



Acta Ortopédica Brasileira

ISSN: 1413-7852

actaortopedicasociedade@uol.com.br

Sociedade Brasileira de Ortopedia e

Traumatologia

Brasil

Quagliotti Durigan, João Luiz; Cancelliero, 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 POLACOM³

RESUMO

O objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito da estimulação elétrica neuromuscular (EE) física 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: <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

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 the 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 significant changes in ES-3 when compared to C. ES-7 and ES-15 showed the significant increase of 74.19% and 80.21% respectively, compared to C. In the morphometric analysis, the significant increase in ES-15 (16.23%) compared to C was for the area fraction of the intramuscular connective tissue. 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 3 days, as well as increased muscle mass, fibers area and area fraction of the intramuscular connective tissue in 15 days.

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

Citation: Durigan JLQ, Cancelliero KM, Guirro RRJ, Silva CA, Poli de Oliveira F. Neuromuscular electric stimulation on rats' soleus muscle: a metabolic analysis. *Acta Otop Bras.* [serial on the Internet]. 2002. Available from URL: <http://www.scielo.br/aoab>.

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. No âmbito da experimentação com animais, a maioria dos estudos envolvendo a EE utilizou protocolos crônicos, ou seja, de longos períodos, além de eletrodos implantados. Esses estudos demonstraram que o recurso predispõe mudanças das fibras musculares para lenta (IIA e I), aumento da resistência à fadiga, aumento da sua tensão tetânica, aumento da densidade de capilares de perfusão, além do aumento do conteúdo de miofibras e de células satélites^(5,6).

Além disso, o aumento da atividade contrátil que ocorre com a atividade física constante ou pela EE, promove a liberação de uma população de transportadores (GLUT4) de insulina 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 (física). 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 animais que indiquem transformação estrutural e metabólica por meio da EE, mímizando os parâmetros que são utilizados em humanos, o objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito da EE física 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). Um retículo quadriculado para a escolha de 15 fibras foi aleatoriamente, que coincidiam com as intersecções. Para a análise da densidade do tecido conjuntivo intramuscular, utilizou-se o sistema de planimetria por contagem de pixels. A quantificação foi realizada por meio de um retículo com 2500µm² contendo 56 intersecções de reta. Foram contados os pontos coincidentes no endomísmo e perímísmio, e a densidade de área (densidade de área) foi calculada dividindo-se a soma do número de pontos coincidentes nas intersecções de reta sobre o total de pixels (endomísmo e perímísmio) pelo número total de pontos.

A análise estatística foi realizada inicialmente para testar a normalidade Kolmogorov-Smirnov e pelo teste de Bartlett. Após a observação que os dados não contemplaram a metodologia paramétrica, foi utilizada a ANOVA e teste F sendo que, quando a diferença apresentou-se significante, aplicou-se o teste de Tukey HSD para as comparações múltiplas. Para todos os cálculos, foi estabelecida a significância de 5%.

RESULTADOS

Com relação a massa, não foi observado alteração significativa nos grupos EE-3 e EE-7 quando comparados ao C, com 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, quando comparados ao C. A densidade de área mostrou que o EE-3 não se diferiu significativamente do EE-7 e EE-15. O conteúdo de glicogênio muscular não apresentou alterações significativas no EE-3 quando comparado ao C. Já os grupos EE-7 e EE-15 demonstraram aumento ($p<0,05$) de 74,19% e 80,21%, respectivamente, comparados ao C, destacando que os grupos EE-7 e EE-15 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 ($p<0,05$) de 16,23% em relação ao C. Além disso, o EE-15 apresentou aumento ($p<0,05$) de 20,78% quando comparado ao EE-7, e 14,94% ao EE-3, 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 ao tratamento quando comparados com o C, bem como aos grupos EE-3 e EE-7. 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 (µm ²)	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), área das fibras (µm²), densidade de área do tecido conjuntivo intramuscular (%) e conteúdo de glicogênio (mg/100mg) de ratos submetidos a estimulação elétrica durante 3, 7 e 15 dias.

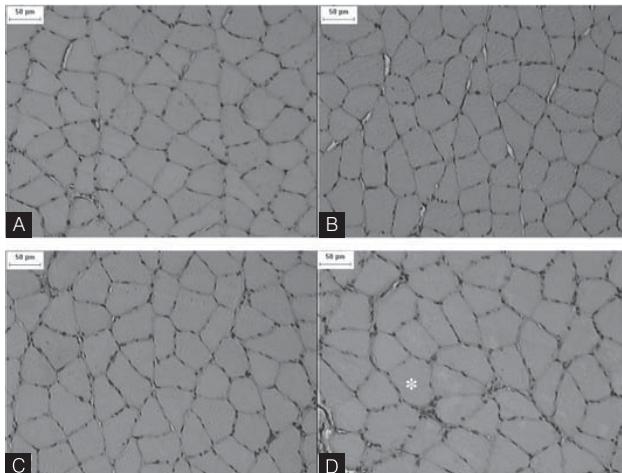


Figura 1. Fibras do músculo sóleo dos grupos controle (A), EE durante 3 dias (B), EE durante 7 dias (C) e EE durante 15 dias (D). Observar o aumento da área das fibras musculares (asterisco, em relação ao grupo controle).

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 freqüência 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 (freqüência 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 que realizou um total de 480 contrações tetânicas de 10 s.

Outra diferença está na freqüência utilizada, já que a de 10 Hz despolariza seletivamente os motoneurônios musculares do tipo I.

A hipertrofia muscular observada nesse estudo, car

aumento da massa muscular e área das fibras do

15 dias de EE, pode ser explicada pelo fato de que

ativa uma cascata de eventos que se caracteriza

de um sinal ainda desconhecido, que regulam a

fatores específicos do crescimento do músculo tais

fator de crescimento mecânico (MGF), bem como

Dessa forma, alguns trabalhos demonstraram que o

aumento da síntese de proteínas intramusculares,

hipertrofia muscular^(9,14,15).

A importância dos estudos que avaliam o conteúdo de glicogênio se fundamenta nas relações diretas entre

e a capacidade aeróbia ou de desempenho do organ

que as alterações no perfil enzimático e nas reservas

são responsáveis pela redução da eficiência muscular

o desenvolvimento do estado de exaustão⁽¹⁶⁾.

Nesse contexto, a EE também promoveu elevações

de glicogênio nos períodos de 7 e 15 dias. Tal fato

ficado pela maior captação de glicose pela população

insensível à insulina, que são externalizados, e dec

ativação dos sistemas enzimáticos citosólicos na

Certamente, a EE promove elevação na atividade

fibras musculares, desse modo a dinâmica de cap

bolismo da glicose e a atividade das vias metabó

são aumentadas⁽¹⁸⁾.

Etgen et al.⁽⁷⁾ avaliaram o conteúdo de GLUT4 no mú

ratos após EE crônica, e verificaram aumento de 82%

teúdo. Períodos maiores de EE, 30 a 40 e 60 a 90 d

somente tendência ao aumento no conteúdo do GL

um platô em torno de 30 a 40 dias. Um resultado

estudo de Hamada et al.⁽¹⁹⁾ foi que a captação de g

em ratos é agudamente aumentada em resposta a

EE e este aumento perdura por pelo menos 90 m

finalização da utilização do recurso.

Apesar das análises desse estudo demonstrar al

morfológicas, como metabólicas, não foram realiza

funcionais no músculo sóleo, como por exemplo, da

para observar se houve alguma alteração no padr

amento das unidades motoras que por sua vez tam

influência na força contrátil.

Além disso, considerações devem ser feitas com

versas pesquisas que demonstram falhas na des

metros metodológicos utilizados na EE. Para Robis

existem falhas nas descrições dos métodos, já que n

não registram completamente detalhes experimenta

tais como parâmetros de treinamento e caracterís

corrente. Porém, nos últimos anos tem ocorrido um

de variáveis e uma maior uniformidade dos método

Dessa forma, torna-se extremamente importante a

dos estudos que envolvem a EE para possibilitar a re

bem como comparações entre os diversos trabalh

CONCLUSÃO

A EE promoveu aumento das reservas de glicogênio sóleo de ratos durante 7 dias, bem como aumento muscular, área das fibras, e nas reservas de glicogênio de 15 dias. Desse modo, destaca-se a importância de utilizar a EE, com objetivo de promover hipertrofia

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 quadríceps. *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, Dusterhoff 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 α 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, Höppeler 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 fine structure in rat fast muscles induced by electrical stimulation. *Exerc Sport Sci Rev*. 1999; 515(Pt 1):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 exercise. *Res Cell Motil*. 1996; 17:487-95.
15. Rennie MJ, Wackerhage H, Spangenberg EE, Booth FW. Changes in muscle mass in the human muscle mass. *Annu Rev Physiol*. 2004; 66:799-822.
16. Shulman RG, Rothman DL. The "glycogen shunt" in exercise: role for glycogen in muscle energetics and fatigue. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998; 95:457-61.
17. Goodyear LJ, Hirshman MF, Valyoo PM, Horton ES. Glucose function, and subcellular distribution in rat skeletal muscle during exercise. *Diabetes*. 1992; 41:1091-9.
18. Silva CA, Guirro RRJ, Polacow MLO, Silva HC, Tanno AP, Ribeiro JAS. Efeitos da metformina e estimulação elétrica sobre as reservas de glicogênio no sóleo normal e denervado. *Rev Bras Fisioter*. 1999; 3:55-60.
19. Hamada T, Sasaki H, Hayashi T, Moritani T, Nakao K. Enhanced glucose uptake during and after human skeletal muscle contraction by electrical stimulation. *J Appl Physiol*. 2003; 94:2107-12.
20. Robinson JA, Snyder ML. *Eletrofisiologia clínica; Eletroterapia*. 2a.ed. Porto Alegre: Artmed; 2001.