

ALTERAÇÕES MORFOMÉTRICAS E METABÓLICAS INERENTES À ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA NEUROMUSCULAR NO MÚSCULO ANTAGONISTA SUBMETIDO À IMOBILIZAÇÃO DURANTE 7 DIAS

Autores

Joao Luiz Quagliotti Durigan
Karina Maria Cancelliero
Paula Lima Bosi
Gabriel Borges Delfino
Rinaldo Roberto de Jesus Guirro
Carlos Alberto da Silva
Maria Luiza Ozores Polacow

Orientador

Maria Luiza Ozores Polacow

1. Introdução

No intuito de minimizar os eventos desencadeados pelo desuso muscular, diversas técnicas têm sido utilizadas, buscando melhorar as condições homeostáticas das fibras musculares, com destaque para estimulação elétrica neuromuscular (SILVA et al., 1999). Vale destacar que a estimulação elétrica tem sido utilizada diretamente no músculo submetido ao desuso, porém alguns estudos não se restringiram em analisar somente o músculo estimulado, mas também o seu efeito nos antagonistas e contralaterais. Nesse contexto, Lieber et al. (1988), descreveram a eficácia do recurso em minimizar a hipotrofia no músculo diretamente estimulado (tibial anterior), e também a do seu antagonista (sóleo), já que para os autores, este último sofreu um alongamento passivo durante a EE.

Trabalhos anteriores do nosso grupo de pesquisa demonstraram que a estimulação elétrica neuromuscular minimizou alguns efeitos deletérios inerentes à imobilização articular no músculo sóleo, tais como a redução da massa muscular, área das fibras, reserva de glicogênio, bem como o aumento da densidade de área de tecido conjuntivo (DURIGAN et al., 2006). Porém, ainda não foram caracterizados esses aspectos em músculos antagonistas aos diretamente estimulados eletricamente, durante o período de imobilização articular.

2. Objetivos

O objetivo desse trabalho foi investigar o efeito da estimulação elétrica neuromuscular sobre o perfil metabólico e morfométrico do músculo tibial anterior, antagonista ao músculo sóleo, o qual foi estimulado, sob a condição de imobilização articular de tornozelo em posição neutra durante 7 dias.

3. Desenvolvimento

Ratos *Wistar* (3 a 4 meses, 250-300g) foram mantidos em condições controladas de biotério, recebendo água e ração *ad libitum* e tratados segundo recomendações do Guide for Care Use of Laboratory Animals (National Research Council, 1996).

Os animais foram divididos em 3 grupos (n=5): controle (C), imobilizado durante 7 dias (I7) e imobilizado associado à estimulação elétrica neuromuscular (EE) durante 7 dias (IEE7). O modelo de imobilização seguiu a proposta de Silva et al. (2006) que desenvolveram um modelo de resina acrílica que permite a imobilização da articulação de tornozelo de ratos em posição neutra.

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 7 dias, iniciando imediatamente após a imobilização. Um eletrodo (1cm²) foi colocado na região inguinal e o outro (1cm²) no músculo tríceps sural, sendo que no membro imobilizado este segundo eletrodo foi acoplado dentro da órtese.

Os parâmetros da estimulação elétrica foram: frequência de 10Hz, largura de fase de 0,4ms, pulso quadrático bifásico, intensidade da corrente de 5.0mA, a partir da visualização da contração muscular, sendo acrescida de 1.0 mA a cada 5 minutos, com objetivo de manter o nível de contração durante todo o período de estimulação. Foram utilizados 2 eletrodos de silicone carbono(1 cm² cada).

Após o período experimental, as análises realizadas foram: conteúdo de glicogênio (Siu et al., 1970) do músculo tibial anterior, além da sua massa, área das fibras e densidade de área do tecido conjuntivo intramuscular.

Para a análise morfométrica do tibial anterior, o seu segmento ventral foi fixado em solução tamponada de formol a 10% 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 Cybernects), câmera digital (JVC) acoplada a um microscópio (Zeiss) com integração a um microcomputador. Todas as imagens foram captadas com objetiva de 10x.

Foram analisadas as áreas de 375 fibras por animal, assim escolhidas: 15 fibras por área, sendo 5 áreas por corte, num total de 5 cortes por animal. Utilizou-se de um retículo quadriculado para a escolha de 15 fibras por corte, aleatoriamente, que coincidiam com as intersecções de retas.

Para a análise da densidade do tecido conjuntivo intramuscular foi utilizado o sistema de planimetria por contagem de pontos (MATHIEU et al., 1981) e a quantificação foi realizada por um retículo com quadrados de 2500µm² contendo 56 intersecções de reta. Foram contados os pontos coincidentes no endomísio e perímísio, em 5 áreas por corte, sendo 5 cortes por animal, perfazendo um total de 1400 pontos por animal.

A área relativa do tecido conjuntivo (densidade 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.

A análise estatística foi realizada inicialmente pelo teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov e pelo teste de homocedasticidade (critério de Bartlett). Após a observação que as variáveis contemplaram a metodologia paramétrica, foi utilizado a ANOVA sendo que, quando a diferença apresentada era significativa, aplicou-se o teste de Tukey para as comparações múltiplas ($p < 0,05$).

4. Resultados

Com relação à massa muscular (mg) foi observada redução significativa de 17,36% (C: $432,6 \pm 51$, I7: $357,2 \pm 37,5$ $p < 0,05$) no grupo I7 quando comparado ao C. Além disso, ocorreu redução de 48% no conteúdo de glicogênio no I7 (C: $0,31 \pm 0,03$, I7: $0,16 \pm 0,04$, $p < 0,05$).

Pela análise morfométrica, o grupo I7 apresentou redução significativa de 27% na área das fibras musculares (C: 2046 ± 436 , I7: 1488 ± 391 , $p < 0,05$) e aumento de 122% na densidade do tecido conjuntivo em relação ao C (C: $7,78 \pm 3,3$, I7: $17,28 \pm 4,27$, $p < 0,05$).

A EE não promoveu alterações significativas ($p > 0,05$) na massa muscular no grupo IEE7 (I7: $357,2 \pm 37,5$, IEE7: 341 ± 55 , $p < 0,05$) em relação ao respectivo grupo imobilizado. Por outro lado, ocorreu aumento significativo de 31,25% nas reservas de glicogênio no grupo IEE7 (I7: $0,16 \pm 0,04$, IEE7: $0,21 \pm 0,02$, $p < 0,05$).

A área das fibras musculares apresentou redução de 14% no IEE7 (I7: 1488 ± 391 , IEE7: 1697 ± 330 , $p < 0,05$), quando comparado ao respectivo grupo imobilizado. O recurso também promoveu redução na densidade do tecido conjuntivo de forma significativa na ordem de 25,63% no IEE7 (I7: $17,28 \pm 4,27$, IEE7: $12,85 \pm 5,15$, $p < 0,05$, Figura 1).

A imobilização durante 7 dias em posição neutra promoveu redução significativa na massa muscular do tibial anterior, área das fibras, aumento da densidade de área do tecido conjuntivo, além de redução das reservas de glicogênio, mostrando a inter-relação da atividade contrátil com a homeostasia energética e a morfologia da fibra muscular, apontando para o quadro de hipotrofia muscular.

Segundo Qin et al. (1997) a imobilização por diferentes períodos resulta em hipotrofia variando de 15% a 70%, dependendo dos animais utilizados e das fibras avaliadas. Savolainen et al. (1988), relataram redução na massa muscular na ordem de 35,14% na posição de encurtamento e de 16,31% na posição de alongamento no músculo tibial anterior de ratos submetidos à imobilização articular de tornozelo por aparelho gessado durante 7 dias.

A imobilização durante 7 dias também promoveu aumento significativo na densidade de área do tecido conjuntivo, na ordem de 122% comparado ao grupo controle. Esses resultados estão de acordo com a literatura, já que para Józsa et al. (1990), independente do modelo de desuso muscular estudado (imobilização, tenotomia ou denervação) e do tipo de músculo, a quantidade de tecido conjuntivo no endomísio e perimísio aumenta significativamente, variando de 50% a 700%.

O desuso muscular provocado por condições de períodos longos no leito, colocação de órteses ou fixações em membros e microgravidades induzem resistência à insulina e a um estado catabólico nos músculos esqueléticos afetados de humanos (FERRANDO et al., 1996). Além disso, Hirose et al. (2000) observaram

em ratos submetidos a imobilização em posição neutra durante 7 dias, redução na transdução do sinal intracelular estimulado pela insulina, sugerindo déficit na ativação do receptor de insulina e nas moléculas ativadas a partir deste, indicando que o quadro de resistência à insulina também pode ser desencadeado na imobilização. Esse quadro de resistência à insulina pode explicar o comprometimento das reservas de glicogênio decorrente da imobilização no músculo tibial anterior analisado nesse estudo.

Com relação à utilização da EE, o recurso mostrou ser eficaz em minimizar o aumento da densidade de área do tecido conjuntivo, bem como a redução da área das fibras musculares do tibial anterior submetido à imobilização durante 7 dias. Na mesma linha, Qin et al. (1997) utilizaram estimulação elétrica com frequência de 50Hz aplicada diariamente por 30 minutos, 5 vezes na semana durante 3 semanas no músculo tibial anterior de coelhos e observaram que o recurso foi efetivo na prevenção da hipotrofia muscular, minimizando a redução da área de secção transversal, fibrose intersticial e deficiência de suprimento sanguíneo.

Segundo Goodyear et al. (1992), o aumento no conteúdo de glicogênio se deve à maior captação de glicose pela população de GLUT4, insensível à insulina, que são externalizados, e decorre, ainda, da ativação dos sistemas enzimáticos citosólicos na glicogênese. Outros autores também relatam a estimulação elétrica neuromuscular como um recurso que incrementou a captação e metabolismo da glicose e a atividade das vias metabólicas celulares (GUIRRO et al., 2004).

Outros resultados adicionam suporte ao conceito de que a tensão muscular passiva é um importante fator na tentativa de minimizar os efeitos deletérios no sistema músculoesquelético durante o desuso. Lieber et al. (1988) estudaram os efeitos da EE aplicada no músculo tibial anterior diretamente estimulado e no músculo sóleo (antagonista), associada com a imobilização da articulação de tornozelo em posição neutra de ratos durante 4 semanas. Os autores relataram que o recurso minimizou a redução da área de secção transversal e da massa muscular, tanto do tibial anterior, quanto o sóleo em relação ao grupo controle, possivelmente devido à tensão passiva imposta ao sóleo devido à ativação do tibial anterior, bem como pela sua ativação reflexa por meio da condução antidrômica.

Os nossos resultados corroboram esses achados, já que a estimulação diretamente do músculo sóleo, minimizou a redução da área das fibras, reservas de glicogênio e o aumento da densidade do tecido conjuntivo no músculo tibial anterior. Porém esses achados não podem ser atribuídos ao alongamento passivo, já que a imobilização promovida pela órtese de resina acrílica fixou a articulação do tornozelo em posição neutra, o que impossibilitou o alongamento do músculo tibial anterior.

Além disso, a densidade de corrente utilizada nesse estudo foi de 5 mA/cm², sendo extremamente alta, visto que para a contração muscular eliciada por meio da estimulação elétrica em flexores de punho de humanos foi utilizada uma densidade de corrente entre 0,5 e 2 mA/cm² (WANG et al., 2004). A alta densidade de corrente aplicada nos animais pode ter gerado um campo elétrico abrangente o suficiente (talvez colocar uma referencia sobre intensidade e campo elétrico) para estimular tanto o compartimento posterior (músculo sóleo diretamente estimulado), quanto o anterior (tibial anterior). Outro fato que deve ser considerado é a proximidade dos músculos sóleo e tibial anterior, bem como a boa condução da corrente elétrica pelo tecido muscular. Desse modo, o tibial anterior poderia estar sendo ativado pela ação do campo elétrico, minimizando os efeitos deletérios promovidos pela imobilização.

5. Considerações Finais

A EE aplicada diretamente no músculo sóleo minimizou a redução das reservas de glicogênio, da área das fibras e o aumento da densidade de área do tecido conjuntivo no músculo tibial anterior durante a condição de imobilização articular no período de 7 dias.

Referências Bibliográficas

- Durigan, J. L. Q; Cancelliero, K. M; Dias, C. K. N; Silva, C. A; Guirro, R. R. J; Polacow, M. L. Efeitos da estimulação elétrica neuromuscular sobre o membro posterior imobilizado de ratos durante 15 dias: análises metabólicas e morfométricas. Rev Bras Fisioter. In press 2006.
- [Ferrando, A. A](#); [Lane, H. W](#); [Stuart, C. A](#); [Davis-Street, J](#); [Wolfe, R. R](#). Prolonged bed rest decreases skeletal muscle and whole body protein synthesis. Am J Physiol, v.270, p.627-33, 1996.
- Goodyear, L. J; Hirshman, M. F; Valyou, P. M; Horton, E. S. Glucose transporter number, function, and subcellular distribution in rat skeletal muscle after exercise training. Diabetes , v. 41, p.1091-1099, 1992.
- Guirro, R. R. J; Silva, C. A; Forti, F; Cancelliero, K. M. Análise do músculo esquelético desnervado tratado com metformina e/ou estimulação elétrica de baixa frequência. Rev Bras Fisioter, v.8, p.21-27, 2004
- [Hirose, M](#); [Kaneki, M](#); [Sugita, H](#); [Yasuhara, S](#); [Martyn, J. A](#). Immobilization depresses insulin signaling in skeletal muscle. Am J Physiol Endocrinol Metab; v.279, p.1235-41, 2000.
- Józsa, L; Kannus, P; Thoring, J; Reffy, A; Jarvinen, M; Kvist, M. The effect of tenotomy and immobilization on intramuscular connective tissue. J Bone Joint Surg, v.72, p.293-7, 1990.
- [Lieber, R. L](#); [Ferro, T. D](#); [Hargens, A. R](#). Differential effects of 10-Hz and 50 Hz-stimulation of the tibialis anterior on the ipsilateral, unstimulated soleus muscle. [Exp Neurol](#); v.100, p.426-35, 1988.
- Mathieu, O; Cruz-orive, L. M; Hoppeler, H; Weibel, E. R. Measuring error and sampling variation in stereology: comparison of the efficiency of various methods for planar image analysis. J Microsc, v.121, p.75-88, 1981.
- National Research Council. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Washington: National Academy Press, 1996.
- Qin, L; Appell, H. J; Chan, K. M; Maffulli, N. Electrical stimulation prevents immobilization atrophy in skeletal muscle of rabbits. Arch Phys Med Rehabil, v.78, p.512-7, 1997
- Silva, C. A; Guirro, R. R. J; Polacow, M. L. O; Cancelliero, K. M; Durigan, J. L. Q. Rat hindlimb joint immobilization with acrylic resin orthoses. Braz J Med Biol Res, v.39,p.979-985, 2006.
- Wang, J. S; Chen, S. Y; Lan, C; Wong, M. K; Lai, J. S. Neuromuscular electric stimulation enhances endothelial vascular control and hemodynamic function in paretic upper extremities of patients with stroke. Arch Phys Med Rehabil, v.85, p.1112-6, 2004.

Anexos

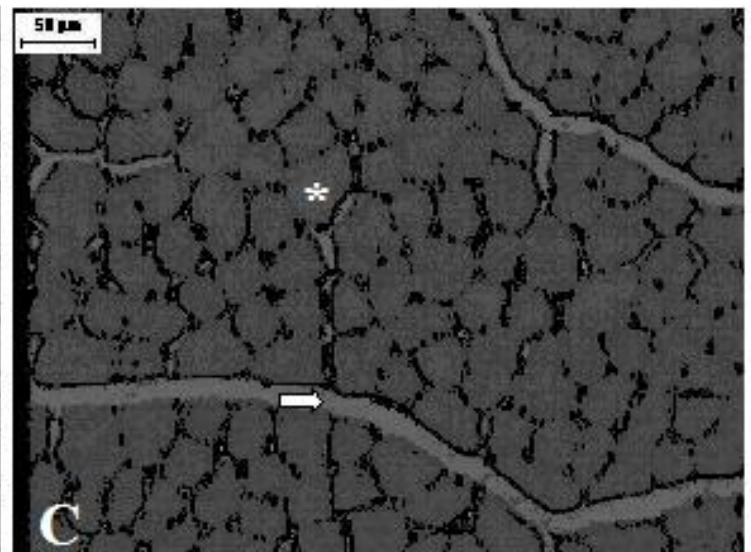
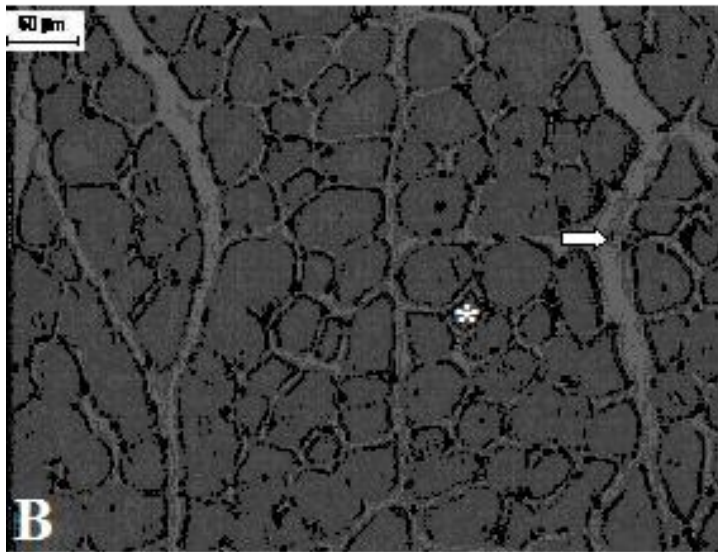
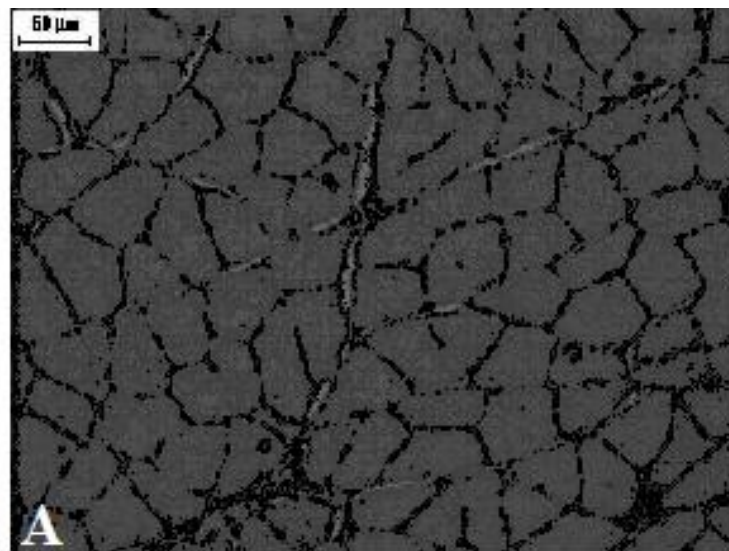


Figura 1. A. Fibras do músculo tibial anterior do grupo C. B. Fibras do músculo tibial anterior grupo I7. C. Fibras do músculo tibial anterior do grupo IEE7. Observar a redução da área das fibras em relação ao grupo C na imagem B e o aumento da área das fibras nos grupos submetidos à EE comparado ao respectivo grupo imobilizado (asterisco). Aumento da densidade de área do tecido conjuntivo em relação ao grupo C na imagem B e a redução da densidade de conjuntivo nos grupos submetidos à EE comparado ao grupo imobilizado (seta).