Bras.* [serial on the Internet]. 2008; 16(4): 238-241. Available from URL: <http://www.scielo.br/aob>.

INTRODUÇÃO

Os programas de fortalecimento muscular são procedimentos importantes e muito utilizados na clínica fisioterapêutica. Além da reabilitação, há outros objetivos para se produzir hipertrofia muscular, como o fator estético, bem como para se ter um melhor rendimento esportivo.

A estimulação elétrica neuromuscular (EE) tornou-se um importante recurso para a produção de hipertrofia muscular, especialmente após os relatos do médico russo Yakov Kots em 1977 apud Kramer et al.⁽¹⁾ que a EE podia produzir ganhos de força em atletas de elite em valores de 30 a 40% maiores do que aqueles produzidos pela contração voluntária máxima do músculo.

Embora os seus protocolos experimentais não fossem bem documentados e seus resultados nunca puderam ser reproduzidos no ocidente, seus relatos contribuíram para ampliar os estudos da relação entre a EE e o fortalecimento muscular. Desde então, os

estudos desenvolvidos parecem dar suporte à afirmação de que o recurso pode fortalecer músculos tanto de indivíduos quanto aos submetidos à condição de desuso muscular.⁽²⁾ No âmbito da experimentação com animais, a maior parte dos estudos envolvendo a EE utilizou protocolos crônicos, ou seja, em longos períodos, além de eletrodos implantados. Esses estudos demonstraram que o recurso predispõe mudança das fibras musculares para lenta (IIA e I), aumento da resistência à fadiga, aumento da sua tensão tetânica, aumento da densidade de fibras, melhor perfusão, além do aumento do conteúdo de miofibrilares e células satélites^(5,6).

Além disso, o aumento da atividade contrátil que resulta da atividade física constante ou pela EE, promove a translocação de uma população de transportadores (GLUT4) para a membrana insulínica até a membrana melhorando a captação de glicose pelos músculos⁽⁷⁾.

Apesar dos diversos trabalhos que abordaram a EE aplicada de forma crônica, a literatura é escassa com relação à sua aplicação em curtos períodos (fásica). Nesse contexto, Noronha et al.⁽⁸⁾ não observaram transformações no tipo de fibra, bem como hipertrofia no músculo tibial anterior de ratos estimulados em dias alternados com eletrodos de superfície (6 minutos, 3x/semana, 8 semana). Por outro lado, foi demonstrado aumento significativo na síntese de proteínas miofibrilares e sarcoplasmáticas avaliadas após 3 horas de estimulação (100 Hz, T_{ON}: 3s, T_{OFF}: 10s, eletrodos implantados, durante 20 minutos) no músculo sóleo e extensor longo dos dedos de ratos⁽⁹⁾.

Embora existam alguns estudos em animais indicando que a EE pode produzir fortalecimento, hipertrofia muscular e alterações metabólicas, a forma de estimulação empregada pode ser um problema clínico, inviabilizando sua aplicação em humanos, uma vez que estes trabalhos utilizaram protocolos de EE crônicos (semanas e até meses) e/ou eletrodos implantados. Pautado na observação que são escassos os trabalhos com animas que indiquem transformação estrutural e metabólica por meio da EE, mimetizando os parâmetros que são utilizados em humanos, o objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito da EE fásica sobre os parâmetros morfométrico e metabólico no músculo sóleo de ratos, nos períodos de 3, 7 e 15 dias.

MATERIAIS E MÉTODOS

Ratos Wistar (3 a 4 meses, 250-300g) foram mantidos sob condições controladas de biotério, recebendo água e ração *ad libitum* e tratados segundo recomendações do Guide for Care Use of Laboratory Animals⁽¹⁰⁾. O trabalho foi aprovado pelo comitê de ética em experimentação animal da Universidade Federal de São Carlos (protocolo 010/2006).

Os animais foram divididos em 4 grupos (n=5): controle (C), estimulação elétrica durante 3 dias (EE-3), 7 dias (EE-7) e 15 dias (EE-15).

Após anestesia com pentobarbital sódico (50 mg/Kg peso), o membro posterior esquerdo foi tricotomizado e a EE foi realizada em sessão diária de 20 minutos, por um período de 3, 7 e 15 dias. Um eletrodo foi colocado na região inguinal e o outro sobre o músculo tríceps sural. Os parâmetros da estimulação elétrica foram: frequência de 10 Hz, fase de 0,4 ms e pulso quadrático bifásico. A intensidade da corrente foi padronizada em 5.0 mA, a partir da visualização da contração muscular, sendo acrescida de 1.0 mA a cada 5 minutos, com objetivo de manter uma contração efetiva durante todo o período da sessão. Os eletrodos de silicone-carbono apresentavam área de 1cm² cada.

Após o período experimental, as análises realizadas foram: conteúdo de glicogênio do músculo sóleo, além da massa, área das fibras e densidade de área do tecido conjuntivo intramuscular. Para a determinação do glicogênio muscular seguiu-se a proposta descrita por Lo et al.⁽¹¹⁾, que consta da digestão das amostras musculares em KOH 30% a 100°C e o glicogênio precipitado a partir da passagem por etanol. Entre uma fase e outra da precipitação, a amostra foi centrifugada a 3000 rpm (rotação por minuto) durante 15 minutos e o glicogênio precipitado foi submetido à hidrólise ácida na presença de fenol. Os valores foram expressos em mg/100mg de peso úmido.

Para a análise morfométrica do músculo sóleo, o seu segmento ventral foi fixado em solução tamponada de formalina e o material foi processado em parafina obtendo-se vários cortes transversais não seriados de 7µm de espessura, que foram corados pela Hematoxilina-Eosina (HE). Foi utilizado um sistema de análise de imagens constituído de um software Image Pró-plus 4.0 (Media

5 áreas por corte, num total de 5 cortes por animal). Foi utilizado um retículo quadriculado para a escolha de 15 fibras aleatoriamente, que coincidiam com as interseções. Para a análise da densidade do tecido conjuntivo intramuscular foi utilizado o sistema de planimetria por contagem de pontos. A quantificação foi realizada por meio de um retículo com área de 2500µm² contendo 56 intersecções de reta. Foi contado os pontos coincidentes no endomísio e perímísio, e a área de corte, sendo 5 cortes por animal, perfazendo um total de 280 pontos por animal. A área relativa do tecido conjuntivo (de área) foi calculada dividindo-se a soma do número de pontos coincidentes nas intersecções de reta sobre o tecido conjuntivo (endomísio e perímísio) pelo número total de pontos contados. A análise estatística foi realizada inicialmente pelo teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov e pelo teste de homogeneidade (critério de Bartlett). Após a observação que os dados contemplaram a metodologia paramétrica, foi utilizado o teste t e teste F sendo que, quando a diferença apresentou-se significativa, aplicou-se o teste de Tukey HSD para as comparações múltiplas. Para todos os cálculos, foi estabelecido um nível de significância de 5%.

RESULTADOS

Com relação a massa, não foi observado alteração significativa nos grupos EE-3 e EE-7 quando comparados ao C, houve aumento (p<0,05) no EE-15 de 11,55% comparado ao C. Além disso, EE-15 apresentou aumento (p<0,05) em relação ao EE-3, bem como ao EE-7, de 9,53% e 8,93%, respectivamente. Já o EE-3 não se diferiu significativamente do EE-7. O conteúdo de glicogênio muscular não apresentou diferenças significativas no EE-3 quando comparado ao C. Já no EE-7 demonstraram aumento (p<0,05) de 74,19% e 80,33%, respectivamente, comparados ao C, destacando que os grupos EE-3 e EE-7 diferiram significativamente.

Na análise morfométrica, os grupos EE-3 e EE-7 não apresentaram alterações significativas na área das fibras musculares quando comparados ao C, sendo que no EE-15 ocorreu aumento de 16,23% em relação ao C. Além disso, o EE-15 apresentou aumento (p<0,05) de 20,78% quando comparado ao EE-3, 14,94% ao EE-7, destacando que o EE-3 não demonstrou diferença significativa ao EE-7.

A densidade do tecido conjuntivo intramuscular não apresentou alterações significativas em todos os grupos submetidos à intervenção quando comparados com o C, bem como aos grupos EE-3, EE-7 e EE-15. Todos os valores podem ser observados na Tabela 1 e Figura 1.

	C	EE-3	EE-7
Massa (mg)	124,6±5	126,9±5,1	127,6±3,9
Área (µm2)	2574±560	2478±351	2603±350
Conjuntivo (%)	8,82±3,55	7,78±3,47	9,33±4,95
Glicogênio (mg/100mg)	0,31±0,03	0,36±0,05	0,54 ± 0,04*#

Tabela 1. Média±dpm da massa do músculo sóleo (mg) e densidade de área do tecido conjuntivo intramuscular (%) e conteúdo de glicogênio (mg/100mg) nos grupos C, EE-3, EE-7 e EE-15.

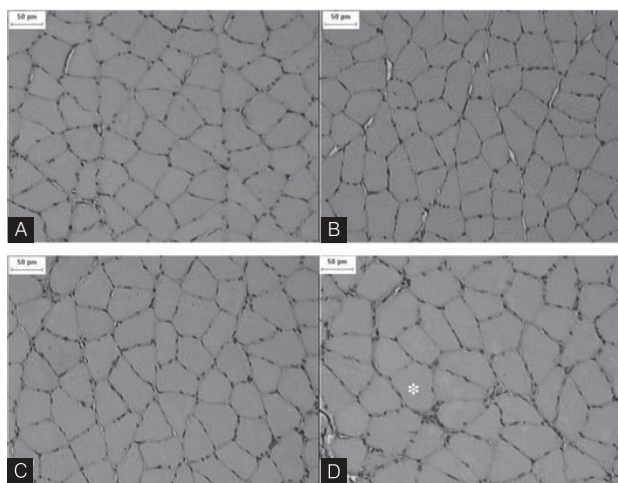


Figura 1. Fibras do músculo sóleo dos grupos controle (A), EE durante 3 dias (B), EE durante 7 dias (C) e EE durante 15 dias (D). Observar o aumento da área das fibras musculares (asterisco, em relação ao grupo controle).

DISCUSSÃO

Vários trabalhos foram realizados demonstrando a eficácia da EE em promover alterações no sistema músculo esquelético, tais como transição das fibras musculares, aumento da resistência à fadiga, da densidade e perfusão dos capilares, conteúdo de mioglobinas, células satélites, da captação da glicose, bem como redução da sua tensão tetânica^(5,6). Entretanto, a forma de estimulação nesses estudos não mimetiza a prática clínica, já que foram utilizados protocolos com eletrodos implantados por um período de semanas e até meses, inviabilizando sua aplicação em humanos.

No presente trabalho, o protocolo com curtos períodos de aplicação e eletrodos de superfície contempla a prática clínica. Nessa condição experimental, foi observado que a EE promoveu aumento do conteúdo de glicogênio no músculo sóleo no sétimo dia, além do aumento da sua massa, área das fibras e glicogênio no décimo quinto dia. Tal fato demonstra a inter-relação da atividade contrátil com a homeostasia energética e a morfologia da fibra muscular, apontando para o quadro de hipertrofia muscular.

Alguns trabalhos demonstraram resultantes semelhantes, porém com utilização de estimulação crônica e ou uso de eletrodos implantados. Egginton e Hudlick⁽¹³⁾ utilizaram a EE (10 Hz, 8 horas/dia) durante 3 dias em ratos, aplicada com eletrodo implantado no nervo fibular, observaram aumento de 12% na massa do músculo tibial anterior, além de aumento do fluxo sanguíneo.

Na mesma linha, Atherton et al.⁽⁹⁾ demonstraram que o recurso, utilizado com frequência de 100 Hz, T_{ON} 3s, T_{OFF} 10s, durante 20 minutos, com eletrodos implantados, promoveu aumento significativo da síntese de proteínas miofibrilares e sarcoplasmáticas avaliadas após 3 horas de estimulação nos músculos sóleo e extensor longo dos dedos de ratos.

Apesar da escassez de trabalhos sobre a EE com curtos períodos, bem como eletrodos de superfície, Noronha et al.⁽¹²⁾ analisaram os efeitos da EE no músculo tibial anterior de ratos (frequência 52 Hz, T_{ON} 10s, T_{OFF} 10s e subida de 2s), após 8 semanas, 3 vezes por semana, com 20 contrações em cada sessão, em dias alternados, respeitando os finais de semana. Os autores não observaram hipertrofia muscular ou transformações no tipo de fibra.

Os resultados apresentados no presente estudo diferem dos encontrados por Noronha et al.⁽¹²⁾, apesar dos dois trabalhos utilizarem a EE por curtos períodos e eletrodos de superfície. Esse

o grande número de contrações não tetânicas (1200) foi suficiente para promover alterações morfológicas no músculo sóleo, fato não observado no trabalho de Noronha et al.⁽¹²⁾. Outra diferença está na frequência utilizada, já que a de 10 Hz despolariza seletivamente os motoneurônios musculares do tipo I.

A hipertrofia muscular observada nesse estudo, caracterizada pelo aumento da massa muscular e área das fibras do músculo sóleo após 15 dias de EE, pode ser explicada pelo fato de que a EE ativa uma cascata de eventos que se caracteriza pela presença de um sinal ainda desconhecido, que regulam a expressão de fatores específicos do crescimento do músculo tais como o fator de crescimento mecânico (MGF), bem como o IGF-1. Dessa forma, alguns trabalhos demonstraram que a EE promoveu aumento da síntese de proteínas intramusculares, resultando em hipertrofia muscular^(9,14,15).

A importância dos estudos que avaliam o conteúdo de glicogênio se fundamenta nas relações diretas entre o conteúdo de glicogênio e a capacidade aeróbia ou de desempenho do organismo. É importante que as alterações no perfil enzimático e nas reservas de glicogênio são responsáveis pela redução da eficiência muscular e o desenvolvimento do estado de exaustão⁽¹⁶⁾.

Nesse contexto, a EE também promoveu elevação do conteúdo de glicogênio nos períodos de 7 e 15 dias. Tal fato pode estar relacionado à maior captação de glicose pela população de fibras insensível à insulina, que são externalizadas, e decréscimo na ativação dos sistemas enzimáticos citosólicos na glicólise. Certamente, a EE promove elevação na atividade da glicólise nas fibras musculares, desse modo a dinâmica de captação de glicose e a atividade das vias metabólicas são aumentadas⁽¹⁸⁾.

Etgen et al.⁽⁷⁾ avaliaram o conteúdo de GLUT4 no músculo sóleo de ratos após EE crônica, e verificaram aumento de 82% no conteúdo. Períodos maiores de EE, 30 a 40 e 60 a 90 dias, mostram tendência ao aumento no conteúdo do GLUT4, atingindo um platô em torno de 30 a 40 dias. Um resultado semelhante ao estudo de Hamada et al.⁽¹⁹⁾ foi que a captação de glicose em ratos é agudamente aumentada em resposta a EE e este aumento perdura por pelo menos 90 dias após a finalização da utilização do recurso.

Apesar das análises desse estudo demonstrar alterações morfológicas, como metabólicas, não foram realizadas análises funcionais no músculo sóleo, como por exemplo, da força, para observar se houve alguma alteração no padrão de recrutamento das unidades motoras que por sua vez também pode ter influência na força contrátil.

Além disso, considerações devem ser feitas com base em diversas pesquisas que demonstram falhas na descrição dos métodos metodológicos utilizados na EE. Para Robison et al.⁽²⁰⁾ existem falhas nas descrições dos métodos, já que não registram completamente detalhes experimentais tais como parâmetros de treinamento e caracterização da EE corrente. Porém, nos últimos anos tem ocorrido um aumento de variáveis e uma maior uniformidade dos métodos utilizados. Dessa forma, torna-se extremamente importante a padronização dos estudos que envolvem a EE para possibilitar a realização de comparações entre os diversos trabalhos.

CONCLUSÃO

A EE promoveu aumento das reservas de glicogênio no músculo sóleo de ratos durante 7 dias, bem como aumento da massa muscular, área das fibras, e nas reservas de glicogênio após 15 dias. Desse modo, destaca-se a importância da utilização da EE com o objetivo de promover hipertrofia muscular.

REFERÊNCIAS

1. Kramer J, Mendryk SW. Electrical stimulation as a strength improvement technique. *J Orthop Sports Phys Ther.* 1982; 4:91-8.
2. Guirro R, Nunes CV, Davini R. Comparação dos efeitos de dois protocolos de estimulação elétrica neuromuscular sobre a força muscular isométrica do quadriceps. *Rev Fisioter Univ São Paulo.* 2000; 7:10-5.
3. Bax L, Staes F, Verhagen A. Does neuromuscular electrical stimulation strengthen the quadriceps femoris? A systematic review of randomised controlled trials. *Sports Med.* 2005; 35:191-212.
4. Eberstein A, Eberstein S. Electrical stimulation of denervated muscle: is it worthwhile? *Med Sci Sports Exerc.* 1996; 28:1463-9.
5. Putman CT, Dusterhoft S, Pette D. Changes in satellite cell content and myosin isoforms in low-frequency stimulated fast muscle of hypothyroid rat. *J Appl Physiol.* 1999; 86:40-51.
6. Pette D, Vrbova G. What does chronic electrical stimulation teach us about muscle plasticity? *Muscle Nerve.* 1999; 22:666-77.
7. Etgen GJ, Farrar RP, Ivy JL. Effect of chronic electrical stimulation on GLUT 4 protein content in fast-twitch muscle. *Am J Physiol.* 1993; 264:816-19.
8. Noronha MA, Camargo LC, Minamoto VB, Castro C, Salvini TF. Papel da estimulação elétrica funcional (FES) no tibial anterior de rato. *Rev Bras Fisioter.* 1997; 2:71-6.
9. Atherton PJ, Babraj JA, Smith K, Singh J, Rennie MJ, Wackerhage H. Selective activation of AMPK-PGC-1 or PKB-TSC2- mTOR signaling can explain specific adaptive responses to endurance or resistance training-like electrical muscle stimulation. *FASEB J.* 2005; 19:786-8.
10. National Research Council. Guide for the care and use of laboratory animals. Washington: National Academy Press; 1996.
11. Lo S, Russell JC, Taylor AW. Determination of glycogen in small tissue samples. *J Appl Physiol.* 1970; 28:234-6.
12. Mathieu O, Cruz-Orive LM, Hoppeler H, Weibel ER. Measuring variation in stereology: comparison of the efficiency of planar image analysis. *J Microsc.* 1981; 121(Pt 1):75-88.
13. Egginton S, Hudlická O. Early changes in performance, blood flow, and fine structure in rat fast muscles induced by electrical stimulation. *J Appl Physiol.* 1999; 86:265-75.
14. Yang S, Alnaqeeb M, Simpson H, Goldspink G. Cloning and expression of an IGF-1 isoform expressed in skeletal muscle subjected to electrical stimulation. *Res Cell Motil.* 1996; 17:487-95.
15. Rennie MJ, Wackerhage H, Spangenburg EE, Booth FW. Changes in the human muscle mass. *Annu Rev Physiol.* 2004; 66:799-811.
16. Shulman RG, Rothman DL. The "glycogen shunt" in exercise: implications for glycogen in muscle energetics and fatigue. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998; 95:457-61.
17. Goodyear LJ, Hirshman MF, Vailly PM, Horton ES. Glucose transport, function, and subcellular distribution in rat skeletal muscle during exercise. *Diabetes.* 1992; 41:1091-9.
18. Silva CA, Guirro RRR, Polacow MLO, Silva HC, Tanno AP, Romão ME. Efeito da metformina e estimulação elétrica sobre as reservas de glicogênio no sóleo normal e denervado. *Rev Bras Fisiot.* 1999; 3:55-60.
19. Hamada T, Sasaki H, Hayashi T, Moritani T, Nakao K. Effect of body glucose uptake during and after human skeletal muscle electrical stimulation. *J Appl Physiol.* 2003; 94:2107-12.
20. Robinson JA, Snyder ML. Eletrofisiologia clínica; Eletroterapia. 2a.ed. Porto Alegre: Artmed; 2001.