

DEDICATÓRIA

**À DEUS pela vida e pelas oportunidades de crescimento pessoal
quais me proporcionou;**

**Aos meus pais (Ruy e Cida), minha esposa (Alessandra) e meus
filhos (Raíssa e Davi), por darem sentido a tudo;**

**Ao dia em que entendi que a vida só tem sentido se pautada na
execução de tarefas que dignificam seu ser, os seres próximos, a
natureza..., qualquer que seja a atividade. Só assim encontraremos a
harmonia de pertencer a um todo maior.**

Dedico...

AGRADECIMENTOS

À Profa. Eliete Luciano pela credibilidade a mim depositada, por sua competência e seu exemplo como pessoa;

Ao Prof. Carlos Alberto Silva pelo apoio constante e incansável em todas as etapas da realização deste trabalho;

“Se consegui enxergar mais longe foi porque subi nos ombros de gigantes” (Isaac Newton)

À Profa. Maria Alice R. Mello pelo apoio desde o início deste trabalho, fazendo sugestões e incentivando sempre;

Ao Prof. Cláudio Gobatto por sua grande competência e irrestrita disponibilidade em ajudar;

A todos os professores do programa de pós da UNESP com os quais pude aprender muito além do que esperava;

Ao Laboratório de Fisiologia da UNICAMP onde foram realizadas as dosagens das Interleucinas;

Ao Laboratório de Fisiologia da UNIMEP onde foram executados vários procedimentos experimentais e ao colega Luciano Chingui;

Ao Laboratório do IB da UNESP- Câmpus de Rio Claro e aos técnicos, o biólogo José Roberto da Silva (Beto) e ao químico Eduardo Custódio (China) pelo imprescindível apoio técnico.

OBRIGADO

RESUMO

O objetivo deste estudo foi analisar e quantificar a participação das interleucinas (IL-4, IL-6, IL-10 e TNF-alfa) em animais que tiveram uma pata imobilizada e eletroestimulada por 1, 2 e 3 dias consecutivos, analisando-se a repercussão da hipocinesia focal sobre o conteúdo das proteínas musculares, bem como sobre parâmetros metabólicos como glicemia, insulinemia, glicogênio muscular, ácidos graxos livres, ácido ascórbico da glândula adrenal e da enzima creatina quinase (CK). A estimulação elétrica neuromuscular (EE, F=10Hz, T=0,4ms, i=5mA, 20 minutos diariamente), foi aplicada ao membro posterior de ratos, nos músculos Gastrocnêmio e Sóleo. Assim, ratos machos Wistar foram divididos em 7 grupos: controles (C), imobilizados por 1 dia (I1), imobilizados e eletroestimulados por 1 dia (IE1), imobilizados por 2 dias (I2), imobilizados e eletroestimulados por 2 dias (IE2), imobilizados por 3 dias (I3) e imobilizados e eletroestimulados por 3 dias (IE3).

A Imobilização foi realizada através de uma órtese confeccionada sob medida em resina acrílica, mantendo o membro em posição a 90° pelos respectivos períodos experimentais. Os resultados demonstraram que a imobilização monosegmentar utilizada neste estudo desencadeou precocemente a proteólise muscular, além de provocar respostas agudas nos sistemas diretamente relacionados com o fornecimento energético. Tais reações podem ser mediadas por algumas interleucinas, sobretudo a IL-6, que apresentou expressiva variação durante os períodos experimentais. Por outro lado, a eletroestimulação neuromuscular utilizada precocemente pode atenuar algumas destas respostas, minimizando o aspecto catabólico induzido pela

imobilização. Assim, os resultados deste estudo leva a sugestiva de que as ações terapêuticas ou preventivas sobre as conseqüências deletérias da imobilização sobre os sistemas orgânicos devem ser adotadas precocemente.

Palavras chave: Interleucinas, imobilização, músculo-esquelético, eletroestimulação.

ABSTRACT

The objective of the study was to evaluate and quantify the participation of interleukins (IL-4, IL-6, IL-10, and $\text{TNF}\alpha$) in rats that underwent paw immobilization and electrical stimulation for 1, 2, and 3 consecutive days, while analyzing the local hypokinesia repercussion on muscular protein content, as well as metabolic parameters of glycemia, insulineamia, muscular glycogen, free fatty acids, ascorbic acid, and creatine kinase enzyme (CK). The neuromuscular electrical stimulation (EE, $F=10\text{Hz}$, $T=0,4\text{ms}$, $i=5\text{mA}$, 20 minutes daily) was applied to the hindlimb of the animals over the soleus and gastrocnemius muscles. In this manner, albino male Wistar rats were distributed into 7 experimental groups: control (C), immobilized 1 day (I1), immobilized 1 day and electrostimulated (IE1), immobilized 2 days (I2), immobilized 2 days and electrostimulated (IE2), immobilized 3 days (I3) and immobilized 3 days and electrostimulated (IE3).

The immobilization of the animals was achieved by an acrylic resin orthosis model which maintained the limb in the position of 90° during the respective experimental periods. The results demonstrated that the mono-segmental immobilization utilized during this study unchained muscular proteolysis prematurely, while also provoked acute responses in systems directly related to energy distribution. Such reactions can be measured by certain interleukins, especially the IL-6, which demonstrated an expressive variation during the experimental period. On the other hand, the neuromuscular electrical stimulation, when utilized prematurely, can diminish the occurrence of some of these responses, minimizing the catabolic aspect induced by immobilization. Therefore, the results of this study indicate that therapeutic or preventive actions over

deleterious consequences of immobilization on organic systems should be adopted prematurely.

Keywords: Interleukins, immobilization, skeletal muscle, electrical stimulation.

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA.....	ii
AGRADECIMENTOS.....	iii
RESUMO.....	iv
ABSTRACT.....	vi
INTRODUÇÃO.....	01
2. OBJETIVOS.....	04
3. REVISÃO DA LITERATURA	
3.1. Imobilização.....	06
3.2. Estimulação Elétrica Neuromuscular.....	11
4. MATERIAL E MÉTODOS	
4.1. Animais.....	14
4.2. Imobilização.....	15
4.3. Procedimento de estimulação Elétrica Neuromuscular.....	16
4.4. Avaliações.....	17
4.4.1. GTTo.....	17
4.4.2. TTIsC.....	18
4.4.3. Dosagem de ácidos graxos livres.....	18
4.4.4. Dosagem do ácido ascórbico da adrenal.....	18
4.4.5. Determinação da concentração de proteínas totais.....	19
4.4.6. Determinação da concentração de DNA.....	19
4.4.7. Determinação da concentração plasmática de creatina quinase.....	19
4.4.8. Determinação da concentração plasmática das interleucinas IL-4, IL-6, IL-10 e TNF- α	20
4.5. Análise Estatística.....	20
5. RESULTADOS.....	21

5.1. ESTUDO 1: Participação da interleucina 6 nos ajustes metabólicos desencadeados na fase aguda da imobilização articular: Estudo em ratos.

5.1.1. Resumo.....	23
5.1.2. Abstract.....	25
5.1.3. Introdução.....	27
5.1.4. Material e Métodos.....	29
5.1.5. Resultados.....	31
5.1.6. Discussão.....	35
5.1.7. Conclusão.....	40
5.1.8. Referências Bibliográficas.....	40

5.2. ESTUDO 2: A utilização da estimulação elétrica neuromuscular na fase aguda da imobilização do tornozelo em 90°. Estudo em ratos

5.2.1. Resumo.....	47
5.2.2. Abstract.....	49
5.2.3. Introdução.....	51
5.2.4. Material e Métodos.....	54
5.2.5. Resultados.....	57
5.2.6. Discussão.....	61
5.2.7. Conclusão.....	67
5.2.8. Referências Bibliográficas.....	68

5.3. ESTUDO 3: Ajustes metabólicos no músculo sóleo imobilizado e submetido à estimulação elétrica neuromuscular.

5.3.1. Resumo.....	81
5.3.2. Abstract.....	83
5.3.3. Introdução.....	85
5.3.4. Material e Métodos.....	87
5.3.5. Resultados.....	90
5.3.6. Discussão.....	94
5.3.7. Conclusão.....	101
5.3.8. Referências Bibliográficas.....	101

6. COMENTÁRIOS E CONSIDERAÇÕES GERAIS.....106

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS COMPLEMENTARES.....114

1. INTRODUÇÃO

A imobilização músculo-esquelética, como recurso terapêutico, tem vasta aplicabilidade prática no campo da traumatologia e medicina desportiva, merecendo destaque nos entorses, fraturas ósseas, rupturas ligamentares, tendíneas e de outros tecidos moles. O princípio de sua indicação baseia-se sobre a contenção dos efeitos potencialmente álgicos dos movimentos bem como ser um instrumento para possibilitar e facilitar a cicatrização dos tecidos danificados, ou seja, visa permitir que estes tecidos possam atravessar as fases do processo de reparo sem interferências externas.

Por outro lado, a imobilização pode desencadear uma série de alterações adaptativas nos sistemas orgânicos que se traduzem em perda funcional global e local, comprometendo o tempo de retorno do indivíduo às suas atividades normais. No sistema músculo-esquelético, a redução da massa muscular e óssea são os efeitos mais marcantes desse processo. A medida em que o conhecimento fornece informações importantes sobre estes efeitos, cada vez mais a noção de que a imobilização pode ser um “mal necessário” é aceita e compreendida.

Neste contexto, vários modelos experimentais aplicados ao estudo da imobilização foram descritos na literatura. A maioria destes experimentos é realizada em animais devida principalmente a questões éticas. Investigações em

humanos, voluntários ou pacientes, fornecem dados limitados como medidas de trofismo muscular, força de um grupo de músculos, características de contração e alguns parâmetros morfológicos e bioquímicos obtidos por biópsias musculares e amostras sanguíneas (APPEL, 1990).

Os efeitos da imobilização induzida por técnicas não invasivas como a imobilização por aparelho gessado ou suspensão do corpo, tem sido estudados com mais frequência em animais. Tais técnicas tem merecido especial atenção da NASA (*National Aeronautics and Space Administration – USA*), na busca de informações sobre o comportamento dos sistemas orgânicos submetidos a microgravidade, que apresentam alguns traços de semelhança com a imobilização. Um modelo invasivo utilizado para estudar os efeitos da hipoatividade motora em animais consiste na neurectomia ciática, que tem algumas limitações impostas pelas alterações neurotróficas que acompanham este modelo, quando se deseja estudar aspectos do metabolismo focados neste estudo.

Na tentativa de criar a situação mais próxima da realidade da imobilização dos membros, tão comum na prática ortopédica, o presente estudo, utilizou um modelo de imobilização do membro posterior dos animais induzida pela aplicação de uma órtese que manteve o membro na posição de 90° não impedindo o deslocamento do animal. A partir desse modelo, alguns efeitos sobre o metabolismo geral e local do animal foram estudados.

No contexto de minimizar os efeitos deletérios e/ou acelerar a recuperação funcional de um segmento pós-imobilização, a eletroestimulação neuromuscular apresenta-se como um recurso com potencialidades locais e sistêmicas que pode agir significativamente sobre o sistema músculo-esquelético na tentativa de

contrabalançar tais efeitos. Como recurso terapêutico, a eletroestimulação tem ampla aplicabilidade na prática clínica, sobretudo quando o movimento ativo normal não pode ocorrer. Esse fato, obriga a busca incessante de novos conhecimentos, tanto do processo de inatividade quanto da eletroestimulação neuromuscular, visando possibilitar a aplicação terapêutica deste recurso com a máxima eficiência e segurança com o mínimo de riscos à saúde do indivíduo.

Em virtude da frequência com que a eletroestimulação é utilizada na prática clínica, há uma grande importância no desenvolvimento de trabalhos que determinem a influência da estimulação elétrica na recuperação das condições energéticas comprometidas pelo desuso bem como sobre o trofismo muscular. Modelos experimentais têm sido desenvolvidos com o intuito de estudar a adaptação muscular durante a imobilização havendo sugestões que as alterações mais relevantes da atrofia ocorrem nos dias iniciais da imobilização (QUIN et al., 1997). Neste complexo de sistemas interligados ativados pela imobilização, surgem estudos apontando as interleucinas com potenciais efeitos metabólicos e tróficos sobre a musculatura esquelética que podem influenciar o equilíbrio metabólico como um todo (CHANN et al., 2004; HADDAD et al., 2005). Desta forma, há de se considerar que existem poucos trabalhos abrangendo os efeitos da estimulação elétrica associada à imobilização com ênfase na participação de citocinas e do padrão metabólico da musculatura nos dias iniciais do desuso, sendo este o objetivo deste estudo.

2. OBJETIVOS

A análise da literatura mostra alterações na homeostasia metabólica músculo-esquelética induzidas pela imobilização, apontando inúmeras alterações que deflagram seu processo distrófico. Também faz referências aos efeitos benéficos da eletroestimulação sobre o sistema músculo-esquelético desprovido de sua atividade motora normal. Isto faz sugestiva a hipótese de avaliar quanto ao comportamento fisiológico do músculo esquelético imobilizado e submetido à eletroestimulação bem como a participação de algumas interleucinas que podem ter influências fundamentais nesse processo. Dessa forma, podemos enumerar os objetivos principais:

1. Avaliar as influências da imobilização e da eletroestimulação sobre o conteúdo protéico da musculatura de ratos normais, imobilizados, imobilizados e eletroestimulados durante os períodos iniciais da imobilização (1, 2 e 3 dias).
2. Avaliar e quantificar a participação de algumas interleucinas durante os respectivos períodos experimentais
3. Avaliar outros aspectos do metabolismo como a curva glicêmica, a sensibilidade periférica à insulina, o conteúdo do glicogênio muscular e do ácido ascórbico da adrenal, a concentração plasmática dos ácidos graxos

livres e da creatina quinase muscular durante os respectivos períodos experimentais.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. IMOBILIZAÇÃO

O sistema músculo-esquelético, como todos os sistemas orgânicos, tem a capacidade de reagir às demandas funcionais impostas a ele, visando fornecer o maior rendimento possível para atender ao aumento nesta demanda ou sofrem as consequências da redução desta. Em linhas gerais, são respostas adaptativas que visam ajustar a capacidade funcional do sistema para gerar a máxima eficiência com o menor consumo energético possível.

O efeito mais marcante da imobilização no sistema músculo-esquelético é a atrofia muscular e a redução da massa óssea (KANNUS et al, 1998; TREBACZ & PIKUS, 2003). Neste contexto, os estudos dos efeitos metabólicos locais e sistêmicos da imobilização se revestem de grande importância por fornecer as informações necessárias para a compreensão e intervenção terapêutica e preventiva nas situações de privação da mobilidade de partes do corpo como na imobilização, em lesões do neurônio motor ou ainda do corpo todo, como nos repousos prolongados no leito.

Os modelos animais permitem uma compreensão mais global sobre o envolvimento metabólico nos processos de imobilização músculo-esquelética. Mussachia (1988), em seu trabalho de revisão sobre atrofia muscular, comparou

os diferentes modelos animais e sua influência nos aspectos morfológicos, fisiológicos, bioquímicos e de força muscular. A principal característica observada por este autor foi a atrofia muscular e a diminuição da atividade contrátil do músculo. Vale ressaltar que estes resultados sofrem profundas influências das técnicas utilizadas para induzir a imobilização. Interessantemente, nas décadas de 70 e 80 foram descritos diferentes comportamentos entre fibras musculares secundários à imobilização. Nos trabalhos de Jafee et al. (1978), Mcdougall et al. (1980), as fibras brancas (tipo II) foram as mais acometidas por atrofia pós-imobilização enquanto que, nos relatos de Booth e Celso (1973), e Edgerton et al. (1975) as fibras vermelhas (tipo I) responderam mais significativamente à atrofia. Existem ainda, trabalhos que não encontraram diferenças significativas na atrofia pós-imobilização nos diferentes tipos de fibras (WILLIAMS & GOLDSPINK, 1978; BOYES & JOHNSTON, 1979). A atrofia do músculo esquelético decorrente da imobilização ocorre pela diminuição dos níveis de síntese e conseqüentemente aumento nos níveis de degradação protéica. Nas primeiras 6 horas de imobilização já existe uma redução de 37% nos índices de síntese protéica (BOOTH & SEIDER, 1979). Esta redução parece afetar a unidade motora também. Ibebunjo et al. (1999), estudando as relações fisiológicas entre a imobilização e o número de receptores nicotínicos, verificaram que o desuso não muda a funcionalidade dos receptores colinérgicos, mas sim a população destes.

A posição em que o músculo é imobilizado também tem importante influência no comportamento morfológico do mesmo. Se o músculo for imobilizado em encurtamento, ocorrerá uma significativa redução do número de sarcômeros em série (APPELL, 1986), enquanto que numa posição de

estiramento, ocorrerá o contrário, com aumento das unidades sarcoméricas (WILLIAMS & GOLDSPINK, 1978). Neste sentido, alguns estudos foram realizados considerando a posição articular em que os tornozelos dos animais em experimentação foram mantidos, sendo que Ploug et al. (1995), utilizaram a posição neutra, Seki et al. (2001), utilizaram a dorsiflexão enquanto que Sakakima et al. (2004), utilizaram a flexão plantar. Järvinen et al. (2002), estudando os efeitos da imobilização no membro posterior em posição neutra de ratos, encontraram um marcante aumento do tecido conectivo tanto no endomísio quanto no perimísio, principalmente no sarcolema das células musculares. Essa alteração foi acompanhada por aumento significativo das fibras conectivas peri-capilares, podendo comprometer o suprimento sanguíneo para as fibras musculares e potencializar o processo de atrofia. Também descreveram aumento do número das fibras perpendiculares aderidas às fibras musculares adjacentes, notando que estas fibras tornaram-se muito aumentadas podendo contribuir para a restrição da mobilidade entre as fibras adjacentes.

O músculo-esquelético é o principal sítio do metabolismo de glicose e da ação insulínica, sendo auto-regulado pela demanda funcional e fornecimento do substrato. Assim, fatores como a imobilização pode gerar modificações intrínsecas comprometendo essa dinâmica. Didyk et al. (1994), já haviam descrito a redução do transporte de glicose nos músculos imobilizados em posição neutra de ratos, considerando que atividade muscular tem papel regulatório sobre o Glut4, reduzindo ou aumentando de acordo com as solicitações. Neste estudo após 3 dias de imobilização, foram verificados redução do peso muscular em 5% em relação ao membro contralateral e redução na expressão gênica para o Glut4. Hirose et al. (2000) mais recentemente,

encontraram resultados semelhantes quando descreveram a redução da resposta à sinalização da insulina em músculos imobilizados, comprometendo o transporte total de glicose.

Do ponto de vista enzimático, considerando as reações metabólicas dos substratos para o fornecimento energético em modelos que utilizaram a imobilização, foram descritas tendências em redução da atividade de enzimas oxidativas como a Citrato desidrogenase (SDH) e Piruvato fosfoquinase (PFK) como descrito por Simoneau et al. (1987). Se por um lado essa resposta poderia resultar em economia de substrato, por outro pode potencializar as alterações tróficas de deteriorização observadas nos tecidos envolvidos na imobilização.

Hilder et al. (2003), observaram também redução na expressão de proteínas nos músculos hipotrofiados e correlacionaram à redução na efetividade da proteína IRS-1, evidenciando o comprometimento na sinalização insulínica. Além disso, observaram também uma redução na atividade da enzima *Akt*, indicando alterações nas vias citosólicas responsáveis pela glicogênese bem como a glicólise. Tais alterações podem refletir diretamente no processo de hipotrofia por comprometer o fornecimento e as reservas de substratos metabolizáveis.

A perda de massa muscular, de forma geral, pode ser influenciada também pela participação das citocinas e outros hormônios que atuam na ativação dos sistemas proteolíticos (COSTELI et al., 1993) ou comprometendo a síntese protéica.

As citocinas, também conhecidas como interleucinas devido a suas conhecidas ações entre os leucócitos, são proteínas de baixo peso molecular que atuam de forma autócrina, parácrina e endócrina que possuem potentes

efeitos biológicos à baixas concentrações, modulando várias funções celulares. Devido à sua característica temporal e efeitos fisiológicos, tem sido classificadas como inflamatórias e anti-inflamatórias, como reconhecidas em muitos estudos. Alguns exemplos de citocinas inflamatórias são a interleucina-1 (IL-1), a interleucina-2 (IL-2), a interleucina-6 (IL-6), a interleucina-8 (IL-8, considerada como sendo uma quimocina), o TNF- α (Tumor Necrosis Factor- α), os interferons (principalmente o interferon- γ ou interleucina-18 (IL-18)), enquanto que, exemplos de citocinas anti-inflamatórias são a interleucina-4 (IL-4), a interleucina-10 (IL-10), a interleucina-13 (IL-13), que atuam, de forma geral, em processos de inibição da síntese das citocinas inflamatórias e/ou contrapondo-se a algumas de suas propriedades (OLHSSON et al., 1990; MALDOVEANU, SHEPHARD e SHEK, 2001). De fato, tal classificação atualmente parece ser um tanto reducionista, se consideradas as ações pleiotrópicas das citocinas, pois algumas delas tem demonstrado efeitos pró e anti-inflamatória como a IL-6 e a IL-4 (JAWA et al., 2006).

Algumas citocinas parecem aumentar a expressão molecular dos sistemas proteolíticos como a TNF α , a IL-6, o IL-18 e outras (TISDALE, 2001). A TNF- α é considerada uma das principais citocinas iniciantes da resposta inflamatória, tendo ações sobre as mais diversas células do organismo. De maneira geral, promove a liberação de outras citocinas como a IL-6 dos eicosanóides, dos glicocorticóides e das moléculas de adesão, participando também na ativação da cascata da coagulação e da indução do catabolismo muscular (LIN, CALVANO e LOWRY, 2000)

Nos músculos esqueléticos, a IL-6 tem sido relacionada com a proteólise muscular evidenciada clinicamente pela atrofia muscular. Tsujinaka et al. (1996),

relataram que ratos transgênicos para a IL-6 apresentaram atrofia muscular que foi inibida por anticorpos anti-receptor desta citocina, considerando que IL-6 pode mediar a atividade do sistema proteolítico lisossomal. Tais informações nos remetem a estudar a participação de algumas citocinas nos períodos iniciais da imobilização músculo-esquelética para uma maior compreensão de eventos que podem ser ativados no processo de deflagração da atrofia muscular.

3.2. ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA NEUROMUSCULAR

A estimulação elétrica neuromuscular (eletroestimulação) é um recurso bastante utilizado tanto em reabilitação quanto na preparação de atletas. Dentre os inúmeros sistemas celulares que são ativados pela eletroestimulação, temos a interação entre a dinâmica metabólica e as vias sinalizadoras celulares e a ativação ou inibição de vias específicas que visam manter o músculo mais ativo e saudável. É importante salientar que este recurso não substitui a ação fisiológica da contração muscular, mas pode ter uma ação aditiva no comando neuromuscular em situações de hipoatividade músculo-esquelética.

Sabe-se que a captação da glicose pelo músculo é favorecida tanto pelas contrações musculares induzidas pelos exercícios físicos quanto pela ação sinalizadora da insulina. No entanto, esses processos parecem acontecer por vias distintas na cadeia de fosforilação pós receptor (FRANCH et al., 1999), resultando, em via comum, a uma maior translocação de Glut4 para a membrana celular. Neste contexto, Ass et al. (2002) encontraram, em resposta à eletroestimulação, uma maior ativação de sistemas celulares que permitem a elevação na captação de substratos energéticos. Yoshida et al. (2003), em um estudo realizado com ratos suspensos pela cauda, encontraram melhora

significativa na capacidade oxidativa nos músculos que foram submetidos a eletroestimulação.

Sunderland (1978) e Jaffe e Stern (1979), demonstraram inúmeros benefícios da eletroestimulação para o músculo denervado e para a regeneração dos tecidos biológicos. Outros importantes efeitos são descritos em trabalhos mais antigos e também nos mais recentes tais como: a elevação na força muscular e resistência (WAKIN & KRUSEN, 1955), redução da fibrose mantendo as fibras em melhores condições metabólicas (SILVA et al., 1999; ZHONGGUO & CHONG, 2003) e elevação na densidade e fluxo dos capilares (HUDLICKA et al., 1982). Em 1997, Quin et al., descreveram que a eletroestimulação preveniu a atrofia muscular secundária à imobilização aplicada a músculos do membro posterior de coelhos, minimizando a redução na área de secção transversa, na fibrose intersticial e no aporte sanguíneo.

As concentrações teciduais e circulantes de algumas citocinas têm sido encontradas elevadas em resposta aos exercícios físicos, considerando que o evento desencadeador desses aumentos seriam as contrações musculares. Ullum et al. (1994) demonstraram a elevação na concentração sérica da IL-6 detectada em exercícios utilizando o ciclismo enquanto que, Bruunsgaard et al. (1997) demonstraram aumento significativo da IL-6 circulante em exercícios de alta intensidade, correlacionando a possíveis danos no citoesqueleto, sobretudo nos exercícios excêntricos, que sabidamente produzem maiores lesões musculares (ASP et al., 1995). Considerando que a eletroestimulação provoca contrações musculares, Jonsdottir et al. (2000), estudando os efeitos da eletroestimulação muscular sobre a síntese do RNAm da IL-6 nos músculos da panturrilha de ratos, demonstraram aumento significativo na produção desta

citocina, concluindo ainda que essa síntese fora local, pois a mesma análise nos músculos contralaterais não demonstrou qualquer aumento significativo na IL-6. Em um trabalho atual, Ono et al. (2007), estudando a produção da IL-6 pelas contrações musculares eletricamente estimuladas no masseter de ratos, também encontraram elevações na expressão gênica do RNAm da IL-6 já a partir dos 30 minutos iniciais de estimulação elétrica.

Dessa forma, parece-nos pertinente avançar nos estudos desse modelo, sobretudo nos efeitos sobre a participação das interleucinas, buscando um maior entendimento dos processos locais e metabólicos envolvidos e fornecer informações que poderão ser úteis em muitas situações cotidianas de terapia e reabilitação que necessitam revestir-se de evidências científicas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Animais

Foram utilizados ratos *albinus*, Wistar, com idade variando de 3 a 4 meses e obtidos do biotério Central da UNESP – Botucatu. Os animais foram alimentados com ração e água *ad libitum* e mantidos em ambiente com temperatura constante ao redor de $23\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ e ciclo claro escuro controlado de 12 hs, manejados de acordo com o guia de tratamento de animais de laboratório do National Research Council, 1996.

Tabela 1 – Distribuição dos ratos em grupos experimentais

Grupos experimentais	n
Controles (C)	6
Imobilizados por 1 dia (I1)	6
Imobilizados e eletroestimulados por 1 dia (IE1)	6
Imobilizados por 2 dia (I2)	6
Imobilizados e eletroestimulados por 2 dias (IE2)	6
Imobilizados por 3 dias	6
Imobilizados e eletroestimulados por 3 dias	6

4.2. Imobilização

A imobilização foi realizada utilizando uma órtese de resina acrílica, a qual manteve a articulação do tornozelo em posição de 90° , permitindo que as articulações do joelho e quadril permanecessem livres conforme modelo recentemente descrito por Silva et al. (2006). Este modelo apresenta vantagens

técnicas e funcionais, possibilitando o animal deambular realizando descarga de peso sobre o membro imobilizado. De forma simplificada, a confecção da órtese compreende 7 fases operacionais: *moldagem*, realizada com alginato de potássio para recobrir e retirar a impressão do membro previamente posicionado; *modelagem*, após a geleificação, foi realizada uma incisão lateral para a retirada da pata e apreciação do modelo; *desgaste do modelo*, após a separação do modelo de gesso do molde de alginato, as partes excedentes foram raspadas e lixadas; *expulsividade*, com auxílio de uma lamparina e espátula, cera nº 7 foi colocada nos pontos de retenção, criando zonas de expulsividade; *aplicação da resina acrílica*, o modelo de gesso foi mergulhado em isolante “SELLAC” para criar uma película. Em um recipiente de vidro em isolamento, o polímero (pó) de metacrilato de etila foi misturado ao monômero (líquido) passando pelas fases arenosa, pegajosa, plástica e borrachóide. Na fase pegajosa, a mistura foi transferida para o molde de gesso sendo acomodada, ajustada e moldada com a mão e com Lecron pequeno; *acrilização* foi realizada pela própria reação exotérmica, pois a resina acrílica utilizada é do tipo quimicamente ativada; *expulsão*, após a acrilização, a prótese foi polida com pedra e borracha e cortada lateralmente com disco de carboril. Ângulos internos de retenção foram atenuados com broca nº5 e pedra de polimento. O modelo de órtese foi então adaptado à pata posterior dos animais associado a uma cinta abdominal de PVC para evitar que o animal a retirasse e fixada por 2 rotadores laterais (figura 1), possibilitando o deslocamento do animal pela movimentação do quadril com o peso corporal apoiado sobre o membro imobilizado.

Consideramos os períodos experimentais como sendo períodos agudos, pois Deutsch et al. (2003), relataram que até 7 dias de imobilização ainda é considerado dessa forma.



Figura 1 – Rato imobilizado com a órtese de resina acrílica. Vista lateral (A) e Vista frontal (B).

4.3. Procedimento de Estimulação Elétrica Neuromuscular

Os animais pertencentes aos grupos de estimulação elétrica foram anestesiados com pentobarbital sódico (HYPNOL, CRISTÁLIA, SP) na concentração de 50 mg/Kg de peso corporal. Para a execução do protocolo de estimulação elétrica, o membro inferior esquerdo foi tricotomizado na região do tríceps sural para garantir uma maior efetividade da estimulação elétrica e o posicionamento dos eletrodos. Os músculos foram submetidos à estimulação diária por 20 minutos utilizando uma corrente bifásica quadrática com frequência estabelecida de 10 Hz e largura de fase de 0,4 ms, pelos respectivos períodos experimentais. A frequência utilizada foi escolhida em função da ênfase dada ao músculo sóleo, constituído principalmente por fibras do tipo I. A intensidade da corrente foi padronizada em 5.0 mA, a partir da visualização da contração muscular. A cada 5 minutos aplicou-se um acréscimo de 1.0 mA à corrente para evitar-se a acomodação. O equipamento utilizado para a estimulação elétrica foi

o Dualpex 961, com 4 eletrodos de silicone-carbono de 1 cm² cada, posicionados na região inguinal e do tríceps sural respectivamente (figura 2).

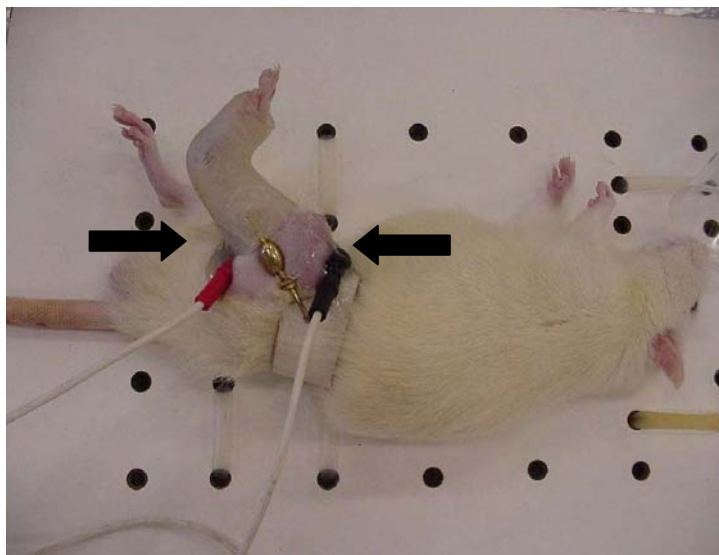


Figura 2 - Posicionamento de eletrodos (setas) durante a sessão de estimulação elétrica.

4.4. Avaliações

Durante o período experimental, foram realizados o Teste de Tolerância à Glicose Oral (GTT_o) e o Teste de Tolerância à Insulina Subcutâneo (TTI_{sc}):

4.4.1. GTT_o: Os animais após levemente anestesiados receberam, via oral, uma solução de glicose (2g/Kg de peso corporal), sendo em seguida coletadas amostras sanguíneas em diferentes intervalos de tempo (05, 10, 20, 30, 60 minutos) com capilares heparinizados e calibrados para 25 µL. A determinação da glicose foi realizada pelo método da glicose oxidase – Kit LABTEST, através do sangue coletado e dissolvido em 200 µL de TCA 4% (NOGUEIRA et al., 1990). O cálculo da área sob a curva de glicose sanguínea ($\Delta G = \text{mM} \times 60\text{min}^{-1}$) foi realizado pelo método trapezoidal (MATHEWS et al., 1990), utilizando o *software* ORIGIN 6.0® (1999).

4.4.2. TTIs_c: Os animais, após a mesma preparação descrita acima, receberam a aplicação sub cutânea de insulina mista regular purificada (30 mU/100g de peso corporal), sendo coletadas amostras sangüíneas em diferentes intervalos de tempo (0, 2,5, 05, 10, 20 minutos). A determinação da glicose sangüínea foi realizada pelo método da glicose-oxidase (NOGUEIRA et al., 1990). A taxa de remoção da glicose ($K_{itt} = \% \times \text{min}^{-1}$) durante o teste de tolerância à insulina foi calculada utilizando a fórmula: $(0,0693/t_{1/2}) \times 100$.

Após o respectivo período experimental, os animais foram sacrificados por decaptação, sendo retirados os músculos sóleo e gastrocnêmio e amostras sangüíneas para as seguintes avaliações:

4.4.3. Dosagem de ácidos graxos livres

Para determinação da concentração plasmática de ácidos graxos livres (AGL) foi utilizado o método proposto por REGOUW (1971). O método consistiu na extração do AGL através de um solvente seletivo, onde o extrato é tratado com uma mistura reagente que contém nitrato de cobre, havendo em consequência disto, a formação de um sabão de cobre. O metal assim ligado reage com o dietilditilcarbamato, produzindo uma coloração cuja intensidade é diretamente proporcional ao teor de AGL que é medida espectrofotometricamente em 435 nm.

4.4.4. Dosagem do ácido ascórbico da adrenal

Para determinação do ácido ascórbico foi realizada utilizando o método de MINDLIN e BUTLER (1938). O procedimento consistiu em macerar a adrenal com 1 mL de ácido perclórico (0,4N), acrescentar 5 mL de ácido metafosfórico 2,5% e a seguir filtrar o produto obtido. O método é baseado na capacidade da vitamina C em reduzir o 2,6-diclofenol-indofenol, substância que possui a

propriedade de apresentar a cor azul em solução neutra e cor rosa em solução ácida

Uma curva padrão foi traçada empregando-se soluções de ácido ascórbico com concentrações de 2, 4, 6, 8, 10 µg/mL, preparadas a partir da solução mãe de ácido ascórbico e ácido metafosfórico. As leituras dos padrões e das amostras foram realizadas em espectrofotômetro, utilizando comprimento de onda de 520nm.

4.4.5. Determinação da concentração de proteínas totais.

Para determinação do conteúdo de proteínas totais foi utilizado o método do biureto cujo princípio está fundamentado no fato de substâncias que contêm dois ou mais laços peptídicos produzirem, em meio fortemente alcalino, uma cor violeta quando diluída com sulfato de cobre. A cor deve-se a formação de complexos de coordenação entre o íon cúprico e quatro grupos amina de duas cadeias protéicas adjacentes. Os valores são expressos em mg/mL (NEPOMUCENO E RUGGIERO, 2004).

4.4.6. Determinação da concentração de DNA

Foi utilizado o método da difenilamina onde o homogenato tecidual é submetido à presença de uma solução de difenilamina e posteriormente a leitura realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 595 nm segundo o método proposto por GILES e MYERS (1965).

4.4.7. Determinação da concentração plasmática de creatina quinase

A concentração plasmática de creatina quinase (CK) foi determinada através do sistema Vitros 950 com reagentes da Ortho-Clinical diagnostics (Ranton, NJ, USA).

4.4.8. Determinação da concentração plasmática das interleucinas IL-4, IL-6, IL-10 e TNF- α

As concentração plasmática da interleucina 6, interleucina 4, interleucina 10 e TNF α foram realizadas pelo método ELISA (Kit R&D Systems, Minneapolis, MN), com concentrações mínimas detectáveis (pg/ml) de 0,9, 2,0, 2,0 e 0,2 respectivamente, conforme descrito por Ostrowski et al. (1999)..

4.5. Análise Estatística

Para a análise estatística foi aplicado o teste de normalidade (Kolmogorov-Smirnov) seguido da análise variância (ANOVA) e teste de Tukey, com nível de significância de 5%.

5. RESULTADOS

Os resultados estão descritos nos artigos apresentados a seguir:

ESTUDO 1

Participação da interleucina 6 nos ajustes metabólicos desencadeados na fase aguda da imobilização articular. Estudo em ratos.

Souza MZ¹, Luciano E², Chingui LJ¹, Silva CA¹

¹ Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade Metodista de Piracicaba

² Instituto de Biociências da Universidade Estadual paulista - Unesp

Endereço para correspondência:

Marcial de Souza Zanelli
Rua dos Crisântemos 277
Bairro: Nova Piracicaba
CEP: - Piracicaba - SP
Fone (19) 3413 0755
e-mail: mzanelli@unimep.br

Runnig title: "Interleucina 6 e imobilização no músculo-esquelético"

Palavras chave: Interleucina, músculo-esquelético, imobilização

RESUMO

O objetivo do trabalho foi avaliar a participação da interleucina-6 sobre parâmetros fisiológicos da musculatura esquelética de ratos nos três primeiros dias da imobilização articular na posição de 90° (IM). Ratos Wistar foram divididos em 4 grupos (n=6): Controle (C), imobilizado 1 (I1), 2 (I2) e 3 dias (I3) sendo mantidos sob condições controladas de biotério. Após o período experimental, os ratos foram anestesiados com pentobarbital sódico (50mg/Kg, ip), o sangue coletado, centrifugado e direcionado para avaliação da concentração plasmática de glicose, ácidos graxos livres e interleucina 6. A seguir, os músculos sóleo (S) e gastrocnêmio porção branca (GB) foram retirados para avaliação da concentração de glicogênio (GLI) e razão proteínas totais/DNA (PT/DNA). A análise estatística foi realizada pelo teste de normalidade (Kolmogorov-Smirnov), ANOVA e teste de Tukey ($p < 0,05$). No primeiro dia da IM o músculo S não apresentou modificação no GLI, no entanto, o GB já apresentava redução de 20%. A partir do segundo e terceiro dia houve redução no GLI (S; 40% e 60%, e GB; 33% e 56% respectivamente). Estas alterações foram acompanhadas de elevação na concentração plasmática de IL-6 atingindo concentrações 166% maiores nas primeiras 24h e estabilizando em valores médios 146% maiores no segundo e terceiro dia, sendo acompanhada pela elevação na concentração plasmática de ácidos graxos livres atingindo 107%, 35% e 16% no 1º, 2º e 3º dia do desuso respectivamente. No que tange a relação DNA/PT, observou-se redução somente no GB que apresentou valores 27% e 30% menores no segundo e terceiro dia da IM. Os resultados sugerem que a interleucina 6 seja uma citocina secretada nas fases iniciais do desuso muscular exercendo um importante papel no processo de hipotrofia induzida pela

imobilização, uma vez que, sendo precocemente gerada, tem a finalidade de promover ajustes metabólicos que permitam minimizar as alterações quimio-metabólicas que acompanham o desenvolvimento da hipotrofia.

ABSTRACT

The objective of the study was to evaluate the interference of interleukin-6 on physiological parameters of skeletal muscle of rats during the first three days of joint immobilization at the position of 90° (IM). Wistar male rats were divided into 4 groups (n=6): Control (C), immobilized 1 (I1), 2 (I2) and 3 days (I3). After the experimental period, the rats were anesthetized with sodic pentobarbital (50mg/Kg, ip) and a blood sample was collected, centrifuged and taken for evaluation of the plasmatic concentrations of glucose, free fatty acids and interleukin-6. At this point, the soleus muscle (S) and the white portion of the gastrocnemius muscle (WG) were removed for evaluation of the glycogenic concentration (GLY) and the total protein/DNA ratio (Prot/DNA). The statistical analysis was accomplished by the normality test (Kolmogorov-Smirnov), ANOVA and Tukey test ($p < 0,05$). In the first day of IM the muscle S did not present modification in GLY, however, GB already presented a reduction of 20%. Starting from the second and third day there was reduction in GLYI (S; 40 and 60%, and GB; 33 and 56% respectively). These alterations were accompanied by an elevation of the plasmatic concentration of IL6, reaching concentrations 266% greater in the first 24 hours and stabilizing at mean values 246% larger in the second and third day. These increases were also accompanied by the rise in plasmatic concentration of free fatty acids, reaching 107%, 35% and 16% respectively in the 1st, 2nd and 3rd day of the disuse. In what concerns the relationship PT/DNA, A reduction was only observed in GB which presented values 27% and 30% smaller in the second and third day of IM. The results suggest that interleukin-6 is a cytokine secreted in the initial phases of muscular disuse, playing an important role in the hypotrophy process induced by the

immobilization, once that, being generated prematurely; it has the function of promoting metabolic adjustments that allow for minimization of chemical and metabolic alterations which accompany the development of hypotrophy.

INTRODUÇÃO

A homeostasia metabólica das fibras musculares depende de um constante suprimento de substratos metabolizáveis ajustando constantemente à disponibilidade a demanda. Neste sentido, as dinâmicas que determinam o padrão funcional podem ser comprometidas por diferentes fatores, como por exemplo, bloqueio da junção neuromuscular, desnervação ou ainda pelo desuso induzido pela imobilização (KANNUS et al., 1998). Em especial no que se refere à imobilização muscular, tem sido observado hipotrofia em associação com desordens ortopédicas como na osteoartrite crônica, no tratamento de fraturas, hipogravidade ou ainda em situações de manutenção por longos períodos na cama por razões médicas ou cirúrgicas (DESPLANCHES et al., 1990; REARDON et al., 2001).

Diversos autores buscam caracterizar a hipotrofia havendo um consenso que pode haver um caráter específico para cada tipo de músculo (CASTRO et al. 1999). Dessa maneira as fibras do tipo I possuem menor adaptação em relação às fibras do tipo II, sendo consequentemente as mais afetadas pelo desuso (Talmadge, 2002). Na década de 90 foi sugerido que músculos cuja ação é anti-gravitacional possuem maior grau de hipotrofia em situações de desuso (CAIOZZO et al., 1996). Mais recentemente observou-se maior susceptibilidade à hipotrofia em fibras lentas oxidativas destacando que o músculo sóleo foi o mais comprometido em situações de desuso por ser predominantemente formado por fibras do tipo I ao passo que o extensor longo dos dedos, que possui predomínio de fibras do tipo II é menos comprometido (KASPER, 2002, TANAKA et al. 2004).

Nesse sentido, também tem sido observado que as fibras lentas em situação de desuso apresentam marcantes alterações histo-fisiológicas como irregularidades no retículo sarcoplasmático, fibrilas desintegradas, lesão mitocondrial, linhas Z estendidas com condensação e fragmentação da cromatina nuclear e redução de sarcômeros em paralelo (SMITH et al., 2000; LU, HUANG e CARSON, 1997).

Alguns estudos têm tentado elucidar as alterações metabólicas presentes na imobilização. Hilder et al., (2003), estudaram o método de imobilização através da suspensão de membros posteriores de ratos e demonstraram que em músculos esqueléticos de contração lenta, como o músculo sóleo, a resistência à insulina acompanha o processo de atrofia muscular induzida pelo desuso. Simultaneamente, esses autores observaram também uma redução na expressão de proteínas nos músculos hipotrofiados e a correlacionaram à redução na efetividade da proteína IRS-1, evidenciando o comprometimento na sinalização insulínica. Além disso, observaram também uma redução na atividade da enzima Akt, indicando alterações nas vias citosólicas responsáveis pela glicogênese bem como a glicólise, fato que reflete no processo de hipotrofia.

Outro fator que possivelmente possa estar ligado ao processo de hipotrofia é a formação de citocinas, que são proteínas de baixo peso molecular, as quais atuam de forma autócrina, parácrina e endócrina modulando várias funções celulares. Dentre as citocinas a interleucina 6 (IL-6) merece destaque devido à sua atividade pró e anti-inflamatória (MALDOVEANU, SHEPHARD e SHEK, 2001; JAWA et al., 2006). A IL-6 está entre os mediadores mais potentes da resposta aguda ao trauma, participando de uma cascata de reações que inicia com o dano tecidual e que objetiva, em última instância, a restauração do tecido

(CRANE e MILLER, 1983). Estudos que focalizaram fenômenos ocorrentes em situações catabólicas, evidenciaram elevação na concentração plasmática de IL-6 (SEHGAL, GRIENINGER, TOSATO, 1986; SEHGAL, 1990). Nos músculos esqueléticos, a IL-6 tem sido relacionada com a proteólise muscular evidenciada clinicamente pela atrofia muscular. Tsujinaka et al. (1996), relataram que ratos transgênicos para a IL-6 apresentaram atrofia muscular que foi inibida por anticorpos anti-receptor desta citocina, considerando que IL-6 pode mediar à atividade do sistema proteolítico lisosomal.

Sua participação na proteólise muscular tem sido estudada por diferentes pesquisadores, indicando que a IL-6 também pode interferir no eixo GH/IGF-I (BENEDETTI et al., 1997; LIESKOVSKA, GUO e DERMAN, 2002).

Diante desse contexto, o objetivo desse trabalho foi avaliar a concentração plasmática de interleucina 6, o conteúdo de glicogênio dos músculos sóleo e gastrocnêmio porção branca, a concentração plasmática de ácidos graxos livres e a relação proteína total/DNA em ratos submetidos à imobilização articular de membro posterior na posição do tornozelo em 90°, dando ênfase aos primeiros três dias do desuso.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados ratos albinos *Wistar* com 3 meses de idade, fornecidos pelo Biotério da UNESP – Rio Claro, sendo alimentados com ração (Purina® para roedores) e água *ad libitum*, submetidos a ciclos foto periódicos de 12h claro/escuro e distribuídos em 4 grupos experimentais com n=6, a saber: controle (C) e imobilizados por 1dia (I1), imobilizados por 2 dias (I2) e imobilizados por 3 dias (I3). Os animais foram tratados de acordo com o guia de tratamento de animais de laboratório do National Research Council, 1996.

Após anestesia com pentobarbital sódico (50mg/kg,i.p), a pata posterior esquerda dos animais foi imobilizada com o modelo de órtese de resina acrílica proposto por Silva et al. (2006) como pode ser observado na figura 1. Após o período de imobilização os animais foram novamente anestesiados e duas amostras de sangue foram coletadas da veia renal, sendo uma amostra direcionada para avaliação da concentração plasmática de interleucina 6 pelo método ELISA (Kit R&D Systems, Minneapolis, MN, com concentração mínima detectável de 0,9pg/ml) e a outra amostra centrifugada para isolamento do plasma e determinação da concentração de ácidos graxos livres segundo a proposta de Regouw (1972). A seguir, os músculos sóleo e o gastrocnêmio porção branca, foram cuidadosamente retirados e encaminhados para avaliação das reservas glicogênicas pelo método proposto por Siu, Russeau e Taylor (1970), da concentração de proteína total através de kit laboratorial da marca Bio Diagnóstica® e quantidade de DNA segundo o método proposto por Giles e Myers (1965).

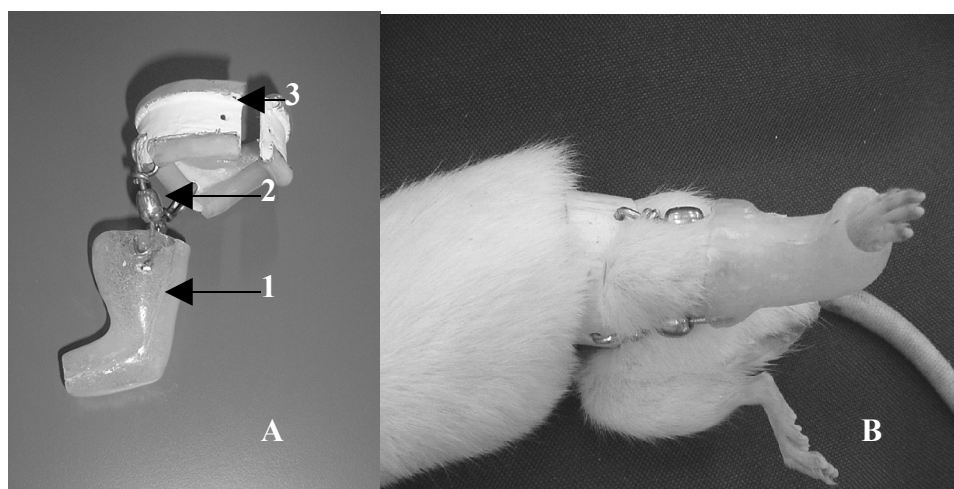


Figura 1. Em (A) observa-se a órtese de resina acrílica composta de uma bota de acrílico (1), rotadores (2) e cinta abdominal (3). Em (B) pode-se observar a

órtese adaptada ao corpo do rato mantendo a articulação do tornozelo na posição de 90°.

Na avaliação estatística foi aplicado o teste de normalidade (Kolmogorov-Smirnov) seguido da análise variância (ANOVA) e teste de Tukey, com nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

RESULTADOS

Um consenso na literatura científica é que a reserva muscular de glicogênio é imprescindível para a manutenção de condições energéticas ideais determinando a eficiência da contração muscular. Inicialmente foi avaliado o comportamento das reservas glicogênicas do músculo sóleo (fibra tipo I), sendo observado que nas primeiras 24 horas de desuso, não há diferença entre os grupos controle e imobilizado, estando representado pelas seguintes médias $\pm$ erro padrão da média no grupo controle: $0,50 \pm 0,01 \text{ mg/100mg}$ e no grupo imobilizado por 1 dia: $0,47 \pm 0,01 \text{ mg/100mg}$ (figura 2).

Por outro lado, houve diminuição significativa das reservas glicogênicas no segundo e terceiro dia da imobilização, gerando após 48h de imobilização uma redução progressiva nas reservas (40%) quando comparado ao grupo controle, estando assim definidas: grupo controle: $0,50 \pm 0,01 \text{ mg/100mg}$ e grupo imobilizado por 2 dias: $0,30 \pm 0,006 \text{ mg/100mg}$ ($p < 0,05$). No grupo imobilizado por 3 dias a redução atingiu 60% se comparado ao grupo controle, estando assim representado no grupo controle por $0,50 \pm 0,01 \text{ mg/100mg}$ e no grupo imobilizado por 3 dias $0,20 \pm 0,006 \text{ mg/100mg}$.

No que tange ao comportamento da reserva glicogênica do músculo gastrocnêmio (fibra tipo II) na figura 2 pode-se observar que, nas primeiras 24 horas houve redução estatisticamente significativa de 20% (grupo controle:

0,55±0,01mg/100mg e grupo imobilizado por 1 dia: 0,44±0,00801mg/100mg, $p<0,05$), ao passo que no segundo e terceiro dia, a redução foi contínua e progressiva equivalendo a 33% (grupo controle: 0,55±0,01mg/100mg e grupo imobilizado por 2 dias: 0,37±0,01mg/100mg, $p<0,05$) e 56% (grupo controle: 0,55±0,01 mg/100mg e grupo imobilizado por 3 dias: 0,24±0,03 mg/100mg, $p<0,05$), respectivamente.

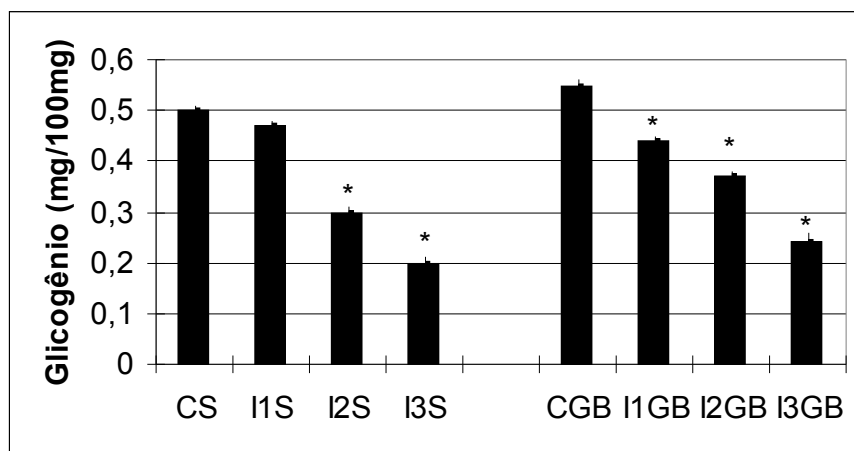


Figura 2. Média±epm do conteúdo de glicogênio (mg/100mg) dos músculos sóleo (S) e gastrocnêmio porção branca (GB) dos grupos controle (C) e imobilizados por 1 dia (I1), por 2 dias (I2) e por 3 dias (I3) na posição de 90° do tornozelo. n=6. * $p<0,05$ comparado ao controle.

Seguindo a proposta, passou-se a avaliar a concentração plasmática de interleucina 6 (figura 3), sendo observado uma elevação significativa de 166% logo nas primeiras 24h do desuso quando a concentração passou de 259±13pg/mL no grupo controle para 690±59pg/mL no grupo imobilizado. No segundo e terceiro dia do desuso as concentrações plasmáticas estabilizaram em valores médios 146% maiores se comparadas ao controle, estando assim representadas 259±13pg/mL no grupo controle e 638±24pg/mL no grupo imobilizado por 2 dias ($p<0,05$) e 642±7,5pg/mL no grupo imobilizado por 3 dias.

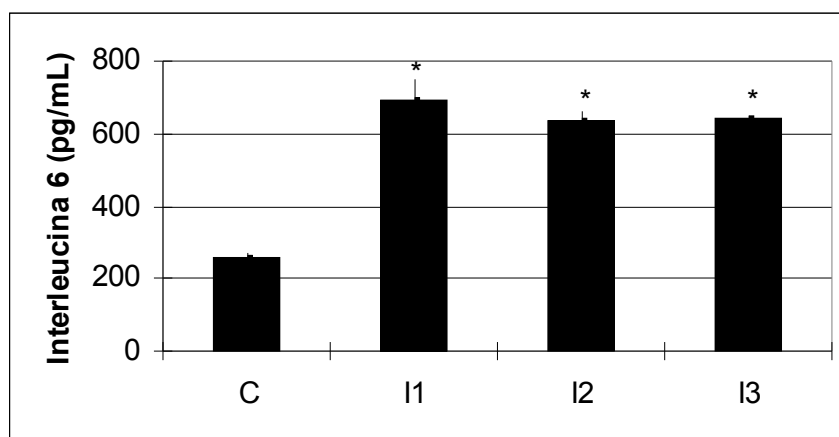


Figura 3. Média $\pm$ epm da concentração plasmática de interleucina 6 (pg/mL) dos grupos controle (C) e imobilizados por 1 dia (I1), por 2 dias (I2) e por 3 dias (I3) na posição de 90° do tornozelo. n=6. *p<0,05 comparado ao controle.

Ao verificarmos a expressiva elevação na concentração plasmática de IL-6, passou-se a avaliar a concentração plasmática de ácidos graxos livres sendo observado que houve elevação de 107% nas primeiras 24h do desuso quando a concentração passou de $0,38\pm0,01$ mmol/L no grupo controle para $0,79\pm0,01$ mmol/L no grupo imobilizado por 1 dia. No segundo dia do desuso, a concentração plasmática ainda permanecia elevada atingindo valores 31% maiores que o controle ($0,38\pm0,01$ mmol/L no grupo controle e $0,50\pm0,03$ mmol/L no grupo imobilizado por 2 dias, p<0,05) e no terceiro dia ainda apresentava valores 16% maiores que o controle ($0,38\pm0,01$ mmol/L no grupo controle e $0,44\pm0,01$ mmol/L no grupo imobilizado por 3 dias), como mostra a figura 4.

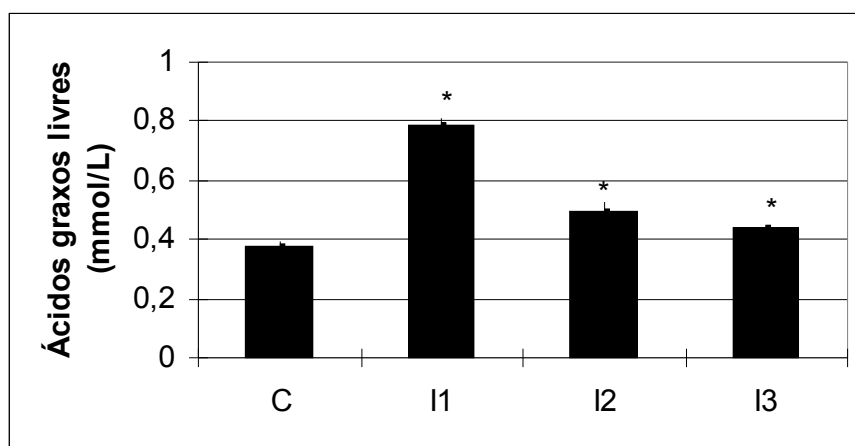


Figura 4. Média $\pm$ epm da concentração plasmática de ácidos graxos livres (mmol/L) dos grupos controle (C) e imobilizados por 1 dia (I1), por 2 dias (I2) e por 3 dias (I3) na posição de 90° do tornozelo. n=6. *p<0,05 comparado ao controle.

A seguir, passou-se a avaliar a razão proteína total/DNA nos diferentes grupos experimentais e como pode ser observado na tabela 1, houve redução neste parâmetro somente no músculo gastrocnêmio porção branca, no segundo e no terceiro dia do desuso quando os valores se apresentaram 27% e 30% respectivamente menores do que os valores do grupo controle.

Tabela 1. Razão Proteínas totais/DNA (mg/100mg) nos músculos sóleo, e gastrocnêmio branco dos animais controles e submetidos à imobilização (I) por 1, 2 e 3 dias (média $\pm$ epm, n=6).

	Controles	I 1 dia	I 2 dias	I 3 dias
Sóleo	137,82 $\pm$ 14,5	116,03 $\pm$ 3,86	105,84 $\pm$ 11,6	106,21 $\pm$ 18,0
Gastroc. Branco	181,04 $\pm$ 9,79	146,85 $\pm$ 13,84	131,55 $\pm$ 15,5*	125,84 $\pm$ 17,2*

* Diferente de controles (p<0,05)

DISCUSSÃO

O músculo esquelético é um dos principais tecidos ligados ao controle glicêmico por apresentar mecanismos responsáveis pela captação, metabolização e reserva de glicose. Esta capacidade decorre da expressão gênica de transportadores do tipo 1 (Glut1) envolvido na captação basal da glicose e transportadores do tipo 4 (Glut4) cuja atividade mostra ser dependente da insulina e do aumento na atividade contrátil (KERN et al., 1990; FERNANDEZ e LEROITH, 2006). Cerca de 70 a 85% da glicose captada é direcionada a formação de reservatórios de glicogênio ou pode ainda ser oxidada para geração de energia (HENRIKSEN et al., 1990). Neste contexto, destaca-se que as reservas musculares de glicogênio são uma importante fonte de energia durante a atividade contrátil, desta forma, flutuações no conteúdo, podem interferir no desempenho, ou seja, concomitante a elevação nas reservas observa-se melhora na resistência durante atividade física, porém, em pequenas quantidades participam dos processos associados à fadiga muscular (SESTI, 2006).

Hirose et al. (2000) estudaram a via sinalizadora da insulina em ratos que tiveram a pata imobilizada por fixação do joelho e tornozelo a 90°, durante sete dias, e verificaram redução na transdução do sinal insulínico, sugerindo déficit na ativação do receptor e nas enzimas ativadas a partir deste, incluindo a fosforilação do IRS-1 (substrato 1 do receptor de insulina) e a ativação da PI3-K, demonstrando que o quadro de resistência à insulina, também pode ser desencadeado na imobilização. Essa alteração na dinâmica de sinalização da insulina pode explicar os resultados deste estudo, onde foi observado que sob

condição aguda de imobilização, houve redução nas reservas musculares de glicogênio.

O presente estudo mostra que, no músculo sóleo, houve redução significativa no conteúdo de glicogênio somente a partir do segundo dia do desuso. Neste sentido, Ploug et al. (1995) estudando o comportamento metabólico de músculos vermelhos submetidos a um curto período de imobilização (48 horas) verificaram diminuição significativa na população dos transportadores Glut1 e Glut4 além da redução na atividade das vias glicogênicas e sugeriram o desenvolvimento do quadro de resistência no desuso. Ainda com relação às reservas musculares de glicogênio, demonstramos que no músculo gastrocnêmio porção branca (fibra tipo II), houve a maior redução no conteúdo se comparado ao sóleo (fibras tipo I). Neste sentido, há de se considerar que a órtese permitia a descarga de peso no membro imobilizado e este fato pode ter contribuído para a diferenciação do efeito se comparar ao músculo sóleo, uma vez que é um músculo postural. Assim, os dados deste estudo corroboram com a literatura referendando que a órtese aqui utilizada como modelo de imobilização mostrou ser um modelo gerador de resistência à insulina comprometendo a homeostasia das vias metabólicas das fibras musculares.

Entre os anos 70 e 80, havia contradição quanto ao tipo de fibras mais susceptíveis à hipotrofia sendo descrito que as fibras brancas (tipo II) eram mais susceptíveis (MCDUGALL et al., 1980) enquanto outros autores se referiram às fibras vermelhas (tipo I) como as mais susceptíveis (BOOTH e KELSO, 1973). No entanto, há trabalhos que não evidenciaram qualquer diferença no comportamento dos diferentes tipos de fibras à hipotrofia (WILLIAMS e

GOLDSPINK, 1978). Em 1986, Appell verificou que o decréscimo mais pronunciado do diâmetro das fibras ocorre durante a primeira semana de imobilização e em estudos realizados com animais e com tempos de imobilização variáveis, foi demonstrado que as fibras tipo I foram as que apresentaram sinais mais evidentes de hipotrofia, sugerindo que tal fato ocorre devido à redução da atividade das enzimas oxidativas. Neste sentido, os diferentes trabalhos se diferenciam quanto ao período de desuso avaliado e nossos resultados mostram que já existem alterações significativas desencadeadas precocemente, ou seja, nos primeiros dias do desuso. Cabe salientar que a homeostasia energética do músculo gastrocnêmio branco já ficou comprometida nos primeiros dias da imobilização

A escolha de direcionar o estudo à posição do tornozelo a 90°, se deve ao fato de ser a posição anatômica mais utilizada na clínica ortopédica e também pela existência de trabalhos que mantiveram o tornozelo imobilizado nessa posição, Nestes trabalhos, as articulações do quadril e joelho também estavam imobilizadas, diferenciando de nossa proposta onde a articulação do joelho e quadril se mantiveram livres (PLOUG et al., 1995; QIN et al., 1997; HIROSE et al., 2000). Dentro destas considerações, a órtese foi capaz de promover na musculatura, alterações metabólicas e na taxa proteína total/DNA indicando o desenvolvimento de proteólise, uma vez que, esta relação serve como índices de tamanho celular (ALBANES et al., 1990).

Recentemente Herrera et al. (2001) estudaram a inatividade muscular em membros posteriores de ratos e observaram que o músculo sóleo sofreu hipotrofia mais evidente que o músculo extensor longo dos dedos, apontando a provável relação com o tipo de fibra e função muscular durante a condição

normal de descarga de peso. Tanaka et al. (2004) também associaram o tipo de fibras ao grau de hipotrofia muscular, sendo que, como o sóleo possui um maior número de fibras tipo I e o extensor longo dos dedos mais fibras do tipo II, o primeiro músculo sofre mais durante a imobilização, devido à menor solicitação das fibras posturais (PLOUG et al., 1995).

Dentro desta linha de raciocínio, observamos que o músculo gastrocnêmio porção branca foi o mais afetado pela imobilização e possivelmente deve-se ao fato de ser bi-articular e neste modelo de desuso, apresentar limitação na sua condição fisiológica. Assim, por haver descarga de peso, o músculo sóleo recebia estímulo constante enquanto o animal deambulava. Uma vez que, tem sido descrito que frente à elevação da atividade contrátil há elevação na captação de glicose decorrente da translocação de transportadores Glut4, é sugestivo o fato que o sóleo adquiriu um status energético diferenciado dos outros músculos, razão pela qual os dados diferem do consenso presente na literatura.

Concomitante ao comprometimento das reservas energéticas, a relação proteína total/DNA muscular também foi comprometida pela imobilização do membro, sendo significativa a partir do 2º dia e com especificidade no músculo gastrocnêmio porção branca, reiterando que dentro da especificidade deste modelo de imobilização as fibras brancas foram afetadas precocemente.

No que tange as relações entre a homeostasia do músculo esquelético e as citocinas, é sabido que há elevação na produção de citocinas pró-inflamatórias, em especial a IL-6, associado à lesão tecidual, como já observado em atividade física de alta intensidade (Keller et al., 2001). Neste sentido, nossos resultados revelam que na fase inicial da imobilização há uma expressiva

elevação na concentração plasmática da IL-6, que pode estar associado a diferentes fatores ligados a imobilização, como por exemplo o desenvolvimento de lesão nas fibras musculares.

Dentro do perfil metabólico, observamos que a imobilização promove uma expressiva redução na reserva de glicogênio, fato relacionado com a redução na atividade da cascata sinalizadora da insulina, por outro lado, temos que considerar que concomitante a redução nas reservas de glicogênio a níveis que comprometam a geração de energia e afetando a atividade contrátil, tem sido descrito elevação na liberação de IL-6 pelo tecido muscular, o que justifica nossos resultados onde foi observado elevação na concentração plasmática de IL-6 concomitante a imobilização (GRIMBLE, 2003, RONSEN et al., 2002).

No músculo imobilizado foi observado redução no peso e diminuição na razão proteína total/DNA, sugerindo a instalação de um estado catabólico que se intensifica após 48h do desuso. Vale salientar que a IL-6 direta ou indiretamente media estados catabólicos (GRIMBLE, 2003).

Diversos autores estudaram as relações entre a concentração plasmática de IL-6 e o exercício físico e sugeriram que a elevação pronunciada na concentração plasmática de IL-6 pode estar associada à lipólise (RONSEN et al. 2003, WALLENIUS et al., 2002, GERRIT et al., 2003). Neste sentido, observamos que frente à imobilização houve elevação significativa na concentração plasmática de ácidos graxos livres acompanhando a flutuação na concentração plasmática da IL-6, indicando que pode haver integração nas relações funcionais, sugerindo que a IL-6 possa participar do controle de vias metabólicas melhorando a disponibilidade de substratos metabolizáveis (PEDERSEN et al, 2003).

Ressalta-se ainda, o fato da IL-6 promover síntese protéica e ativar a formação de fatores de crescimento insulínicos (GLEESON, 2000). Estas ações podem fazer parte de um conjunto de sistemas precocemente ativados e envolvidos no reparo tecidual.

CONCLUSÃO

A fase inicial da imobilização muscular é acompanhada de elevação na produção e secreção de interleucina 6, a qual pode influenciar na mobilização das reservas energéticas dando suporte nutricional aos processos de reparos teciduais. Assim, temos que destacar que estas respostas fisiológicas são precocemente ativadas enquanto o processo de hipotrofia se instala.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BENEDETTI, F., ALONZI, T., MORETA, A., LAZZARO, D., COSTA, P., POLI, V., MARINI, A., CILIBERTO, G., FATTORI, E. Interleukin-6 causes growth impairment in transgenic mice through a decrease in insulin-like growth factor-I. **J Clin Invest.**, v.99, p.643-650, 1997.

BOOTH, F.W., KELSO, J.R. Effect of hind-limb immobilization on contractile and histochemical properties of skeletal muscle. **Plurgers Arch.** v.342, p.231-338, 1973.

CAIOZZO, V.J., HADDAD, F., BAKER, M.J., HENRRICK, R.E., PRITTO, N., BALDWIN, K.M. Microgravity-induced transformations of myosin isoforms and contractile properties of skeletal muscle. **J Appl Physiol.** v.81, n.1, p.123-32, 1996.

CRANE, L.J., MILLER, D.L. Plasma protein induction by isolated hepatocytes. **Mol Cell Biochem.** V.53, p.89-109, 1983.

CASTRO, M.J., APPLE, D.F., STARON, R.S., CAMPOS, G.E., DUDLEY, G.A. Influence of complete spinal cord injury on skeletal muscle within 6 mo of injury. **J Appl Physiol.** v.86, p.350-358, 1999.

DESPLANCHES, D., KAYAR, S. R., SEMPORE, B., FLANDROIS, R. & HOPPELER, H. Rat soleus muscle ultrastructure after hindlimb suspension. **J Appl. Physiol.** v.69 n.2, p.504 – 508, 1990.

[FERNANDEZ, A. M.](#), [LEROITH, D.](#) Skeletal muscle. [Adv Exp Med Biol.](#) v.567, p.117-47, 2005.

HERRERA, N.M., ZIMMERMAN, A.N., DYKSTRA, D.D., THOMPSON, L.V. Clenbuterol in the prevention of muscle atrophy: a study of hindlimb-unweighted rats. **Arch Phys Med Rehabil.** v.82, p.930-934, 2001.

GERRIT, V., STEENSBERG, A., SACCHETTO, M., FISHER, C., KELLER, C., SCHJERLING, P., HISCOCK, N., MOLLER, K., SALTIN, B., FEBBRAIO, M.A., PEDERSEN, B.K. Interleukin-6 stimulates lipolysis and fat oxidation in humans. **J. Clin Endocrinol Metab.** v.88, n.7, p.3005-3010, 2003.

GILES, K.W., MYERS, T. An improved diphenylamine method for the estimation of deoxyribonucleic acid. **Nature.** v.206, n.4979, p.93-95, 1965.

GLEESON, M. Interleukins and exercise (perspectives). **J. Physiol.** v.529, p.1-3, 2000.

GRIMBLE, R.F. Inflammatory response in the elderly. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care.** v.16, p.21-29, 2003.

HILDER, T.L., TOU, J.C., GRINDELAND, R.E., WADE, C.E., GRAVES, L.M. Phosphorylation of insulin receptor substrate-1 serine 307 correlates with JNK activity in atrophic skeletal muscle. **FEBS Lett.** v.553, p.63–67, 2003.

[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, n.6, p.1235-1241, 2000.

HENRIKSEN, E.J., BOURNEY, R.E., RODNICK, K.J., KORANYI, L., PERMUTT, M.A., HOLLOSZY, J.O. Glucose transport protein content and glucose transport capacity in rat skeletal muscle. **Am. J. Physiol.** v.259, n.6, p.593-598, 1990.

HIROSE, M., KANEKI, M., SUGITA, H., YASUHARA, S & MARTYN, J. A. Immobilization depress insulin signaling in skeletal muscle. **Am. J. Physiol.** v. 279, n.6, p.1235-1241, 2000.

JANKORD, R., JEMIOLO, B. Influence of physical activity on serum IL-6 and IL10 levels in healthy older men. **Med. Sci. Sport Exerc.** v.36, p.960-964, 2004.

JAWA RS, KULAYLAT MN, BAUMANN H, DAYTIN MT. What is new in cytokine research related to trauma/critical care? **Intensive Care Med.** v.21, n.2, p.63-85, 2006.

KANNUS, P., JOZSA, L., JARVINEN, T.L.N., KVIST, M., VIENO, T., JARVINEN, T.A H.; NATRI, A. & JARVINEN, M. Free mobilization an low to high-intensity exercise in immobilization-induced muscle atrophy. **J. Appl. Physiol.** v.84, n.4, p.1418-1424, 1998.

KASPER CE, TALBOT LA, GAINES JM. Skeletal muscle damage and recovery. **AACN Clin Issues**, v.13, n.2, p.237-247, 2002.

KELLER, C., STEENSBERG, A., PILEGAARD, H., OSADA, T., SLTIN, B., PEDERSEN, B.K., NEUFER, P.D. Transcriptional activation of the IL-6 gene in human contracting skeletal muscle: influence of muscle glycogen content. **Faseb J.** v.15, p.2748-2750, 2001.

KERN, M. J., WELLS, J. A., STEPHENS, J. M., ELTON, C. W., FRIEDMAN, J., TAPSCOTT, E. B., PEKATA, P. H., DOHN, G. L. Insulin responsiveness in skeletal muscle is determined by glucose transporter (GLUT 4) protein level. **Biochem J.** v.270, p.397-400, 1990.

LIESKOVSKA J., GUO D., DERMANE. IL-6-overexpression brings about growth impairment potentially through a GH receptor defect. **Growth Horm. IGF Res.** v.12, p.388-398, 2002.

LU, D.X., HUANG, S.K., CARLSON, B.M. Electron microscopic study of long-term denervated rat skeletal muscle. **Anat. Rec.** v.248, n.3, p.355-365, 1997.

MALDOVEANU, A.I., SHEPARD, R.J., SHEK, P.N. The cytokine response to physical activity and training. **Sports Med.** v.3, n.2, p.115-144, 2001.

MOLDOVANU, A.I., SHEPARD, R.J., SHEK, P.N. Exercise elevates plasma levels but not gene expression of IL1 beta, IL6 and TNF-alpha in blood mononuclear cells. **J. Appl. Physiol.** v.89, p.1499-1504, 2000.

MCDUGALL, J. D., ELDER, G. C. B., SALE, D. C., MOROZ, J. R. & SUTTON, J. R. Effects of strength training and immobilization on human muscle fibers. **Eur. J. Appl. Physiol.** v.43, p.25-34, 1980.

PEDERSEN, B.K., STEENBERG, A., FISCHER, C., KELLER, C., PLOMGAARD, P., FEBBRAIO, M., SALTIN, B. Searching for the exercise factor: is IL-6 a candidate? **J. Muscle Res. Cell Motil.** v.24, p.113-119, 2003.

PLOUG, T., GALBO, H., VINTEN, J. JORGENSEN, M. & RICHTER, E. A. Kinetics of glucose transport in rat muscle: effects of insulin and contractions. **Am. J. Physiol.** v.253, p.12-20, 1987.

PLOUG, T., OHKUWA, T., HANDBERG, A., VISSING, J., GALBO, H. Effect of immobilization on glucose transport and glucose transporter expression in rat skeletal muscle. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.** v.268, p.980-986, 1995.

QUIN, L., APPLELL, H. J., CHAN, K. M. & MAFFULLI, N. Electrical stimulation prevents immobilization atrophy in skeletal muscle of rabbits. **Arch. Phys. Med. Rehabil.** v.78, n.5, p.512-517, 1997.

REARDON, K. A., FRACP, B. S., DAVIS, J., KAPSA, R. M. I., CHOONG, P. FRACS, M. D. & BYRNE, E. Myostatin, insulin-like growth factor-1, and leukemia inhibitory factor Mynas are up-regulated in chronic human disuse muscle atrophy. **Muscle & Nerve.** v.24, p.893-899, 2001.

RONSEN, O., LEA, T., BAHR, R., PEDERSEN, B.K. Enhanced plasma IL-6 and IL-1ra responses to repeated vs. single bouts of prolonged cycling in elite athletes. **J. Appl. Physiol.** v.92, p.2547-2553, 2002.

SESTI, G., Pathophysiology of insulin resistance. *Best. Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* v.20, n.4, p.665-679, 2006.

SILVA, C.A., GUIRRO, R.R.J., POLACOW, M.L.O., DURIGAN, J.L.Q. Proposal for rat hindlimb joint immobilization: orthosis with acrylic resin model. **Br. J. Med. Biol. Res.** v.39, p.979-985, 2006.

SIU, L.O., RUSSEAU, J.C., TAYLOR, A.W. Determination of glycogen in small tissue samples. **J. Appl. Physiol.** v.28, n.2, p.234-236, 1970.

SMITH, H.K., MAXWELL, L., MARTYN, J.A., BASS, J.J. Nuclear DNA fragmentation and morphological alterations in adult rabbit skeletal muscle after short-term immobilization. **Cell Tissue Res.** v.302, n.2, p.235-241, 2000.

STAMBOLIC, V. Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN. **Cell**, v. 95, p.29-39, 1998.

TALMADGE, R.J. Mechanical properties of rat soleus after long-term spinal cord transection. **J. Appl. Physiol.** v.93, n.4, p.1487-1497, 2002.

TANAKA, T., KARIYA, Y., HOSHINO, Y. Histochemical study on the changes in muscle fibers in relation to the effects of aging on recovery from muscular atrophy caused by disuse in rats. **J. Orthop. Sci.** v.9, p.76-85, 2004.

WALLENIOUS, V., WALLENIOUS K., AHRÉN, B., RUDLING, M., CARLSTEN, H., DICKSON, S.L., OHLSON, C., JANSSON, J.O. Interleukin-6-deficient mice develop mature-onset obesity. **Nat. Med.** v.8, p.75-79, 2002.

WILLIAMS, P.E., GOLDSPINK, G. Changes in sarcomere length and physiological properties of immobilized muscle. **J. Anat.** v.127, p.459-468, 1978.

Estudo 2

A UTILIZAÇÃO DA ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA NEUROMUSCULAR NA FASE AGUDA DA IMOBILIZAÇÃO DO TORNOZELO EM 90°. ESTUDO EM RATOS.

Souza MZ¹, Luciano E², Chingui LJ¹, Silva CA¹

¹ Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade Metodista de Piracicaba

² Instituto de Biociências da Universidade Estadual paulista - Unesp

Endereço para correspondência:

Marcial Zanelli de Souza
Rua dos Crisântemos 277
Bairro: Nova Piracicaba
CEP: - Piracicaba - SP
Fone (19) 3413 0755
e-mail: mzanelli@unimep.br

Runnig title: “Estimulação elétrica no músculo esquelético de ratos imobilizados”

Palavras chave: Interleucina, músculo-esquelético, imobilização, estimulação elétrica.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar a concentração plasmática das interleucinas 6 (IL-6), interleucina 4 (IL-4), interleucina 10 (IL-10) e fator de necrose tumoral alpha ($TNF\alpha$) bem como aspectos do metabolismo glicídico em ratos submetidos a estimulação elétrica neuromuscular durante os três primeiros dias de imobilização do tornozelo na posição de 90° (I). Ratos albinos wistar foram mantidos em condições ideais de biotério recebendo ração e água a vontade e submetidos a ciclo fotoperiódico de 12h claro/escuro sendo distribuídos em 7 grupos experimentais com n=6: controle (C), imobilizado por 1 dia (I1), imobilizado e eletroestimulado por 1 dia (IE1), imobilizado por 2 dias (I2), imobilizado e eletroestimulado por 2 dias (IE2), imobilizado por 3 dias (I3) e imobilizado e eletroestimulado por 3 dias (IE3). Para imobilização utilizamos uma órtese de resina acrílica e para a estimulação elétrica utilizou-se o equipamento Dualpex 961 (20 min/dia, pulso quadrático bifásico, 10Hz, 0.4 ms, 5.0 mA). Após o período experimental, os ratos foram anestesiados com pentobarbital sódico (50mg/Kg) e amostras de sangue coletadas para avaliação da concentração plasmática de interleucinas através do método ELISA. Os músculos sóleo e gastrocnêmio porção branca foram coletados para análise do conteúdo de glicogênio (GLI) pelo método do fenol sulfúrico. Outro grupo de ratos foi usado no teste de tolerância a glucose (GTT) e teste de tolerância à insulina (ITT). Para análise estatística foi aplicado o teste de normalidade (Kolmogorov-Smirnov) seguido de análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey, com nível de significância de 5% ($p<0,05$). Os resultados do ITT mostraram que a estimulação elétrica aumentou a remoção da glucose sangüínea, no entanto, não foi observado modificações no GTT após a terapia. No grupo submetido à

imobilização houve redução nas reservas de GLI indicando que o desuso modifica a sensibilidade à insulina e compromete a homeostasia energética, por outro lado, o grupo submetido a estimulação elétrica mostrou elevação no conteúdo do glicogênio muscular, sugerindo que a terapia pode favorecer o perfil enzimático alterado pela imobilização. O comprometimento das reservas de glicogênio é acompanhado pela elevação na concentração plasmática de IL-6 e TNF- α , mostrando a participação efetiva destas moléculas no controle do perfil metabólico. A concentração plasmática de IL-10 torna-se elevada somente após 3 dias da estimulação elétrica e a concentração de IL-4 não se modifica. A eletroestimulação provocou aumentos adicionais tanto na IL-6 quanto na TNF- α , o que pode estar diretamente ligado com ajustes no equilíbrio energético e indiretamente com a síntese das proteínas musculares. Os resultados sugerem que a estimulação elétrica pode ser uma ferramenta importante na manutenção das condições energéticas da musculatura submetida à imobilização, atuando de forma multifatorial em conjunto com as interleucinas e convergindo para proporcionar condições favoráveis para a recuperação dos tecidos em desuso.

ABSTRACT

The objective of the study was to evaluate the plasmatic concentration of interleukin-6 (IL-6), interleukin-4 (IL-4), interleukin-10 (IL-10) and tumor necrosis factor-alpha ($\text{TNF}\alpha$) and glucose metabolism aspects in rats submitted to electrical stimulation session during the first three days of joint immobilization at the position of 90° (I). Albino male Wistar rats were maintained in vivarium conditions with food and water *ad libitum*, submitted to 12-hour photoperiodic cycles of bright/dark, and distributed into 7 experimental groups with n=6: control (C), immobilized 1 day (I1), immobilized 1 day and electrostimulated (IE1), immobilized 2 days (I2), immobilized 2 days and electrostimulated (IE2), immobilized 3 days (I3) and immobilized 3 days and electrostimulated (IE3). To immobilization we use the acrylic resin orthosis model and to electroestimulation session we use the equipment Dualpex 961 (20 min-day, biphasic quadratic pulse, 10Hz, 0.4 ms, 5.0 mA). After the experimental period, the rats are anesthetized with sodium pentobarbital (50mg/Kg) and the blood samples were collected to evaluate the plasmatic concentration of interleukins by means of the ELISA method. The soleus and the white portion of the gastrocnemius muscle were collected to analyze the glycogen concentration (GLY) by fenol sulphuric method. Other group of rats are used for the glucose tolerance (GTT) and insulin tolerance tests (ITT). For statistical evaluation, a normality test was applied (Kolmogorov-Smirnov) followed by the variance analysis (ANOVA) and Tukey test, with significance level of 5% ($p < 0.05$). The results show that in ITT test, the electrical stimulation enhanced the skeletal muscle blood glucose removal, but we did not observe changes in GTT after the therapy session. The GLY store were reduced in immobilized groups indicating that the desuse compromise the

energetic homeostasis. On the other hand, the electrostimulated groups show an enhanced in GLY content that suggesting that this therapy restore the metabolic pathways altered by immobilization. The improvement in glycogen reserves are accompanied by an elevation of the plasmatic concentration of IL-6 and TNF-alpha, suggesting the participation of this interleukins in control of metabolic profile. The IL-10 plasmatic concentrations were elevated only after 3 days of electrical stimulation and IL-4 did not show modification. The results suggest that neuromuscular electrical stimulation is a important tools in the maintenance of energetic conditions of musculature submitted to immobilization, presenting multifactor mechanisms legated to interleukins action that converge to maintain the energetic equilibrium of the tissue in disuse.

INTRODUÇÃO

Na prática clínica, prescreve-se a imobilização segmentar do sistema musculoesquelético como uma das estratégias para o tratamento de variadas situações que envolvam lesões dos tecidos moles e ósseos, pós-operatórios específicos, ou minimamente, como auxiliar no controle de processos inflamatórios agudos. Como consequência inevitável tem-se a diminuição da amplitude de movimentos das articulações e aparecimento de hipotrofia muscular, elementos constituintes da síndrome do desuso (HALAR e KATHLEEN, 2002; REARDON et al., 2001).

No âmbito experimental, inúmeros estudos foram direcionados a aprimorar o conhecimento dos eventos deflagrados pelo desuso estando fundamentado em diferentes técnicas como a desnervação, tenotomia, fixação da articulação por meio de pinos e bloqueio químico da junção neuromuscular, suspensão do corpo, órtese de tecido de algodão, talas de gesso e mais atualmente a órtese de resina acrílica (OHIRA et al., 2002; TANAKA et al. 2004; COUTINHO et al. 2002; SILVA et al., 2006).

Embora já tenham sido demonstradas alterações histofisiológicas induzidas pela imobilização muscular, os resultados descrevem níveis diferenciados de susceptibilidade à atrofia, sendo demonstrado que as fibras brancas são mais susceptíveis à esse processo, outros autores se referem às fibras vermelhas e outros ainda, não evidenciam qualquer diferença no comportamento trófico dos diferentes tipos de fibras frente à imobilização (MCDOUGALL et al., 1980; EDGERTON et al., 1975; BOYES & JOHNSTON, 1979).

De forma consensual tem sido descrito redução de 35% na síntese protéica e diminuição da força no músculo imobilizado com intensidade de 1 a 6% por dia principalmente nos primeiros dias, sugerindo que as alterações mais evidentes da atrofia devam ocorrer nos dias iniciais da imobilização (MILLER, 1970; APPELL, 1986).

Um evento importante ligado às condições metabólicas se refere aos fosfagênios e glicogênio, onde desde a década de 70 tem sido sugerido que as reservas destes substratos energéticos podem ser reduzidas durante a imobilização (EDSTRÖM, 1970; MCDOUGALL et al., 1977; BOOTH e SNEIDER, 1979). A importância do conteúdo muscular de glicogênio está relacionada com a capacidade de resistência do organismo, de forma que, alterações no perfil enzimático, na atividade mitocondrial ou nas reservas são responsáveis tanto pela eficiência do trabalho muscular quanto pelo desenvolvimento do estado de fadiga ou exaustão (SNYDER, 1998).

A estimulação elétrica funcional dos músculos é um recurso e área de investigação próspera e freqüentemente utilizada na atividade fisioterapêutica. Pautado na sua funcionalidade, tem sido verificado que inúmeros sistemas celulares são ativados em decorrência da estimulação elétrica neuromuscular, destacando-se a integração entre as vias sinalizadoras celulares e as dinâmicas metabólicas, ativação ou inibição de vias específicas, mantendo o músculo um tanto mais ativo e saudável (ROBINSON e SNYDER-MACKLER, 2001).

Segundo Vanderthommen e Crielaard (2001) a estimulação elétrica neuromuscular é freqüentemente usada para fortalecer o músculo normal, mas na área da reabilitação, vários pesquisadores têm ressaltado o seu valor para tratar hipotrofia. Ainda se referindo à funcionalidade da estimulação elétrica,

devemos considerar que apesar desta técnica não substituir a ação fisiológica dos fatores neurotróficos, seu emprego demonstra ser uma estratégia viável com ação aditiva na recuperação sensório-motora. Sua adoção justifica-se devido a efeitos como, aumento de força e volume muscular, redução da espasticidade e rigidez, melhora da circulação sanguínea e plasticidade neural. Assim, freqüentemente é indicada em situações marcadas pelo desuso ou desativação das unidades motoras, caracterizadas pela fraqueza muscular ou até paralisias, incontinência, elevação ou perda do tônus muscular e na reeducação dos movimentos (MELA et al., 2001; SKÖLD et al, 2002).

Muitos cientistas têm avaliado as ações da estimulação elétrica em modelos experimentais que comprometem a dinâmica contrátil das fibras musculares, demonstrando os inúmeros benefícios para o músculo desnervado e para a regeneração de tecidos biológicos (GUIRRO et al, 2004; FORTI et al., 2004).

Em virtude da freqüência com que a eletroestimulação é utilizada na prática clínica, há uma grande importância no desenvolvimento de trabalhos que determinem a influência da estimulação elétrica na recuperação das condições energéticas comprometidas pelo desuso. Modelos experimentais têm sido desenvolvidos com o intuito de estudar a adaptação muscular durante a imobilização havendo sugestões que as alterações mais relevantes da atrofia ocorrem nos dias iniciais da imobilização (QUIN et al., 1997). Neste complexo de sistemas interligados ativados pela imobilização, existem estudos apontando as citocinas com potenciais efeitos metabólicos e tróficos sobre a musculatura esquelética, que podem influenciar o equilíbrio metabólico como um todo (CHANN et al., 2004; HADDAD et al., 2005). Por outro lado, há de se considerar que existem poucos trabalhos abrangendo os efeitos da estimulação elétrica

associada à imobilização com ênfase na participação de citocinas e do padrão metabólico da musculatura, sobretudo nos dias iniciais do desuso. Dessa forma, objetivo deste estudo foi avaliar a concentração plasmática das interleucinas 6 (IL-6), interleucina 4 (IL-4), interleucina 10 (IL-10) e fator de necrose tumoral alpha (TNF α) e aspectos do metabolismo glicídico em ratos submetidos a estimulação elétrica neuromuscular durante os três primeiros dias de imobilização monosegmentar.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados ratos albinos *Wistar* com 3 meses de idade, fornecidos pelo Biotério da UNESP – Rio Claro, sendo alimentados com ração (Purina® para roedores) e água *ad libitum*, submetidos a ciclos foto periódicos de 12h claro/escuro e distribuídos em 7 grupos experimentais com n=6, a saber: controle (C), imobilizados por 1 dia (I1), imobilizados e eletroestimulados por 1 dia (IE1), imobilizados por 2 dias (I2), imobilizados e eletroestimulados por 2 dias (IE2), imobilizados por 3 dias (I3) e imobilizados e eletroestimulados por 3 dias (IE3).

Após anestesia com pentobarbital sódico (50mg/kg,i.p), a pata posterior esquerda dos animais foi imobilizada com o modelo de órtese de resina acrílica proposto por Silva et al. (2006) como pode ser observado na figura 1. Após cada período experimental, os animais foram novamente anestesiados e uma amostra de sangue foi coletadas da veia renal, sendo direcionada para avaliação da concentração plasmática das citocinas: interleucina 6 (IL-6), interleucina 4 (IL-4), interleucina 10 (IL-10) e TNF- α , utilizando o método ELISA (Kit R&D Systems, Minneapolis, MN), com concentração mínima detectável (pg/ml) de 0,9, 2,0, 2,0 e 0,2 respectivamente, conforme descrito por Ostrowski et al. (1999). A seguir, os

músculos sóleo e o gastrocnêmio porção branca, foram cuidadosamente retirados e encaminhados para avaliação das reservas glicogênicas pelo método proposto por Siu, Russeau e Taylor (1970).

Para a realização do teste de tolerância à glicose (GTT_o) e teste de tolerância à insulina (ITT_{sc}), os animais foram anestesiados e após 15 minutos foi feita uma incisão na cauda do animal por onde foi coletada amostra de sangue. No GTT, após a primeira coleta foi injetado glicose (1g/Kg de peso) e novas amostras coletadas nos tempos 5, 10, 15, 20, 30 e 60 minutos. Por outro lado, no ITT, após a primeira coleta foi injetado insulina regular Biobrás® 1U/Kg de peso (1U/ml) e novas amostras coletadas nos tempos 0, 2,5, 5, 10 e 20 minutos, seguindo proposta do Guidelines of the Department of Comparative Medicine at the University of Toronto descrito no estudo de Chan et al. (2001). A glicemia nestes testes foi avaliada pelo método da glicose-oxidase (NOGUEIRA et al., 1990). As áreas sob a curva de glicose sangüínea e ($\Delta G = \text{mM} \times 120^{-1}$) foram calculadas pelo método trapezoidal (MATHEWS et al., 1990) utilizando o *software* ORIGIN 6.0® e a taxa de remoção da glicose ($\text{Kitt} = \% \times \text{min}^{-1}$) foi calculada utilizando a fórmula $(0,0693/t_{1/2}) \times 100$.

Os grupos experimentais submetidos à estimulação elétrica neuromuscular foram anestesiados para a execução do protocolo experimental que consistiu de estimulação diária por 20 minutos, por um período de 1, 2 e 3 dias. A corrente elétrica utilizada foi uma quadrática bifásica, com a frequência estabelecida de 10 Hz, largura de fase de 0.4 ms, com amplitude de partida padronizada em 5.0 mA, a partir da visualização da contração muscular (CHANTRAINE, GOBELET, ZILTENER, 1998). A cada 5 minutos aplicou-se um acréscimo de 1.0 mA à amplitude para evitar-se a acomodação. O equipamento

utilizado para a estimulação elétrica neuromuscular foi o Dualpex 961, além de 2 eletrodos de silicone-carbono de 1 cm² cada (figura 2), posicionados na região inguinal e no tríceps sural respectivamente. Em todos os procedimentos, os animais foram tratados de acordo com o Guide for Care use of Laboratory Animals (National Research Council, 1996).

Na avaliação estatística foi aplicado o teste de normalidade (Kolmogorov-Smirnov) seguido da análise variância (ANOVA) e teste de Tukey, com nível de significância de 5%.

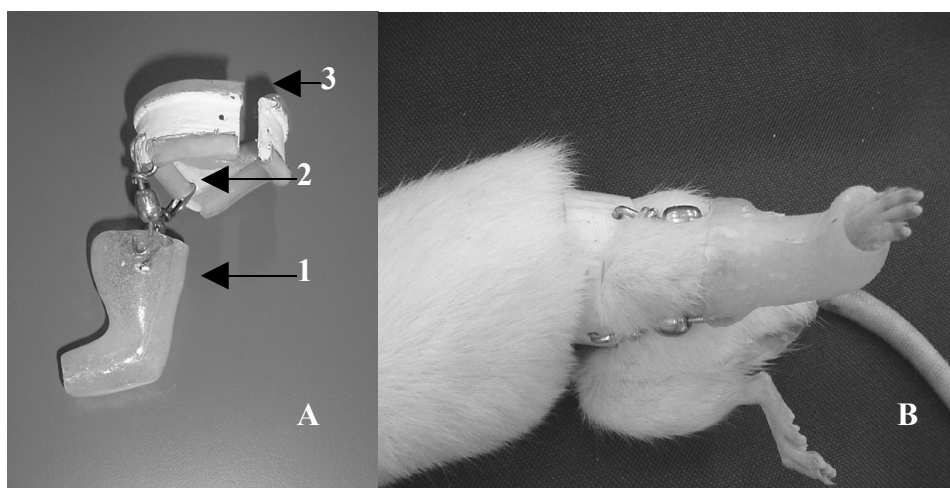


Figura 1. Em (A) observa-se a órtese de resina acrílica composta de uma bota de acrílico (1), rotadores (2) e cinta abdominal (3). Em (B) pode-se observar a órtese adaptada ao corpo do rato mantendo a articulação do tornozelo na posição em 90°.

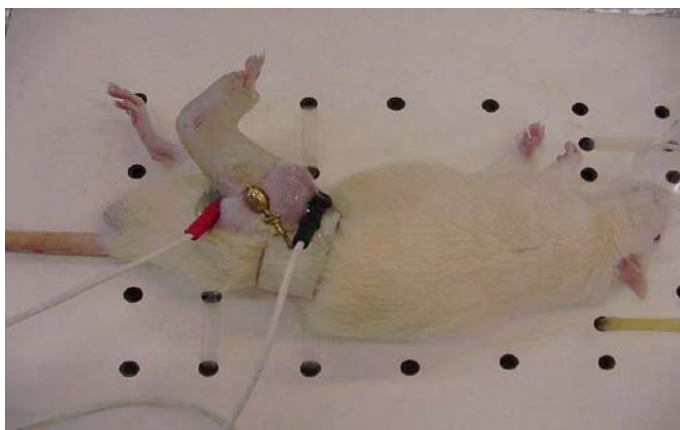


Figura 2. Posicionamento de eletrodos durante a sessão de estimulação elétrica.

RESULTADOS

Os resultados do ITT foram analisados através do cálculo KiTT, a constante de decaimento da glicemia dos grupos controle (C), imobilizados (I) e imobilizados estimulados eletricamente (IE) durante 1, 2 e 3 dias. Pode-se observar na figura 3 que a porcentagem de remoção da glicose foi reduzida em 54% no grupo I1 e este não difere do grupo IE1. Por outro lado, na mesma figura pode-se verificar que o grupo I2 não difere do controle, já o grupo IE2 apresentou elevação de 28% na remoção da hexose se comparado ao I2. Por sua vez, o grupo I3 apresentou taxa de remoção 19% maior que o controle enquanto o grupo IE3 apresentou uma significativa elevação de 125% se comparado ao controle e 89% se comparado ao I3, indicando elevação na sensibilidade dos tecidos à insulina.

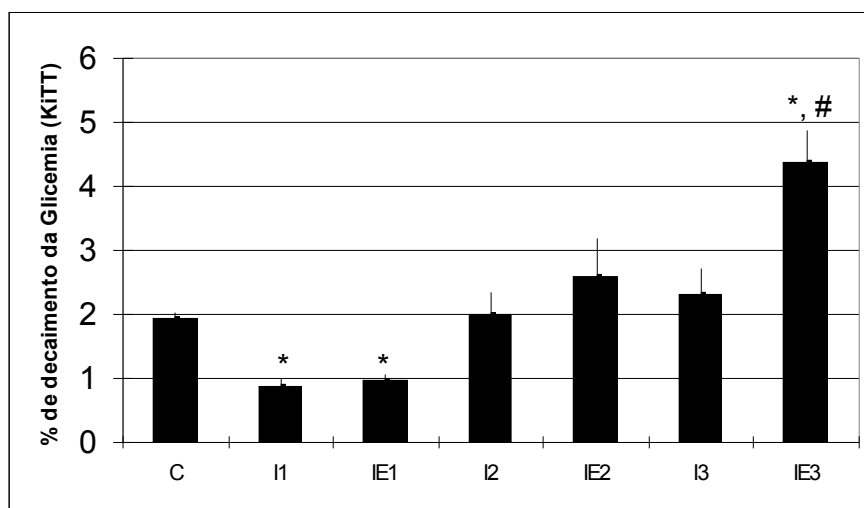


Figura 3. Porcentagem do decaimento/minuto da glicemia durante o Teste de Tolerância a Insulina nos animais controle, submetidos à imobilização (I) por 1, 2 e 3 dias e submetidos à imobilização associada a estimulação elétrica (IE) durante os respectivos dias de imobilização, n=6. *P<0,05 se comparado ao controle, #P<0,05 se comparado ao imobilizado 3 dias, P<0,05.

A resposta pancreática frente à sobrecarga de glicose do grupo I e do grupo IE pode ser observado na figura 4, onde está demonstrado que a I1, I2 e I3 dias promoveu elevação de 16%, 21% e 12%, respectivamente na áreas sob a curva glicêmica durante o teste de tolerância à glicose. Por outro lado, no grupo IE não se observa diferença do controle, porém, apresenta-se 6,8%, 19,6% e 9,6% menor do que o I, respectivamente nos 3 dias de avaliação.

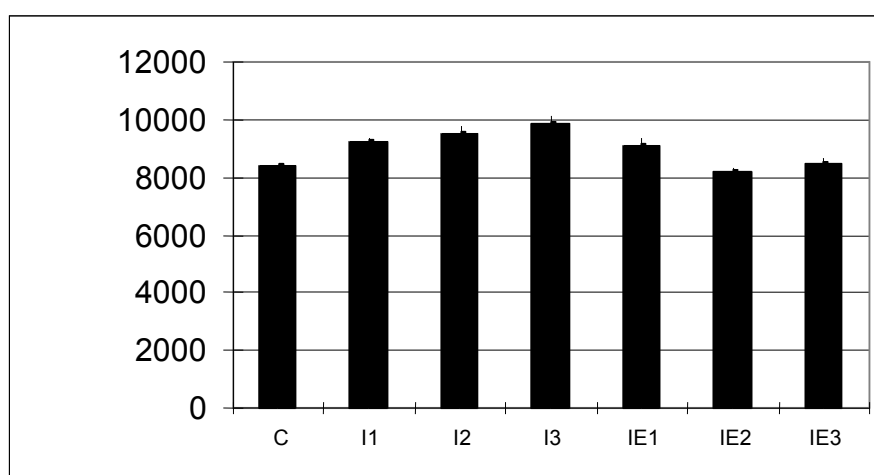


Figura 4. Representação da área sob a curva glicêmica no teste de tolerância a glicose (**GTT, mg/dL/90min**) de ratos controle (C), imobilizado (I) e imobilizado submetido à estimulação elétrica (IE) 1, 2, 3 dias. Os valores correspondem à média $\pm$ epm, n=6. *P<0,05 se comparado ao controle.

Na figura 5 está representada a avaliação do comportamento das reservas musculares de glicogênio, onde observa-se que o músculo sóleo imobilizado apresentou redução de 6% no primeiro dia, 40% no segundo dia e 60% no terceiro dia. Por outro lado, na mesma tabela pode-se verificar que o grupo submetido à estimulação elétrica apresentou elevação significativa nas reservas atingindo 27% e 110% no segundo e terceiro dia da terapia, respectivamente se comparado ao grupo imobilizado. No que tange ao comportamento da reserva glicogênica do músculo gastrocnêmio, a tabela 2 mostra que houve redução de

20% no primeiro dia da imobilização, 33% no segundo e 56% no terceiro dia. Por outro lado, ao compararmos o grupo imobilizado estimulado eletricamente com o grupo imobilizado observamos que na presença do estímulo houve elevação nas reservas atingindo 9% no primeiro dia, 16% no segundo e 46% no terceiro dia.

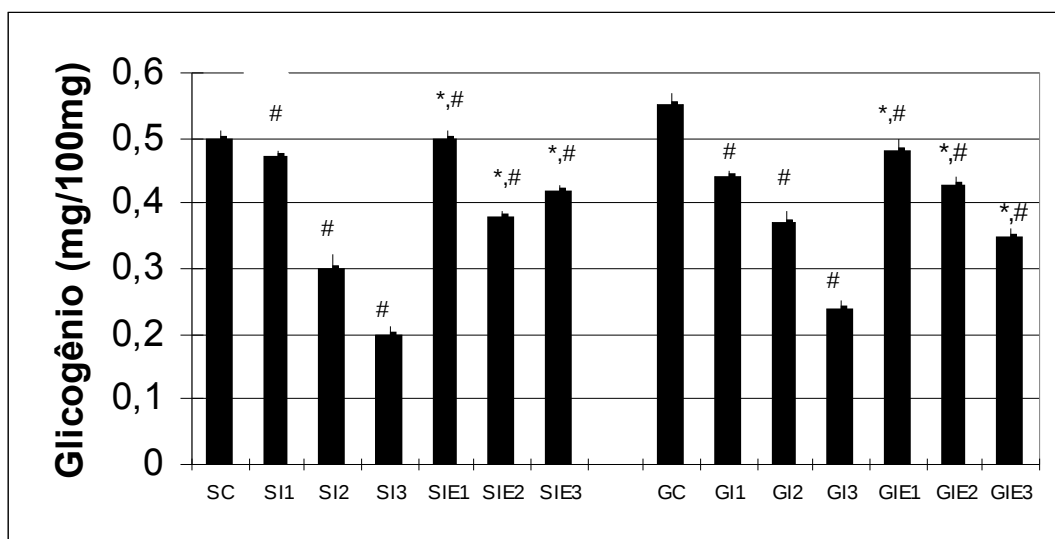


Figura 5. Conteúdo de glicogênio (mg/100mg) dos músculos sóleo (S) e gastocnêmio porção branca (G) dos grupos controle (C), imobilizados (I) e imobilizados estimulados eletricamente (IE), nos 3 dias experimentais (1,2,3). Os valores correspondem à média±epm, n=6. *P<0,05 se comparado ao não estimulado e # P<0,05 se comparado ao controle.

Nesta fase experimental passamos a analisar a concentração plasmática das citocinas dos grupos imobilizados (I) e imobilizados submetidos à estimulação elétrica (IE). Na tabela 1, pode-se verificar que a concentração plasmática de IL-6 (pg/ml) foi expressivamente elevada nos três dias da imobilização, ficando ainda maior quando associada à estimulação elétrica, visto que, ao compararmos com o grupo controle, os valores foram 195% maiores no primeiro dia, 206% no segundo dia e 183% no terceiro dia. Por outro lado, ao compararmos o grupo IE com o grupo I, verificamos que no grupo IE as

concentrações ainda foram 20%, 25% e 14% significativamente maiores no 1º, 2º e 3º dia respectivamente.

No que tange a concentração plasmática de TNF- α (pg/mL) foi verificado que esta acompanhou o perfil observado na concentração da IL-6, porém, em menor proporção. Assim, se comparado o grupo IE com o controle observa-se valores 44% maiores no primeiro dia, 41% no segundo dia e 60% no terceiro dia e, se compararmos ao grupo I, as concentrações ainda foram 23%, 18% e 34% maiores, respectivamente.

Na mesma linha de raciocínio, direcionou-se a avaliação ao comportamento da IL-10 comparando o grupo IE com o I e somente foi observado diferença significativa de 43,3% no terceiro dia da associação. Na seqüência experimental, foi avaliada a concentração plasmática da IL-4 e como pode-se observar na tabela 3, não houve diferença entre os grupos.

Tabela 1. Concentração plasmática das interleucinas IL-6, TNF- α , IL-10 e IL-4 (pg/mL) dos grupos controle, imobilizados (I) e imobilizados estimulados eletricamente (IE) durante 1, 2, 3 dias. Os valores correspondem à média $\pm$ epm, n=6. *p<0,05 se comparado ao controle e # p<0,05 se comparado ao I do período correspondente.

	Controle	I1	I2	I3	IE1	IE2	IE3
IL6	259 $\pm$ 12	690,3 $\pm$ 58*	638,5 $\pm$ 24*	642,5 $\pm$ 7*	764,8 $\pm$ 7*.#	795,1 $\pm$ 33*.#	735,5 $\pm$ 36*.#
TNF-α	146,5 $\pm$ 4	171 $\pm$ 5*	175 $\pm$ 6*	174,8 $\pm$ 3*	210,5 $\pm$ 11*.#	206,6 $\pm$ 17*.#	234,5 $\pm$ 12*.#
IL-10	123,5 $\pm$ 1	121 $\pm$ 3	119,5 $\pm$ 2	119,5 $\pm$ 0,7	133,1 $\pm$ 1,1	118,1 $\pm$ 3	171,1 $\pm$ 0,8*.#
IL-4	9,12 $\pm$ 0,2	10,05 $\pm$ 0,2	10,07 $\pm$ 0,4	11,07 $\pm$ 0,5	10,26 $\pm$ 0,4	11,06 $\pm$ 0,6	11,7 $\pm$ 0,7

DISCUSSÃO

O desuso muscular provocado por condições de períodos longos no leito, utilização de órteses, fixações de membros ou microgravidade induz à resistência à insulina e conseqüentemente a um estado catabólico nos músculos esqueléticos (FERRANDO et al., 1996; STEIN et al., 1994, AQUINO et al., 2005).

Hirose et al. (2000) estudaram a via sinalizadora da insulina em ratos que tiveram a pata imobilizada por fixação do joelho e tornozelo a 90° durante 7 dias, e verificaram redução na transdução do sinal insulínico, sugerindo déficit na ativação do receptor de insulina e nas enzimas ativadas a partir deste, incluindo a fosforilação do IRS-1 (substrato 1 do receptor de insulina) e a ativação da PI3-K, demonstrando que o quadro de resistência à insulina também pode ser desencadeado na imobilização. Essa alteração na dinâmica de sinalização da insulina pode explicar os resultados deste estudo, onde foi observado baixas reservas de glicogênio nos músculos analisados na fase aguda da imobilização e recuperação parcial nos músculos eletroestimulados.

Ploug et al. (1995) aprimoraram a compreensão do comportamento metabólico muscular durante um curto período de imobilização (48 horas) ao demonstrarem diminuição significativa na população dos transportadores Glut1 e Glut4 nas fibras musculares, redução no número de receptores insulínicos e atividade kinase do receptor sugerindo que, no curto período, a resistência ao transporte de glicose é tipo de fibra específica. Essas alterações apresentam caráter multifatorial diferindo quanto ao tempo da imobilização, posição articular, atividade eletromiográfica e tipagem de fibra muscular analisada. Nossos resultados, ao demonstrar a expressiva redução nas reservas glicogênicas em

decorrência da imobilização, corrobora com a hipótese de expressão multifatorial no controle metabólico da musculatura esquelética.

Ainda com relação às reservas de glicogênio, demonstramos que neste modelo de imobilização houve redução progressiva no conteúdo glicogênico de forma generalizada, atingindo as fibras brancas (contração rápida) representada pelo gastrocnêmio e as fibras vermelhas (contração lenta), representadas pelo sóleo. Neste sentido, ressaltamos que a órtese permitia a descarga de peso do membro, diferindo de modelos de suspensão de membro (PICQUET & FALEMPIN, 2003) ou de arrastamento do membro (DIAS et al., 2004), os quais impedem a descarga de peso.

Entre os anos 70 e 80, havia contradição quanto ao tipo de fibra mais susceptível à atrofia, no entanto, em 1986, Appell verificou que o decréscimo mais pronunciado do diâmetro das fibras ocorre durante a primeira semana de imobilização. Este fato influenciou na escolha de estudar o período agudo da imobilização, onde observamos que as alterações da musculatura ocorreram precocemente, acrescentando observações que indicam o maior comprometimento das reservas energéticas ocorrendo nesta fase, ou seja, nos primeiros dias do desuso.

Sabe-se que grande parte dos estudos avaliam posições articulares diferenciadas, mantendo músculos encurtados ou alongados, no entanto, nossa proposta de direcionar o estudo à posição do tornozelo em 90° é pautada no fato de ser a posição de imobilização mais utilizada na clínica ortopédica, por ser mais funcional e prover uma melhor acomodação tecidual. Na literatura há trabalhos que mantêm o tornozelo imobilizado na posição de 90°, juntamente com a imobilização das articulações do joelho e quadril a 90° (PLOUG et al.,

1995; QUIN et al., 1997; HIROSE et al., 2000). Especificamente neste o modelo de imobilização, trata-se de um trabalho diferenciado pelo fato da órtese utilizada manter a articulação do joelho e quadril livres, possibilitando a deambulação com descarga de peso. Mesmo frente a estas considerações, a órtese foi capaz de promover significativas alterações metabólicas na musculatura.

Recentemente Herrera et al. (2001) estudaram inatividade muscular em membros posteriores de ratos e observaram que o músculo sóleo demonstrou maior atrofia que o extensor longo dos dedos, provavelmente devido à composição do tipo de fibra muscular e pela função deste durante a condição normal de descarga de peso. Tanaka et al. (2004) também associaram o tipo de fibras ao grau de atrofia muscular, sendo que, como o sóleo possui um maior número de fibras tipo I e o extensor longo dos dedos mais fibras do tipo II, o primeiro músculo sofre mais pela diminuição de estímulo durante a imobilização, devido à menor solicitação das fibras posturais (PLOUG et al., 1995). No presente trabalho possivelmente o sóleo foi o músculo menos afetado, deferindo do resultado relatado no trabalho de Ploug et al. (1995). Tal comportamento pode ser reflexo da especificidade do modelo de imobilização utilizado, uma vez que a descarga de peso pode ser um estímulo eficaz para elevação na captação de substratos metabolizáveis, instalando um novo status energético a partir da elevação na deambulação do animal.

Frente às ações deflagradas pela estimulação elétrica, merecem destaque os cuidados quanto à aplicação desta técnica terapêutica considerando-se a forma e duração do pulso utilizado, tipo de contração utilizada para estimular o músculo, a força de contração induzida, número de contrações produzidas por período de tratamento, a duração de cada contração, o tempo de repouso entre

as contrações e o número de sessões diárias ou semanais (HERBISON et al., 1978).

Tem sido relatada a existência de relações funcionais entre a frequência de estimulação elétrica e a captação/metabolismo de substratos energéticos (RADDA, 1996; DUPONT, 2003). Neste sentido, tem sido sugerido que concomitante à elevação na atividade contrátil induzida pela estimulação elétrica, às fibras musculares passam a apresentar aumento na sensibilidade à insulina, elevação na síntese de glicogênio e mobilização das reservas energéticas celulares (WOJTASZEWSKI et al., 1999).

De uma maneira mais generalizada, o aumento na responsividade tecidual pode ser o responsável pelo aumento na área sob a curva indicado no ITT do grupo estimulado eletricamente, o que nos leva a crer que a estimulação elétrica é um método sensibilizador da musculatura contribuindo para a elevação na remoção e metabolização da glicose pelo tecido submetido à terapia.

Cabe ressaltar que não foram observados alterações no GTT, indicando a existência de respostas adaptativas na interface do processo secretório da insulina e a população de receptores, possivelmente para evitar a instalação de um quadro hipoglicêmico, uma vez que, mesmo frente a elevação na remoção da hexose, não foram observados valores glicêmicos fora dos padrões normoglicêmicos.

Ao avaliarmos o comportamento do conteúdo de glicogênio da musculatura esquelética imobilizada e submetida à estimulação elétrica, verificamos elevação nas reservas glicogênicas reiterando a proposta acima descrita e sugerindo que a elevação na frequência contrátil além de modificar as dinâmicas musculares de remoção de glicose também sensibiliza as vias citosólicas, favorecendo a

translocação do transportador de glicose Glut4 de reservatórios até a membrana celular, favorecendo um maior *uptake* da hexose além de elevar a sensibilidade tecidual à insulina e favorecer a formação de reservas glicogênicas (IHLEMANN *et al.*, 2000). Um segundo fator a se considerar é que a corrente elétrica com frequência de 10 Hz utilizada neste estudo pode ter tido ação mais seletiva sobre o músculo sóleo, pois esta é a frequência de maior responsividade dos motoneurônios das fibras musculares lentas ou tipo I, que caracterizam o este músculo (SALTIN e GOLLNICK, 1983). Assim, ao compararmos com o controle, o músculo sóleo estimulado encontra-se em melhores condições energéticas sugerindo que há uma hierarquia nas respostas metabólicas que depende do tipo de estímulo aplicado e do tipo de fibra muscular.

Esta melhora nas condições energéticas induzidas pela estimulação elétrica neuromuscular já foi descrita em músculos desnervados (SILVA *et al.*, 1999).

As interleucinas são polipeptídeos que podem ser classificadas em quimoquinas (moléculas que atuam na quimiotaxia das células inflamatórias) e citocinas (atuam diretamente sobre as células inflamatórias). As diferentes interleucinas podem ser divididas em pró (estimulam) ou anti (inibem) inflamatórias. Foi descrito um grande número de interleucinas, porém, entre as citocinas mais estudadas temos a interleucina 1 β (IL-1 β), interleucina 6 (IL-6), fator de necrose tumoral α (TNF- α) como representantes das pró-inflamatórias e a interleucina 8 (IL-8) ou a interleucina 10 (IL-10) como anti-inflamatórias (KELLER *et al.*, 2001, HIBI *et al.*, 1996).

No que tange as relações entre a homeostasia do músculo esquelético e as citocinas, é sabido que há elevação na produção de citocinas pró-

inflamatórias, em especial a IL-6, associado à lesão tecidual ou em atividade física de alta intensidade (KELLER et al., 2001). Neste sentido, nossos resultados revelam que na fase inicial da imobilização houve uma expressiva elevação na concentração plasmática da IL-6, que pode estar associado a diferentes fatores ligados a imobilização, como por exemplo, um possível comprometimento na homeostasia energética das fibras musculares (FEBBRAIO e SALTIN, 2003).

Neste perfil de análise, observamos que a estimulação elétrica em músculos imobilizados promoveu uma expressiva elevação na concentração plasmática de IL-6. É conhecido que frente à redução nas reservas glicogênicas, a literatura aponta produção e liberação de IL-6, no entanto, é sugestivo que a elevação na atividade muscular também seja responsável pela elevação na concentração plasmática desta citocina acompanhando diversos estudos (GRIMBLE, 2003, RONSEN et al., 2002; PEDERSEN et al., 2001, GLEESON e BISHOP, 2000, HOTAMISLIGIL, 1999).

As relações entre a concentração plasmática de IL-6 e o exercício físico foram recentemente estudadas sendo sugerido que a IL-6 pode participar do controle de vias metabólicas melhorando a disponibilidade de substratos metabolizáveis (PEDERSEN et al, 2003). Neste contexto, tem sido descrito novos mecanismos de ação ligados a IL-6 no tecido muscular, demonstrando que esta citocina pode incitar a translocação do transportador Glut4, elevando a captação de glicose mediada pela atividade contrátil e, dessa forma, favorecer a formação de reservas energéticas (STOUTHARD et al. 1996, PEDERSEN et al., 1997, ONO et al., 2007). Ressalta-se ainda o fato da IL-6 promover a síntese protéica e ativar a formação de fatores de crescimento insulínicos (GLEESON, 2000). Estas

ações podem fazer parte de um conjunto de sistemas precocemente ativados quando ocorre alteração tecidual.

No conjunto de ação das citocinas, observa-se que a concentração de $\text{TNF-}\alpha$ também foi elevada e pode ter relação com mudanças na homeostasia das células musculares, as quais elevam a formação desta citocina tipicamente pro-inflamatória em situações de drásticas mudanças funcionais, como já descrito, em condições de sobrecarga metabólica gerada pela imobilização ou pelo exercício físico, ou ainda pode-se sugerir que a $\text{TNF-}\alpha$ enquanto citocina iniciante da resposta inflamatória promova a liberação de outras citocinas como a IL-6 (LIN, CALVANO e LOWRY, 2000). Por fim, verificamos que a concentração plasmática da IL-10 também apresentou elevação em decorrência da estimulação elétrica e pode ser justificado pela integração funcional que existe entre as interleucinas, onde concomitante a elevação na produção/liberação da IL-6 há elevação na produção da IL-10 (STARKIE et al., 2003).

CONCLUSÃO

O estudo mostra que a estimulação elétrica neuromuscular é uma ferramenta importante na manutenção das condições energéticas da musculatura submetida à imobilização, apresentando mecanismos multifatoriais que convergem tanto para a manutenção do equilíbrio energético quanto no favorecimento da recuperação do tecido em desuso. Considerando o pleiotropismo das citocinas, outros estudos devem ser realizados para fornecer uma maior compreensão da participação das citocinas nas alterações metabólicas advindas da imobilização e da eletroestimulação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AAS, V., TORBLA, S., ANDERSEN, M.H., JENSEN, J. & RUSTAN, A.C. Electrical stimulation improves insulin responses in a human skeletal muscle cell models of hyperglycemia. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** v. 967, p. 506-515, 2002.
- APPELL, H. J. Skeletal muscles atrophy during immobilization **Int. J. Sports Med.** v.7, p.1-5, 1986.
- ASP, S., KRISTIANSEN, S., RICHTER, E.A. Eccentric muscle damage transiently decreases rat skeletal muscle GLUT-4 protein. **J. Appl. Physiol.** v.79, p.833-841, 1995.
- AQUINO, C. F., VIANA, S. O., FONSECA, S. T. Comportamento biomecânico e resposta dos tecidos biológicos ao estresse e a imobilização. **Fisioterapia em movimento.** v.18, n.2, p.35-43, 2005.
- BASSET, C.A.L.; PAWLUK, R.J. Electrical behavior of cartilage during loading. **Science**, v.178 p. 982-986, 1972.
- BOOTH, F.W., KELSO, J.R. Effect of hind-limb immobilization on contractile and histochemical properties of skeletal muscle. **Plurgers Arch.** v.342, p.231-338, 1973.
- BOOTH, F.W., SNEIDER, M.J. Recovery of skeletal muscle protein synthesis after limb immobilization of rats. **J. Appl. Physiol.** v.47, p.974-977, 1979.
- BOYES, G., JOHNSTON, J. Muscle fiber composition of rat vastus intermedius following immobilization at different muscle lengths. **Pfluegers Arch. Eur. J. Physiol.** v.381, p.195-200, 1979.
- BRUUNSGAARD, H., GALBO, H., HALKJAER-KRISTENSEN, J., JOHANSEN, T.L., MACLEAN, D.A., PEDERSEN, B.K. Exercise-induced increase in serum

interleukin-6 in humans is related to muscle damage. **J Physiol.** v.299, pp.833-841, 1997.

CHAN, C.B., DE LEO, D., JOSEPH, J.W., MCQUAID, T.S., HA X.F., XU, F., TSUSHIMA, R.G., PENNEFATHER, P.S., SALAPATEK, A.M., WHEELER, M.B. Increased uncoupling protein-2 levels in beta-cells are associated with impaired glucose-stimulated insulin secretion: mechanism of action. **Diabetes.** v.50, n.6, p.1302-1310, 2001.

CHAN, S.M.H., CARREY, A.L., WATT, M.J., FEBBRAIO M.A. Cytokine gene expression in human skeletal muscle during concentric contraction: evidence that IL-8, like IL-6, is influenced by glycogen availability. **Am. J. Physiol. Regul Integr. Comp. Physiol.**, v.287, p.322-327, 2004.

CHANTRAINE, A., GOBELET, C., ZILTENER, J.L. Électrologie et applications. **Enycl. Med. Chir.** Elsevier, Paris, France, 26-145-A-10, p.01-23, 1998.

COSTELI, P., CARBÓ, N., TESSITORE, L., BAGBY, G.J., LOPEZ-SORIANO F.J., BACCINO F.M. Tumor necrosis factor-alpha mediates changes in tissue protein turnover in a rat cancer cachexia model. **J Clin Inves.**, v.92, p.2783-2789, 1993.

COUTINHO, E. L., GOMES, A. R., FRANÇA, C. N., SALVINI, T. F. A new model for the immobilization of the rat hind limb. **Braz. J. Med. Biol. Res**, v.35, p.1329-1332, 2002.

DIDYK, R.B., ANTON, E.E., ROBINSON, K.A., MENICK, D.R., BUSE, M.G. Effect of immobilization on glucose transporter expression in rat hindlimb muscles. **Metabolism**, v. 43, n.11, p.1389-1394, 1994.

DUPONT, S. A. C., RICHMOND, F. J. & LOEB, G. E. Prevention of muscle disuse atrophy by low-frequency electrical stimulation in rats. **IEEE Trans Neural Syst. Rehabil. Eng.** v.3, p.218-26, 2003.

EDGERTON, V. R. BARNARD, R. J. PETER, J. B. MAIER, A. & SIMPSON, D. R. Properties of immobilized hind-limb muscle of the *galago senegalensis*. **Exp. Neurol.** v. 46, p. 115-131, 1975.

EDSTROM, L. Selective atrophy of red muscle fibers in the quadriceps in long-standing knee-joint dysfunction injuries in the anterior cruciate ligament. **J. Neurol. Sci.** v.11, p.551-558, 1970.

FEBBRAIO, M., SALTIN, B. Searching for the exercise factor: is Il-6 a candidate? **J. Muscle Res. Cell Motil.** v.24, p.113-119, 2003.

FERRANDO, A. A., LANE, H. W., STUART, A. A., DAVIS-STREET, J., WOLFE, R.R. Prolonged bed rest decreases skeletal muscle and whole body protein synthesis. **Am. J. Physiol.** v.270, p.627-633, 1996.

FORTI, F., GUIRRO, R. R. J., SILVA, C. A. Efeitos da glutamina e da estimulação elétrica sobre o perfil metabólico de músculos desnervados. **Revista Brasileira de Educação Física e Esporte** v.18, n.3, p.273-281, 2004.

FRANCH, J., ASLESEN, R., JENSEN, J. Regulation of glycogen synthesis in rat skeletal muscle after glycogen-depleting contractile activity: effects of adrenaline on glycogen synthesis and activation of glycogen synthase and glycogen phosphorylase. **Biochem. J.** v. 344, p. 231-235, 1999.

GILES, K.W. & MYERS, A. An improved diphenylamine method for the stimulation of deoxyribonucleic acid. **Nature**, v. 206, p. 93-99, 1965.

GLEESON M. Interleukins and exercise (perspectives). **J. Physiol.** v.529, p.1-3, 2000.

GLEESON, M. & BISHOP, N. C. Special feature for the Olympics: effects of exercise on the immune system: modification of immune responses to exercise by carbohydrate, glutamine and anti-oxidant supplements. **Immunol. Cell Biol.** v.78, p.554-561, 2000.

GILES, K.W. & MYERS, A. An improved diphenylamine method for the stimulation of deoxyribonucleic acid. **Nature**, v. 206, p. 93-99, 1965.

GOBATTO, C.A. **Metabolismo glicídico em músculo sóleo isolado de ratos desnutridos e recuperados. Efeitos dos ácidos graxos livres e do treinamento físico.** Campinas, SP, 1997, (tese de Doutorado, Instituto de Biologia, UNICAMP).

GRIMBLE, R.F. Inflammatory response in the elderly. **Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.** v.16, p.21-29, 2003.

GUIRRO, R. R. J.; DIAS, C. K. N.; SILVA, C. A. Imobilização altera o conteúdo de glicogênio e peso muscular de acordo com o período e a posição articular. **Revista Brasileira de Fisioterapia.** v.9, n.2, p.173-179, 2005.

HALAR, E. M.; KATHLEEN, R. B. Imobilidade. In: DeLISA, J. A., et al. **Tratado de Medicina e Reabilitação: Princípios e práticas**, São Paulo Manole, 2ªed., vol. 2, 1067-1087, 2002.

HADDAD, D.F., ZALDIVAR, F., COOPER, D.M., ADAMS, G.R. IL-6 induced skeletal muscle atrophy. **J. Appl. Physiol.**, v.98, p.911-917, 2005

HERBISON, G. J. JAWEED, M. M.,DITUNNI, J. F. Muscle fiber atrophy after cast immobilization in the rat. **Arch. Phys. Med. Rehabil.** v.59, p.301-305, 1978.

HERRERA, M. N. J. R., ZIMMERMAN, A. N., DYKSTRA, D. D., THOMPSON, L. V. Clenbuterol in the prevention of muscle atrophy: a study of hindlimb-unweighted rats. **Arch. Physiol. Med. Rehabil.** v.82, p.930-934, 2001.

HIBI, M., NAKAJIMA, K. & HIRANO, T. IL-6 cytokine family and signal transduction: a model of the cytokine system. **J. Mol. Med.** v.74, p.1-12, 1996.

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, n.6, p.1235-1241, 2000.

HOTAMISLIGIL, G. S. The role of TNF and TNF receptors in obesity and insulin resistance. **J. Int. Med.** v.245, p.621-625, 1999.

HUDLICKA, O, DODD, L., RENKIN, E.M. & GRAY, S.D. Early changes in fiber profile and capillary density in long-term stimulated muscle. **Am. J. Physiol.** v. 243, n. 4, p. 528-535, 1982.

IBEBUNJO, C. & MARTYN, J.,A . Fiber atrophy, but not changes in acetylcholine receptor expression, contributes to the muscle dysfunction after immobilization. **Crit. Care Med.** v. 27, n. 2, p. 275-285,1999.

IHLEMANN, J., PLOUG, T., HELLSTEN, Y. & GALBO, H. Effect of stimulation frequency on contraction-induced glucose transport in rat skeletal muscle. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.** v.279, p.862-867, 2000.

JAFFE, L. F. & STERN, C.D..Strong electric currents leave the primitive streak of early chick embryos. **Science**, v. 206, p. 569-571, 1979.

JAFFE, D. M; TERRY, R. D. & SPIRO, A. J. Disuse atrophy of skeletal muscle. A morphometric study using image analysis. **J. Neurol. Sci.** v. 35, p. 189-200,1978.

JÄRVINEN, T.A.H., LÁSZLO, J., KANNUS, P., JÄRVINEN, T.L.N. JÄRVINEN, M. Organization and distribution of intramuscular connective tissue in normal and immobilized skeletal muscles. **J. Muscle Res. Cell Motility.** v. 23, p. 245-254, 2002.

JONSDOTTIR, I.H., SCHJERLING, P., OSTROWSKI, K., ASP, S., RICHTER E.A., PEDERSEN, B.K. Muscle contractions induce interleukin-6 mRNA production in rat skeletal muscles. **J. Physiol.** v.528, p.157-163, 2000.

KELLER, C., STEENSBERG, A., PILEGAARD, H., OSADA, T., SLTIN, B., PEDERSEN, B.K., NEUFER P.D. Transcriptional activation of the IL-6 gene in human contracting skeletal muscle: influence of muscle glycogen content. **Faseb J.** v.15, p.2748-2750, 2001

KOKUBUM, E. **Interações entre o metabolismo de glicose e ácidos graxos livres em músculos esqueléticos. Efeito do exercício e estado alimentar.** São Paulo, 1990, (Tese de Doutorado, Instituto de Ciências Biomédicas, USP).

LEE, Y.H.; RAH, J.H.; PARK, R.W.; PARK, C.I. The effect of early therapeutic electrical stimulation on bone mineral density in the paralyzed limbs of the rabbit. **J. Yonsei Med.** v. 42, n. 2, p. 194-198, 2001.

LIN, E., CALVANO, S.E., LOWRY, S.F. Inflammatory cytokines and cell response in surgery. **Surgery**, v.127, p.117-126, 2000.

LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.T. Protein measurement with the folinphenol reagent. **J. Biol. Chem.** v. 193, p. 265-275, 1951.

MALDOVEANU, A.I., SHEPARD R.J., SHEK P.N. The cytokine response to physical activity and training. **Sports Med.** v.31, n.2, p.115-144, 2001.

MATHEWS, J.N.S. et al. Analysis of serial measurements in medical research. **Brit. Med. J.** v.27, n.6719, p.230-235, 1990.

MCDUGALL, J. D.; ELDER, G. C. B.; SALE, D. C.; MOROZ, J. R. & SUTTON, J. R. Effects of strength training and immobilization on human muscle fibers. **Eur. J. Appl. Physiol.** v.43, p.25-34, 1980.

MELA, V., VELTINK, P. H., HUIJING, P. A. Excessive Reflexes in Spinal Cord Injury Triggered by Electrical Stimulation. **Arch. Physiol. Biochem.** v.109, n.4, p.309-315, 2001.

NOGUEIRA, D.M., STRUFALDI, B., HIRATA, M.H. et al. Sangue-parte I: Glicídios. In:_____et al. **Métodos de bioquímica clínica**. São Paulo: Pancast, 1990. p.153-168.

OLHSSON, K., BJORKIS P., BERGENFELDT M., HAGEMAN R., THOMPSON R.C. Interleukin-1 receptor antagonist reduces mortality from endotoxin shock. **Nature**, v.348, p.550-552, 1990.

ONO, T., MAEKAWA, K., WATANABE, S., OKA, H., KUBOKI, T. Muscle contraction accelerates IL-6 mRNA expression in the rat masseter muscle. **Arch. Oral Biol.** v.52, p.479-486, 2007.

PEDERSEN, B.K., STEENBERG, A., FISCHER, C., KELLER, C., PLOMGAARD, P., FEBBRAIO, M., SALTIN, B. Searching for the exercise factor: is IL-6 a candidate? **J. Muscle Res. Cell Motil.** v.24, p.113-119, 2003.

PEDERSEN, B.K., OSTROWSKI, K., ROHDE, T., BRUUNSGAARD, H. The cytokin response to strenuous exercise. **Can. J. Physiol. Pharmacol.** v.76, p.505-511, 1998.

PEDERSEN, B.K., STEENBERG, A., SCHJERLING P. Muscle-derived interleukin-6: possible biological effects. **J. Physiol.** v.536, p.329-337, 2001.

PICQUET, F.; FALEMPIN, M. Compared effects of hind limb unloading versus terrestrial differentiation on muscular properties of the rat soleus. **Exp. Neurol.** v.182, p.164-186, 2003.

PLOUG T, OHKUWA T, HANDBERG A, VISSING J, GALBO H. Effect of immobilization on glucose transport and glucose transporter expression in rat skeletal muscle. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.** v.268, p.980-986, 1995.

QUIN, L., APPLELL, H. J., CHAN, K. M. & MAFFULLI, N. Electrical stimulation prevents immobilization atrophy in skeletal muscle of rabbits. **Arch. Phys. Med. Rehabil.** v.5, p.512-517, 1997.

REARDON, K. A., FRACP, B. S., DAVIS, J., KAPSA, R. M. I., CHOONG, P.; FRACS, M. D. & BYRNE, E. Myostatin, insulin-like growth factor-1, and leukemia inhibitory factor Mynas are up-regulated in chronic human disuse muscle atrophy. **Muscle & Nerve.** v.24, p.893-899, 2001.

ROBINSON, A. J., SNYDER-MACKLER, L. Eletrofisiologia Clínica 2ªed. Porto Alegre (RS), **Artmed Editora**, 2001.

RONSEN, O., LEA, T., BAHR, R., PEDERSEN, B.K. Enhanced plasma IL-6 and IL-1ra responses to repeated vs. single bouts of prolonged cycling in elite athletes. **J. Appl. Physiol.** v.92, p.2547-2553, 2002.

SALTIN B., GOLLNICK P.D. Skeletal muscle adaptability: Significance for metabolism and performance. in: PEACHEY L.D., ADRIAN R.H., GEIGER S.R. Handbook of physiology section 10: Skeletal muscle. **The Willians & Wilkins Company**, Baltimore, 1983.

SAKAKIMA, H., YOSHIDA, Y., SAKAE, K., MORIMOTO, N. Different frequency treadmill running in immobilization induced muscle atrophy and ankle joint contractura of rats. **Scand. J. Med. Sci Sports**, v. 14, p. 186-192, 2004.

SAKATA, T., HALLORAN, B.P., MUNSON, S.J., RUDNER, L.; VENTON, L., GINZINGER, D., ROSEN, C.J., BIKLE, D.D. Skeletal unloading induces

resistance to insulin-like growth factor I on bone formation. **Bone**, v. 32, n. 6, p. 669-680, 2003.

SEKI, K., TANIGUCHI, Y., NARUSAWA, M. Effects of joint immobilization on firing rate modulation on human motor units. **J. Physiol.** v. 530, p. 507-519, 2001.

SHIIBA, M., ARNAUD, S.B., TANZAWA, H., KITAMURA, E., YAMAUCHI, M. Regional alterations of type I collagen in rat tibia induced by skeletal unloading. **J. Bone Miner. Res.** v. 17, n. 9, p. 1639-1645, 2002

SESTI, G., Pathophysiology of insulin resistance. **Best. Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.** v.20, n.4, p.665-679, 2006.

SILVA, C. A., GUIRRO, R. J., POLACOW, M. L. O., SILVA, H. C., TANNO, A. P., RODRIGUES, D. Efeito da metformina e eletroestimulação sobre as reservas de glicogênio do músculo sóleo normal e desnervado. **Revista Brasileira de Fisioterapia**, v.3, n.2, p.55-60, 1999.

SILVA, C.A., GUIRRO, R.R.J, POLACOW, M.L.O., DURIGAN, J.L.Q. Proposal for rat hindlimb joint immobilization: orthosis with acrylic resin model. **Br. J. Med. Biol. Res.** v.39, p.979-85, 2006.

SIMONNEAU, J. A., LORTIE, G., BOULAY, M. R., MARCOTTE, M., THIBAUT, M. C. & BOUCHARD, C. Effects of two-intestine intermittent training programs interspaced by detraining on human skeletal muscle performance. **Eur. J. Appl. Physiol.** v. 56, p. 516-521, 1987.

SIU, L.O., RUSSEAU, J.C., TAYLOR, A.W. Determination of glycogen in small tissue samples. **J. Appl. Physiol.** v.28, n.2, p.234-236, 1970.

SKÖLD, C. Effects of Functional Electrical Stimulation Training for Six Months on Body Composition and Spasticity in Motor Complete Tetraplegic Spinal Cord Injury. **J. Rehabil. Med.** v.34, p.25-32, 2002.

SNYDER, A.C. Overtraining and glycogen depletion hypothesis. **Med. Sci. Sports Exercise**, v.30, n.7, p.1146-1150, 1998.

STARKIE, R., OSTROWSKI, S.R., JAUFFRED, S., FEBBRAIO, M., PEDERSEN, B.K. Exercise-IL-infusion inhibits endotoxin-induced TNF- α production in humans. **Faseb J.** v.17, p.884–896, 2003.

STEIN, T.P., SCHULTER, M.D., BODEN, G. Development of insulin resistance by astronauts during spaceflight. **Aviat. Space Environ. Med**, v.65, p.1091-1096, 1994.

STOUTHARD, J.M., ROMIJN, J.A., VAN DER POLL, T., ENDERT, E., KLAIN, S., BAKKER, P.J., VEENHOF, C.H., SAUERWEIN, H.P. Endocrinologic and metabolic effects of interleukin-6 in humans. **Am. J. Physiol.** v.268, p.813-819, 1995.

SUNDERLAND, S. **Nerves and Nerve Injuries**, 2nd ed. Edinburgh, Churchill Livingston, 1978.

TANAKA T, KARIYA Y, HOSHINO Y. Histochemical study on the changes in muscle fibers in relation to the effects of aging on recovery from muscular atrophy caused by disuse in rats. **J. Orthop. Sci.** v.9, p.76-85, 2004.

TISDALE M.J. Loss of skeletal muscle in cancer: biochemical mechanisms. **Front Biosci.**, v.6, p.164-174, 2001.

TREBACZ, H. & PIKUS, S. A study of mineral phase in immobilized rat femur: structure refinements by Rietveld analysis. **J. Bone Miner. Metab.** v. 21, n. 2, p. 80-85, 2003.

TSUJINAKA T., FUJITA J., EBISUI C., YANO M., KOMINAMI E., SUZUKI K., TANAKA K., KATSUME A., OHSUGI Y., SHIOSAKI H., MONDEN M. Interleukin-6

receptor antibody inhibits muscle atrophy and modulates proteolytic systems in interleukin-6 transgenic mice. **J Clin Invest.** v.97, p.244-249, 1996.

ULLUN H., HAAIR P.M., DIAMANT M., PALMO J., HALKJAER-KRISTENSEN J., KLARLUND PEDERSEN, B. Bicycle exercise enhances plasma IL-6 but does not change IL-1a, IL-1b, IL-6 or TNF-a pre-mRNA in BMNC. **J Appl Physiol.** v.77, p.93-97, 1994.

VANDERTHOMMEN, M., CRIELAARD, J.M. Électromyostimulation en médecine du sport. **Rev. Med. Liege**, v.56, n.5, p.391-395, 2001.

WAKIM, K.G. & KRUSEN, F.H. The influence of electrical stimulation on the work output and endurance of denervated muscle. **Arch Phys Med Rehabil.** v. 36, p. 370-381, 1955. WILLIAMS, P. E. & GOLDSPINK, G. Changes in sarcomere length and physiological properties of immobilized muscle. **J. Anat.** v. 127, p. 459-468, 1978.

WILLIAMS PE, GOLDSPINK G. The effect of immobilization on the longitudinal growth of striated muscle fibers. **J. Anat.** v.116, n.45-55, 1973.

WOJTASZEWSKI, J.P.F., HIGAKI, Y., HIRSHMANN, M.F., MICHAEL, M.D., DUFRESNE, S.D., KAHN, C.R., GOODYEAR, L.J. Exercise modulates postreceptor insulin signaling and glucose transport in muscle-specific insulin receptor knockout mice. **J. Clin. Invest.** v.104, n.9, p.1257-1264, 1999.

YOSHIDA, N., SAIRYO, K., SASA, T., FUKUNAGA, M., KOGA, K., IKATA, T. & YASUI, N. Electrical stimulation prevents deterioration of the oxidative capacity of disuse-atrophied muscle in rats. **Aviat Space Environ Med.** v. 74, n. 3, p. 207-211, 2003.

ZHONGGUO, X. &, CHONG, F. Effect of eletrical stimulation on denervated skeletal muscle. **Wai Ke Za Zhi.** v. 17, n. 5, p. 396-399, 2003.

Estudo 3

AJUSTES METABÓLICOS NO MÚSCULO SÓLEO IMOBILIZADO E SUBMETIDO À ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA NEUROMUSCULAR.

Souza, M.Z.¹, Luciano, E.², Chingui, L. J.¹, Silva, C.A¹.

¹ Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade Metodista de Piracicaba

² Instituto de Biociências da Universidade Estadual paulista - Unesp

Endereço para correspondência:

Marcial Zanelli de Souza
Rua dos Crisântemos 277
Bairro: Nova Piracicaba
CEP: - Piracicaba - SP
Fone (19) 34130755
e-mail: mzanelli@unimep.br

Runnig title: “Ação da estimulação elétrica no músculo sóleo imobilizado”

Palavras chave: Músculo esquelético, Imobilização, estimulação elétrica.

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar o perfil quimio-metabólico do músculo sóleo de ratos após dois dias de imobilização monosegmentar e submetido à estimulação elétrica. Ratos albinos wistar provenientes do biotério da UNESP – Rio Claro foram mantidos em condições em biotério recebendo ração e água à vontade sob ciclo fotoperiódico de 12h claro/escuro, sendo distribuídos em 4 grupos experimentais com n=6: controle, estimulado eletricamente por 2 dias, imobilizados por 2 dias e imobilizados e eletroestimulados por 2 dias. Após anestesia (pentobarbital sódico, 50mg/kg,i.p), a pata posterior esquerda dos animais foi imobilizada com o modelo de órtese de resina acrílica. Para estimulação elétrica, os ratos foram anestesiados e submetidos ao protocolo de estimulação elétrica: estimulação por 2 dias por 20 minutos, com corrente elétrica quadrática bifásica, 10 Hz, 0.4 ms, 5.0 mA). Após o período experimental, os animais foram anestesiados e uma amostra de sangue foi coletada da veia renal sendo direcionada para avaliação bioquímica da concentração plasmática de ácidos graxos livres e da enzima creatina quinase através de kit de aplicação laboratorial. A seguir foi coletado o músculo sóleo para determinação do conteúdo de glicogênio pelo método do fenol sulfúrico e a glândula supra-renal para avaliação do conteúdo de ácido ascórbico. Na avaliação estatística foi aplicado o teste de normalidade seguido da análise variância (ANOVA) e teste de Tukey ($p < 0,05$). Os resultados mostram que a imobilização promoveu redução no conteúdo de glicogênio e na relação PT/DNA e elevação na concentração plasmática de creatina quinase (CK). A estimulação elétrica induziu elevação nas reservas glicogênicas do músculo sóleo normal e imobilizados, não modificou a relação proteína total/DNA dos músculos normais, porém, preservou a redução

desta relação apresentada nos músculos imobilizados e promoveu ainda a diminuição na concentração plasmática de CK classicamente observada na imobilização. Além destes fatores, observou-se que a concentração plasmática da interleucina 6 foi elevada no grupo imobilizado, sofrendo elevação adicional na presença da estimulação elétrica. A concentração plasmática de ácido ascórbico da glândula supra-renal não foi modificada pela estimulação elétrica, foi reduzida na imobilização e apresentou elevação no grupo imobilizado e eletroestimulado. Por fim, a concentração plasmática de ácidos graxos livres foi elevada no grupo imobilizado e no grupo estimulado eletricamente. Vale salientar que no grupo imobilizado estimulado eletricamente às concentrações foram menores. Os resultados mostram que a estimulação elétrica protegeu o músculo sóleo dos eventos desencadeados pela hipotrofia induzida pela imobilização deixando o músculo em melhores condições metabólicas.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the chemical metabolic profile of the soleus muscle of rats after two days of mono-segmental immobilization and electrical stimulation. Albino Wistar rats, provided by the animal facility of UNESP – Rio Claro, were maintained in vivarium conditions with food and water *ad libitum*, submitted to 12-hour photoperiodic cycles of bright/dark, and distributed into 4 experimental groups with n=6: control, electrotimulated for 2 days, immobilized for 2 days, and immobilized and electrostimulated for 2 days. After anesthesia (sodium pentobarbital, 50mg/Kg), the posterior left paw of the animals was immobilized with an acrylic resin orthosis model. To realize electrical stimulation, the rats were anesthetized and submitted to the electrostimulation protocol: 20 minutes daily for two days, biphasic quadratic pulse, 10Hz, 0.4 ms, 5.0 mA. After the experimental period, the animals were again anesthetized and blood samples were collected from the renal vein in order to evaluate the plasmatic concentration of free fatty acids and creatine kinase enzyme by means of a laboratorial kit. After this, the animals were sacrificed and the soleus muscle was collected to evaluate its glycogen content through the phenol-sulfuric acid method and the suprarenal gland to determine its ascorbic acid content. During statistical evaluation, the normality test, the variance analysis (ANOVA), and the Tukey test ($p<0,05$) were applied. The results showed that the immobilization promoted a reduction of the glycogen content and in the PT/DNA ratio, while an elevation in the plasmatic concentration of creatine kinase (CK) was also observed. The electrical stimulation induced an elevation of the glycogen reserves for both the control and immobilized soleus muscles, but it did not modify the PT/DNA ratio in the normal muscle. It also

prevented the reduction of this ratio for the immobilized muscle and promoted a decrease in the plasmatic concentration of CK, which is commonly observed in an immobilization scenario. Besides these factors, it was also observed that the plasmatic concentration of interleukin 6 was elevated in the immobilized and after electrical stimulation groups. The plasmatic concentration of ascorbic acid from the suprarenal gland was not altered by the electrical stimulation, it was reduced by immobilization and increased in the immobilization and electrostimulation group. Also, the plasmatic concentration of free fatty acids was elevated in both the immobilized group and electrostimulated group. Its worth mentioning that in the immobilized and electrostimulated group the concentration was lesser in value. The results indicate that the electrical stimulation protected the soleus muscle from the events unchained by hypotrophy due to immobilization, in this manner leaving the muscle in better metabolic conditions.

INTRODUÇÃO

A imobilização é um recurso freqüentemente utilizado na prática ortopédica, visando, sobretudo, a restrição de um segmento corporal para sua proteção em situações de fragilização e/ou para possibilitar que os processos de reparação possam restabelecer as relações anátomo-fisiológicas após traumatismos ou patologias específicas.

É sabido que o desuso induzido por inúmeros fatores desencadeia uma série de alterações adaptativas nos sistemas orgânicos que se traduzem na perda de massa muscular com declínio na geração de força, desenvolvimento de hipotrofia e perda funcional comprometendo o tempo de retorno do indivíduo às suas atividades normais (REARDON, et al. 2001).

Diversos estudos que avaliam o desuso têm contribuído na elucidação das alterações metabólicas presentes na imobilização muscular sendo demonstrado que concomitante ao processo de hipotrofia muscular há o desenvolvimento de resistência à insulina, redução na atividade da proteína IRS-1, redução na atividade da enzima Akt e comprometimento na expressão de diversas proteínas, reduzindo a efetividade da sinalização insulínica. Estudos que merecem destaque focalizaram a imobilização utilizando modelos de suspensão do membro, efeitos do vôo espacial, neurectomia, isolamento da medula espinhal e a imobilização monosegmentar (EDGERTON et al., 2002, MUSSACHIA et al., 1988; EDGERTON et al., 2002; COUTINHO et al., 2002; SILVA et al., 2006).

Independentemente do modelo de desuso avaliado, há concordância de que a redução da massa muscular ocorre em decorrência da redução da síntese protéica e aumento na proteólise (URSO, 2006). Vale a pena considerar que a hipotrofia é uma condição que acompanha muitas situações catabólicas tais

como as relatadas no diabetes mellitus, processos cancerígenos, septicemias, inanição, inatividades e hipocinesias (PALMA et al., 2007). A perda da massa muscular está diretamente associada à redução da qualidade de vida e ao aumento na morbidade e mortalidade e sua ocorrência pode representar mobilização, no intuito de gerar substratos energéticos na manutenção das funções vitais.

A estimulação elétrica funcional dos músculos é um recurso amplamente utilizado no campo da fisioterapia que tem propiciado a minimização dos efeitos deletérios secundários que ocorrem em situações de privação da atividade contrátil como no músculo esquelético imobilizado e até no desnervado. Tais benefícios estão relacionados à elevação na força e resistência (WAKIN e KRUSEN;1955), redução na fibrose mantendo as fibras em melhores condições metabólicas (ZHONGGUO e CHONG, 2003 , SILVA et al., 1999, POLACOW et al., 2002) e ativação de sistemas celulares que permitem a elevação na captação de substratos energéticos (AAS et al., 2002).

Dentre os inúmeros sistemas celulares que são ativados em decorrência da estimulação elétrica, temos a integração entre a dinâmica metabólica e as vias sinalizadoras celulares, com a ativação ou inibição de vias específicas mantendo o músculo um tanto mais ativo e saudável (ROBINSON E SNYDER-MACKLER, 2001).

Muitos cientistas têm avaliado as ações da estimulação elétrica em modelos experimentais que comprometem a dinâmica contrátil das fibras, sendo demonstrados os efeitos benéficos para o músculo *in situ* ou na regeneração de tecidos biológicos (SUNDERLAND, 1978; JAFFE e STERN, 1979). Considerando os efeitos esperados pela utilização terapêutica da estimulação elétrica

neuromuscular, vale destacar os cuidados quanto a parâmetros de sua aplicação, levando-se em conta a forma e duração do pulso utilizado; o tipo de contração utilizada para estimular o músculo; a força de contração induzida; o número de contrações produzidas por período de tratamento; a duração de cada contração; o tempo de repouso entre as contrações e o número de sessões diárias ou semanais (HERBISON et al., 1978).

Há tempo tem-se descrito que a hipotrofia é um processo com especificidade para cada tipo de músculo, no entanto, tem sido relatado que as fibras do tipo I (fibras de contração lenta) possuem menor adaptação em relação às fibras do tipo II (fibras de contração rápida), sendo conseqüentemente as mais afetadas pelo desuso. Conceitos adicionais foram inseridos indicando que os músculos cuja ação funcional seja anti-gravitacional, responderão com maior grau de hipotrofia em situações de inatividade, sendo o sóleo um dos mais acometidos em situações de desuso do membro inferior, por ser predominantemente constituído por fibras do tipo I (TALMADGE, 2002, KASPER 2002, TANAKA et al., 2004).

Neste contexto, o estudo da hipotrofia muscular focalizando os ajustes quimio-metabólicos associado à terapia de estimulação elétrica se reveste de fundamental importância para o desenvolvimento de condutas terapêuticas e/ou preventivas visando à saúde global do indivíduo. Assim, o objetivo deste trabalho foi determinar aspectos do perfil quimio-metabólico do músculo sóleo de ratos na fase aguda da imobilização quando submetido à estimulação elétrica.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados ratos albinos *Wistar* com 3 meses de idade, fornecidos pelo Biotério da UNESP de Rio Claro, sendo alimentados com ração (Purina®

para roedores) e água *ad libitum*, submetidos a ciclos foto periódicos de 12h claro/escuro e distribuídos em 4 grupos experimentais com n=6, a saber: controle (C), estimulado eletricamente por 2 dias (E), imobilizados por 2 dias (I2) e imobilizados e eletroestimulados por 2 dias (IE2). Após anestesia com pentobarbital sódico (50mg/kg,i.p), a pata posterior esquerda dos animais foi imobilizada com o modelo de órtese de resina acrílica proposto por Silva et al. (2006) como pode ser observado na figura 1. Após cada período experimental, os animais foram novamente anestesiados e uma amostra de sangue foi coletadas da veia renal, sendo direcionada para avaliação bioquímica da concentração plasmática de interleucina 6, ácidos graxos livres e da enzima creatina quinase através de kit de aplicação laboratorial. A seguir foram coletados o músculo sóleo para determinação do conteúdo de glicogênio pelo método do fenol sulfúrico (SIU et al., 197) e a glândula supra-renal direcionada a análise do conteúdo de ácido ascórbico pelo método proposto por Mindlin e Butler (1938).

Os grupos experimentais submetidos à estimulação elétrica neuromuscular foram anestesiados para a execução do protocolo experimental que consistiu de estimulação diária por 20 minutos, por um período de 2 dias. A corrente elétrica utilizada foi uma quadrática bifásica, com a frequência estabelecida de 10 Hz, largura de fase de 0.4 ms, com amplitude de partida padronizada em 5.0 mA, a partir da visualização da contração muscular (CHANTRAINE, GOBELET, ZILTENER, 1998). A cada 5 minutos aplicou-se um acréscimo de 1.0 mA à amplitude para evitar-se a acomodação. O equipamento utilizado para a estimulação elétrica neuromuscular foi o Dualpex 961 e 2 eletrodos de silicone-carbono com 1 cm² cada (figura 2), posicionados na região

inguinal e no tríceps sural respectivamente. Em todos os procedimentos, os animais foram tratados de acordo com o Guide for Care use of Laboratory Animals (National Research Council, 1996).

Na avaliação estatística foi aplicado o teste de normalidade (Kolmogorov-Smirnov) seguido da análise variância (ANOVA) e teste de Tukey, com nível de significância de 5%.

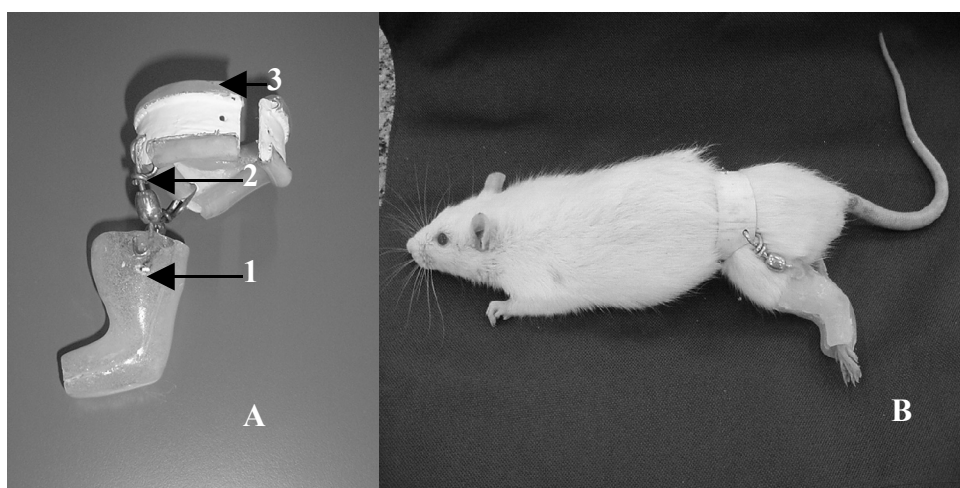


Figura 1. Em (A) observa-se a órtese de resina acrílica composta de uma bota de acrílico (1), rotadores (2) e cinta abdominal (3). Em (B) pode-se observar a órtese adaptada ao corpo do rato mantendo a articulação do tornozelo na posição de 90°.

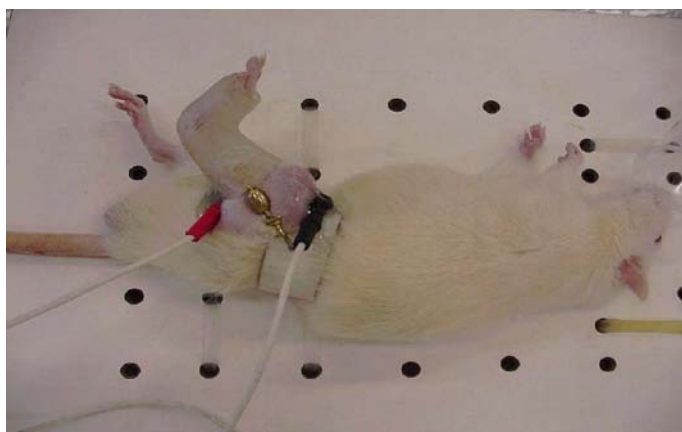


Figura 2. Posicionamento de eletrodos durante a sessão de estimulação elétrica.

RESULTADOS

Há tempo tem sido relatado que a eficiência do processo contrátil tem relações diretas com o padrão energético das fibras musculares, havendo uma intensa relação entre a performance e o metabolismo dos carboidratos, considerando-se que, o constante suprimento de glicose, deve ser regulado de acordo com a demanda. Desta forma, o aumento do trabalho muscular é acompanhado da ativação de várias reações bioquímicas que são essenciais para a manutenção das condições energéticas e estruturais.

Na avaliação das reservas glicogênicas do músculo sóleo normal (E) foi verificado que o período de dois dias de estimulação elétrica foi eficiente em induzir elevação de 28% no conteúdo, no entanto, no mesmo período, foi observado que os músculos imobilizados (I2) apresentaram redução de 36% nas reservas se comparado ao músculo controle. Por outro lado, quando o músculo imobilizado foi submetido à estimulação elétrica (IE2) foi observado elevação significativa de 28% nas reservas indicando melhores condições metabólicas se comparado ao imobilizado não estimulado (figura 3).

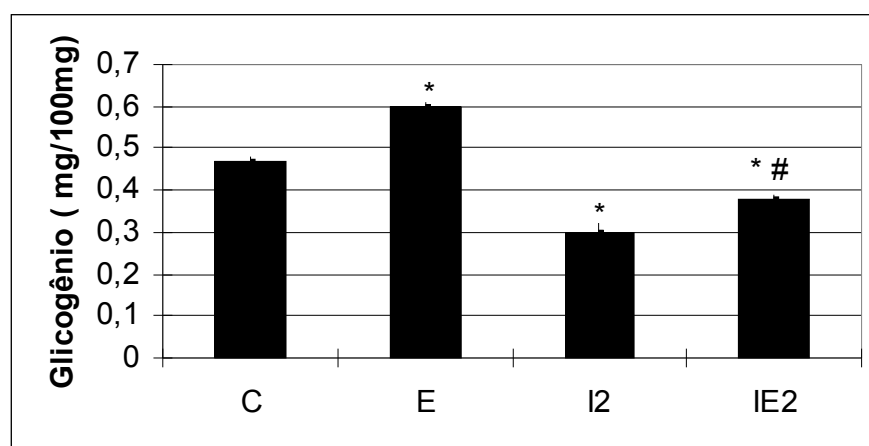


Figura 3. Conteúdo de glicogênio (mg/100mg) do músculo sóleo (S) imobilizado (I), estimulado eletricamente (E) e imobilizados estimulados eletricamente (IE). Os valores correspondem à

média $\pm$ epm, n=6. *p<0,05 se comparado ao controle e # p<0,05 se comparado ao I2.

Na análise da relação proteína total/DNA do músculo sóleo, realizada nas mesmas condições experimentais, foi observado que a estimulação elétrica não modificou os parâmetros sendo representado por valores similares ao controle, ou seja, 137,8 $\pm$ 14,5mg/100mg no grupo controle (C) e 121,7 $\pm$ 10mg/100mg no grupo estimulado eletricamente (E). Por outro lado, no grupo imobilizado (I2) a relação PT/DNA foi reduzida em 23,8% quando as concentrações passaram para 105,9 $\pm$ 11mg/100mg. É importante salientar que quando a estimulação elétrica foi aplicada nos músculos imobilizados (IE2) não houve modificação neste parâmetro sendo representados por 110 $\pm$ 20mg/100mg como mostra a figura 4.

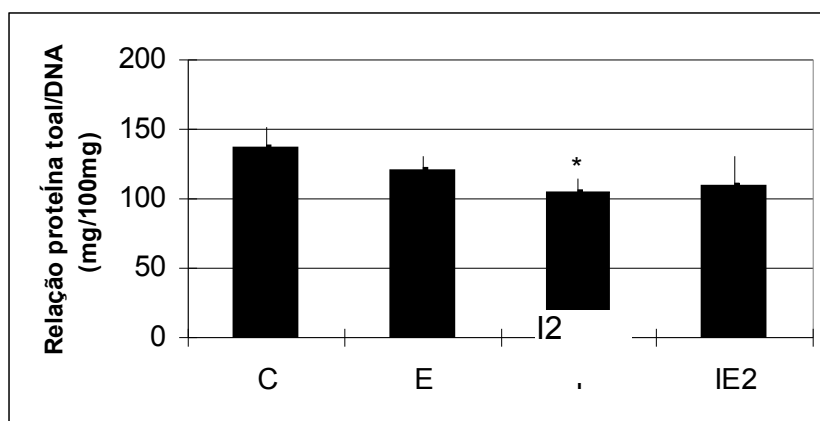


Figura 4. Valor da média $\pm$ epm da razão proteína total/DNA (mg/100mg) nos músculos sóleo dos grupos controle (C), estimulados eletricamente (E), imobilizado por 2 dias (I2) e imobilizados por 2 dias e estimulados eletricamente (IE2), n = 6, *P<0,05 comparado ao controle.

Na literatura científica tem sido descrito parâmetros eficientes na detecção de degeneração muscular sendo amplamente utilizado a avaliação da concentração plasmática de creatina quinase (CK). Neste sentido, pode-se observar na figura 5 que a estimulação elétrica não modificou as concentrações plasmáticas dessa enzima, sendo observado $218 \pm 3,5$ U/L no grupo controle (C) e $215 \pm 4,3$ U/L no grupo estimulado eletricamente (E). No grupo submetido à imobilização (I2) houve elevação de 7% ($233 \pm 1,3$ U/L), indicando uma possível proteólise. Por outro lado, no grupo imobilizado submetido à estimulação elétrica (IE2) foi observado redução de 4% ($225 \pm 1,4$ U/L) na concentração da CK se comparado ao I2.

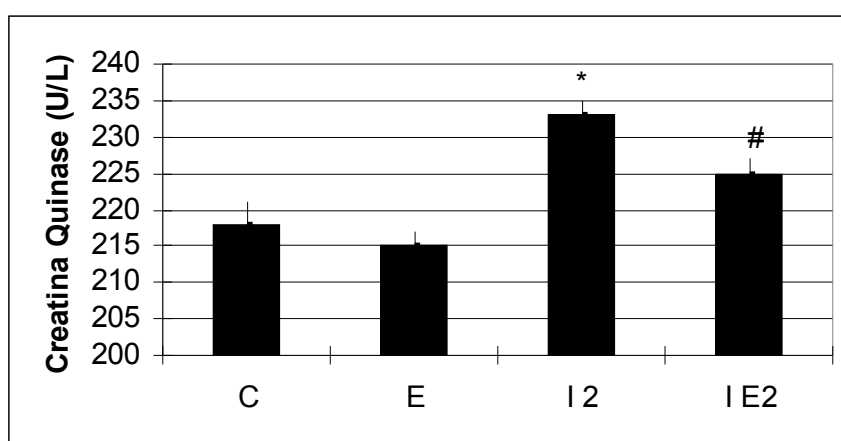


Figura 5. Concentração plasmática de creatina quinase (U/L) de ratos controle (C), estimulados eletricamente (E), imobilizados 2 dias (I2) e imobilizados estimulados eletricamente 2 dias (IE2). Os valores estão expressos como média $\pm$ epm, $n=60$, * $p<0,05$ se comparado ao controle e # $p<0,05$ se comparado ao I2.

A seguir passou-se a avaliar a concentração plasmática da interleucina 6 (figura 6), sendo observado uma elevação significativa de 146% se comparado ao controle, (C: 259 ± 13 pg/mL) após 2 dias de imobilização (I2: 638 ± 24 pg/mL) ($p<0,05$). Nesta fase experimental analisou-se também o efeito da estimulação

elétrica (E) sobre este parâmetro, sendo verificado valores 26% maiores em relação ao controle, atingindo $327 \pm 4.4 \text{ pg/mL}$. Por outro lado, ao compararmos o grupo IE2 com o grupo I2, verificamos que no grupo IE2 as concentrações foram 25% significativamente maiores atingindo a concentração de $795 \pm 33 \text{ pg/mL}$.

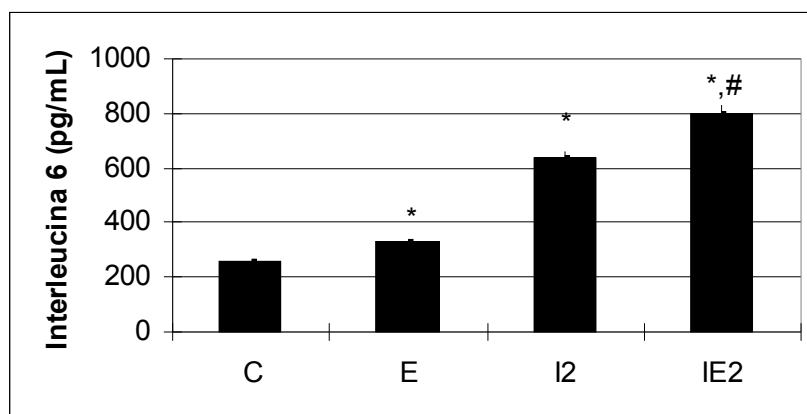


Figura 6. Concentração plasmática da interleucina IL-6 (pg/mL) dos grupos controle (C), eletroestimulado por 2 dias (E), imobilizados por 2 dias (I2) e imobilizados e eletroestimulados por 2 dias (IE2). Os valores correspondem à média $\pm$ epm, $n=6$. * $p<0,05$ se comparado ao controle e # $p<0,05$ se comparado ao I2.

Na busca de compreender se o desuso estaria desencadeando reações estressoras passou-se a avaliar a concentração de ácido ascórbico da glândula supra-renal e pode ser observado na tabela 1 que a estimulação elétrica (E) não promoveu alteração neste índice, no entanto, no grupo submetido a imobilização (I2) houve redução de 12%, fato que foi minimizado em 7% na presença da eletroterapia (IE2).

Por fim, foi avaliada a concentração plasmática de ácidos graxos livres (tabela 1), e pode-se observar que concomitante a imobilização (I2) houve elevação significativa de 31%, evento também observado no grupo estimulado eletricamente (IE2) quando a concentração atingiu valores 21% maiores. Vale

salientar ainda no grupo imobilizado e estimulado eletricamente (IE2) observou-se concentrações 14% menores em relação ao o grupo I2.

Tabela 1. Concentração plasmática de ácidos graxos livres (mmol/L) e ácido ascórbico da glândula supra-renal ($\mu\text{g}/100\text{mg}$) de ratos controle (C), estimulados eletricamente por 2 dias (E), imobilizados por 2 dias (I2) e imobilizados e eletroestimulados por 2 dias (IE2). Os valores correspondem à média $\pm$ epm, n=6. *P<0,05 se comparado ao controle e #p<0,05 se comparado ao grupo imobilizado (I2).

	C	E	I2	IE2
Ácido ascórbico ($\mu\text{g}/100\text{mg}$)	2,50 $\pm$ 0,07	2,45 $\pm$ 0,08	2,22 $\pm$ 0,03*	2,33 $\pm$ 0,03*#
Ácido graxo livre (mmol/L)	0,38 $\pm$ 0,01	0,46 $\pm$ 0,01*	0,50 $\pm$ 0,03*	0,43 $\pm$ 0,02*#

DISCUSSÃO

Na literatura científica há resultados contraditórios que descrevem graus diferenciados de susceptibilidade à hipotrofia muscular e relações funcionais diferenciadas de acordo com o tipo de fibra muscular e o local em que esta se encontra (MCCONELL e KINGWELL, 2006).

Alguns estudos têm sugerido que as alterações mais evidentes da atrofia ocorrem nos dias iniciais do desuso indicando a possibilidade de haver certa temporização nas alterações da homeostasia das fibras musculares quando submetidas à imobilização (APPELL 1986, HADDAD et al. 2003). Nesse sentido entende-se que os maiores comprometimentos homeostáticos ocorrem na fase inicial do desuso de forma que à medida que a situação torna-se crônica, o declínio das funções metabólicas ocorre de forma progressiva (APPELL, 1990).

O presente estudo iniciou-se avaliando o conteúdo do glicogênio muscular, uma vez que, esta reserva é marcadora tanto das condições energéticas quanto da condição de performance do músculo esquelético (SESTI, 2006). Ao se avaliar as reservas glicogênicas do músculo sóleo observa-se que o desuso promoveu uma redução significativa, assim, deve-se considerar que o músculo sóleo (composto por 84% de fibras tipo I) possui uma população maior de receptores de insulina, e concomitante a imobilização manifesta diminuição na sensibilidade insulínica. Assim, acompanhamos estudos que sugerem que nos primeiros dias da imobilização, já há significativa redução na população dos receptores insulínicos, comprometimento da cascata sinalizadora da insulina principalmente no que se refere às vias citosólicas ligadas à síntese de glicogênio, redução na população do Glut4, podendo predispor ao quadro de resistência à insulina e concomitante redução nas reservas glicogênicas (NICHOLSON et al.1984; HIROSE et al., 2000).

Uma vez que a proposta foi estudar a integração funcional do músculo imobilizado com a aplicação de um método fisioterapêutico, a estimulação elétrica foi selecionada por se tratar de um procedimento rotineiramente utilizado nessa prática. Inicialmente, avaliou-se o perfil do conteúdo de glicogênio da musculatura esquelética normal e imobilizada submetida à estimulação elétrica e verificou-se elevação nas reservas glicogênicas em ambas as condições. Isto mostra que, a elevação na frequência contrátil modifica as dinâmicas musculares de captação de glicose, sugerindo sensibilização nas vias citosólicas que favorecem a translocação do transportador de glicose Glut4 de reservatórios até a membrana, favorecendo a elevação na captação da hexose, além de elevar a

sensibilidade tecidual à insulina direcionando-a ao reservatório de glicogênio (PLOUG et al. 1995).

Um fator importante a se considerar é que as amostras teciduais foram coletadas de 3-4 horas após a finalização das sessões, sugerindo que há um efeito residual potencializador da formação desta reserva energética, uma vez que tem sido relatada elevação na sensibilidade tecidual à insulina por 18 horas findada a terapia, fato que estaria predispondo ao fenômeno de supercompensação (AAS, 2002).

Tem sido relatada a existência de relações funcionais entre a frequência do estímulo e a captação/metabolismo de substratos energéticos. Neste sentido, tem sido sugerido que concomitante à elevação na atividade contrátil induzida pela estimulação elétrica, às fibras musculares passam a apresentar aumento na sensibilidade à insulina, elevação na síntese de glicogênio e mobilização das reservas energéticas celulares (GUIRRO et al., 2004).

Uma vez que o desuso muscular predispõe a um estado catabólico da musculatura esquelética passou-se a avaliar a relação proteína total/DNA do músculo sóleo, sendo observado que no segundo dia de imobilização havia redução do peso, o que pode ter relações com a redução na síntese protéica simultânea à elevação na proteólise (Di PRAMPERO e NARICI, 2003; FERRANDO et al., 1996; AQUINO et al., 2005).

Alguns pontos a este respeito merecem destaque, como por exemplo, o fato de que as medidas de proteína muscular e DNA terem sido freqüentemente utilizadas em diferentes estudos para indicar tamanho e número de células em um tecido, de forma que, a concentração de DNA indica número de células ao passo que razões proteína/DNA são índices de tamanho celular (ALBANES et al., 1990, WINICK, et al., 1996, CHEN et al., 2007).

Neste sentido, o desenvolvimento de hipotrofia no músculo esquelético depende do balanço entre a taxa de síntese e degradação das proteínas e pode ser analisado através da quantificação do DNA e proteínas totais referendando nosso método de análise (KIMBALL, VARY e JEFFERSON, 1994).

Em 1986, Appell sugeriu que o decréscimo mais pronunciado do diâmetro das fibras ocorre durante a primeira semana de imobilização e em estudos realizados com animais e com tempos de imobilização variáveis, foi demonstrado que as fibras tipo I são as que apresentam sinais mais evidentes de hipotrofia, fato que pode ser atribuído à redução da atividade das enzimas oxidativas. Este fato corrobora com nosso estudo uma vez que a imobilização promoveu redução na relação proteína total/DNA indicando hipotrofia seguida de proteólise, porém, demonstramos que a perda de massa possa ser um evento precoce e ligado diretamente às fases iniciais do desuso.

Mesmo exibindo uma forte ação sobre a mobilização das reservas energéticas não se observou alteração na razão proteína total/DNA em decorrência da estimulação elétrica se comparada ao grupo imobilizado, indicando que se trata de uma terapia com forte ação preferencial no perfil energético das fibras. No entanto, podemos inferir também que a eletroestimulação utilizada precocemente pode contribuir na minimização da proteólise, se considerarmos que, no grupo eletroestimulado, não houve redução significativa em relação ao grupo controle, contrapondo-se ao fenômeno visualizado no grupo imobilizado. Assim, sugerimos que o padrão de eletroestimulação utilizado em nosso estudo pode ter tido uma ação seletiva sobre o músculo sóleo, considerando que a frequência de 10 hz utilizada se aproxima da frequência de maior responsividade de despolarização do

motoneurônio do músculo do tipo I (SALTIN e GOLLNICK, 1983) que caracteriza o sóleo.

Um índice indicativo da lesão na massa muscular é a elevação na concentração circulante da enzima creatina quinase (CK). Neste sentido foi observado que concomitante com o desuso houve uma forte elevação neste índice indicando que se trata de reações agudamente ativadas, reforçando nossa hipótese da precocidade nas alterações que acompanham o processo catabólico.

Com relação à estimulação elétrica, observou-se que esta terapia não modificou o perfil de músculos normais, no entanto, promoveu redução na concentração plasmática de creatina quinase que se encontrava elevada pela imobilização acompanhando a proposta que retrata o seu valor para tratar hipotrofia decorrente da imobilização (VANDERTHOMMEN e CRIELAARD, 2001).

Ainda se referindo aos efeitos benéficos da estimulação elétrica, devemos considerar que apesar desta técnica não substituir a ação fisiológica dos fatores neurotróficos, sua adoção mostra ser uma estratégia com ação aditiva na recuperação sensório-motora. Tais efeitos credencia a eletroestimulação para ser utilizada em casos de fraqueza muscular, distensão muscular, incontinência, elevação ou perda do tônus muscular e no desuso muscular (MELA, et al., 2001; SKÖLD et al, 2002).

Dentre os diferentes estudos realizados utilizando-se a estimulação elétrica, destaca-se a utilização no músculo esquelético desnervado, onde a terapia trouxe inúmeros benefícios relacionados à elevação na força e resistência e redução na fibrose mantendo as fibras em melhores condições metabólicas (SILVA et al., 1999; POLACOW et al., 2003; ZHONGGUO e CHONG, 2003), bem

como a ativação de sistemas celulares que permitem a elevação na captação de substratos energéticos (AAS et al., 2002; HAMADA et al., 2004).

No que tange as relações entre o equilíbrio energético do músculo esquelético e as citocinas, é sabido que concomitante a lesão tecidual há elevação na produção de interleucina 6 (IL-6), fato que corrobora com nosso estudo onde demonstramos elevação significativa na concentração plasmática desta citocina já no segundo dia da imobilização e que pode estar relacionada com o desenvolvimento de lesão nas fibras musculares. Outro aspecto importante da elevação da IL-6 foi a relação dessa citocina com o desenvolvimento da proteólise muscular verificado por Haddad et al. em 2004.

Este aumento na produção da IL-6 induzido por lesão já foi descrito em atividade física de alta intensidade (KELLER et al., 2001). Por outro lado, outros estudos conseguiram demonstrar a dissociação na relação IL-6 e lesões nas fibras musculares, demonstrando que o aumento da IL-6 estaria mais relacionado com a atividade contrátil do que com a ocorrência de lesões (FEBBRAIO e PEDERSEN, 2002). Em nosso estudo, este comportamento pode ser visto, considerando que a eletroestimulação produziu a redução na geração de CK no grupo imobilizado e eletroestimulado (IE2), enquanto que, no grupo apenas imobilizado, os níveis de IL-6 estavam expressivamente elevados ($P < 0,05$). Esse aumento pode estar relacionado com o estímulo da regeneração das fibras musculares por estimulação das células satélites como visto por Vitello et al. (2004) e/ou fazer parte do processo de turnover das proteínas musculares como demonstrado por Jonsdottir et al. (2000). Relacionando o aumento na concentração de IL-6 com o padrão metabólico, destacamos que concomitante a imobilização houve redução na reserva de glicogênio, indicando redução na

atividade insulínica, sendo conhecido que este fator tem reflexo na geração de energia afetando a atividade contrátil. Febbraio e Pedersen (2002) já haviam descrito que a depleção do glicogênio muscular seria o sinalizador para a glicogenólise hepática via IL-6 produzida pelo músculo. Assim, nosso estudo acompanha a literatura que tem sido descrito elevação na liberação de IL-6 pelo tecido muscular quando as reservas energéticas ficam comprometidas (RONSEN et al., 2002).

No músculo imobilizado foi observado diminuição na razão proteína total/DNA indicando a instalação de um estado catabólico que se intensifica após 48h do desuso, neste sentido sabe-se que IL-6 direta ou indiretamente media estados catabólicos e pode estar sendo gerada para melhorar as condições quimio-metabólicas do músculo em desuso (GRIMBLE, 2003).

Diversos estudos demonstraram as relações entre a concentração plasmática de IL-6 e a intensidade do exercício físico sendo descrito que, a elevação na concentração plasmática de IL-6 está associada à lipólise (RONSEN et al. 2003, WALLENIUS et al., 2002). Neste sentido, observamos que frente à imobilização houve elevação significativa na concentração plasmática de ácidos graxos livres acompanhando a flutuação na concentração plasmática da IL-6, indicando que a integração funcional ocorre precocemente e a IL-6 participa do controle de vias metabólicas melhorando a disponibilidade de substratos metabolizáveis (PEDERSEN et al, 2003).

A elevação da IL-6 pode também ter influenciado na redução do ácido ascórbico da adrenal, considerando que esta interleucina pode ativar o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, resultando na maior disponibilidade do ácido ascórbico para a geração de corticosteróides (FEBBRAIO e PEDERSEN, 2003).

Por outro lado, quando a eletroestimulação foi utilizada, houve uma melhora dos níveis do ácido ascórbico em relação ao grupo apenas imobilizado, o que pode ser reflexo da melhor condição muscular obtida pela atividade contrátil eletricamente induzida.

Um ponto a se ressaltar é que a estimulação elétrica que induziu elevação na concentração plasmática de IL-6, pode ocorrer pelo aumento na atividade contrátil como observado em animais também por ONO et al. (2007) e em indivíduos sob atividade física, podendo participar dos ajustes metabólicos, dos sistemas envolvidos na degradação e síntese protéica e na ativação da formação de fatores de crescimento insulínicos (GLEESON e BISHOP, 2000, GERRIT et al., 2003).

CONCLUSÃO

Os resultados deste trabalho indicam a importância da estimulação elétrica na manutenção das condições energéticas do músculo imobilizado e resalta a importância da geração da IL-6 precocemente e de forma simultânea ao requerimento de substratos energéticos e ao processo de reparo tecidual.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- APPELL, H.J. Muscular atrophy following immobilization. A review. **Sports Med.** v.10, n.1, p.42-58,1990.
- APPELL, H. J. Skeletal muscles atrophy during immobilization. **Int. J. Sports Med.** v.7, p. 1-5, 1986.
- AAS, V., TORBLA, S., ANDERSEN, M. H., JENSEN, J. e RUSTAN, A.C. Electrical stimulation improves insulin responses in a human skeletal muscle cell models of hyperglycemia. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** v.967, p.506-515, 2002.

CHANTRAINE A., GOBELET C., ZILTENER J.L. Électrologie et applications.

Enycl. Med. Chir. Elsevier, Paris, France, 26-145-A-10, p. 01-23, 1998.

CHEN, Y.W., GREGORY, C.M., SCARBOROUGH, M.T., SHI, R., WALTER, G.A., VANDENBORNW, K. Transcriptional pathways associated with skeletal muscle disuse atrophy in humans. **Physiol Genommsics**, v.14, n.31(s3), p.510-520, 2007.

COUTINHO, E. L., GOMES, A. R., FRANÇA, C. N., SALVINI, T. F. A new model for the immobilization of the rat hind limb. **Braz. J. Med. Biol.Res**, v.35, p.1329-1332, 2002.

EDGERTON, V.R., ROY, R.R., ALLEM, D.L., MONTI, R.J. Adaptations in skeletal muscle disuse or decreased-use atrophy. **Am J Phys Med Rehabil**. v.81, n.11, p.127-47, 2002.

GLEESON, M. e BISHOP, N. C. Special feature for the Olympics: effects of exercise on the immune system: modification of immune responses to exercise by carbohydrate, glutamine and anti-oxidant supplements. **Immunology and Cell Biology**, v.78, p.554-561, 2000.

GERRIT, V., STEENSBERG, T.H.E., SACCHETTO, M., FISHER, C., KELLER, C., SCHJERLING, P., HISCOCK, N., MOLLER, K., SALTIN, B., FEBBRAIO, M.A., PEDERSEN, B.K. Interleukin-6 stimulates lipolysis and fat oxidation in humans. **J. Clin Endocrinol Metab**. v.88, n.7, p.3005-3010, 2003.

GRIMBLE, R.F. Inflammatory response in the elderly. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**. v.16, n.21-29, 2003.

FORTI, F., GUIRRO, R. R. J., SILVA, C. A. Efeitos da glutamina e da estimulação elétrica sobre o perfil metabólico de músculos desnervados. **Rev. Bras. Edu. Fis. Esp**. v.18, n.3, p.273-281, 2004.

HADDAD D.F., ZALDIVAR F., COOPER D.M., ADAMS G.R. IL-6 induced skeletal muscle atrophy. **J. Appl. Physiol.**, v.98, pp.911-917, 2005.

Haddad F, Roy RR, Zhong H, Edgerton VR, Baldwin KM. Atrophy responses to muscle inactivity. II molecular markers of protein deficits. **J Appl Physiol.** v.95 n.2, p.791-802, 2003.

HERBISON, G. J. JAWOED, M. M.; DITUNNI, J. F. Muscle fiber atrophy after cast immobilization in the rat. **Arch. Phys. Med. Rehabil.** v.59, p.301-305, 1978.

JAFFE, L. F. e STERN, C.D..Strong electric currents leave the primitive streak of early chick embryos. **Science**, v.206, p.569-571, 1979.

KASPER, C.E., TALBOT, L.A., GAINES, J.M. Skeletal muscle damage and recovery. **AACN Clin Issues**, v.13, n.2, p.237-247, 2002.

McCONNELL, G.K., KINGWELL, B.A. Does nitric oxide regulate skeletal muscle glucose uptake during exercise? **Exerc Sport Sci Rev.** v.34, n.1, p.36-41, 2006.

MINDLIN, R.L., BUTLER, A.M. The determination of ascorbic acid. A micromethod. **J. Biol. Chem.** v.122, p.673-686, 1938.

ONO, T., MAEKAWA, K., WATANABE, S., OKA, H., KUBOKI, T. Muscle contraction accelerates IL-6 mRNA expression in the rat masseter muscle. **Arch. Oral Biol.** p.479-486, 2007.

PALMA, L.D., MARINELLI, M., PAVAN, M., ORAZI, A. Ubiquitin ligases MuRF1 and MAFbx in human skeletal muscle atrophy: **Joint Bone Spine**, p.212-222, 2007.

PEDERSEN, B.K., STEENBERG, A., FISCHER, C., KELLER, C., PLOMGAARD, P., FEBRARIO, M., SALTIN, B. Searching for the exercise factor: is IL-6 a candidate? **J. Muscle Res Cell Motil.** v.24, p.113-119, 2003.

POLACOW, M. L. O.; SILVA, C. A.; GUIRRO, R. J.; CAMPOS, M. R.; BORGES, J. P. Estudo morfométrico do músculo sóleo denervado de ratos tratados pela associação de metformina e estimulação elétrica. **Rev. Bras. Fisiot.**, v. 7, n. 1, p.57-64, 2003.

REARDON, K. A.; FRACP, B. S.; DAVIS, J.; KAPSA, R. M. I.; CHOONG, P.; FRACS, M. D., BYRNE, E. Myostatin, insulin-like growth factor-1, and leukemia inhibitory factor Mynas are up-regulated in chronic human disuse muscle atrophy. **Muscle e Nerve**. v.24, p.893-899, 2001.

ROBINSON A. J.; SNYDER-MACKLER L. **Eletrofisiologia Clínica**, 2ºed. Porto Alegre (RS), Artmed Editora, 2001.

RONSEN, O., LEA, T., BAHR, R., PEDERSEN, B.K. Enhanced plasma IL-6 and IL-1ra responses to repeated vs. single bouts of prolonged cycling in elite athletes. **J. Appl Physiol**. v.92, p.2547-2553, 2002.

SESTI, G. Pathophysiology of insulin resistance. *Best. Pract. Cattles. Clin. Endocrinol. Metab.* v.20, n.4, p.665-679, 2006.

SILVA, C. A.; GUIRRO, R. J; POLACOW, M. L. O.; SILVA H. C; TANNO A. P.; RODRIGUES, D. Efeito da metformina e eletroestimulação sobre as reservas de glicogênio do músculo sóleo normal e desnervado. **Rev. Bras. Fisiot.** v.3, n.2, p.55-60, 1999.

SILVA, C.A., GUIRRO, R.R.J., POLACOW, M.L.O., DURIGAN, J.L.Q. Proposal for rat hindlimb joint immobilization: orthosis with acrylic resin model. **Braz. J. Med. Biol. Res.** v.39, p.979-85, 2006.

SIU, L.O., RUSSEAU, J.C., TAYLOR, A.W. Determination of glycogen in small tissue samples. **J Appl Physiol**. v.28, n.2, p.234-236, 1970.

SUNDERLAND, S. **Nerves and Nerve Injuries**, 2nd ed. Edinburgh, Churchill Livingston, 1978.

TALMADGE, R.J. Mechanical properties of rat soleus after long-term spinal cord transection. **J Appl Physiol**.v.93, n.4, p.1487-1497, 2002.

TANAKA, T., KARIYA, Y., HOSHINO, Y. Histochemical study on the changes in muscle fibers in relation to the effects of aging on recovery from muscular atrophy caused by disuse in rats. **J Orthop Sci**. v.9, p.76-85, 2004.

URSO, M.L., ANGUS, G.S., YI-WEN, C., THOMPSON, P.D., CLARKSON, P.M. Analysis of human skeletal muscle after 48h immobilization reveals alterations in mRNA and protein for extracellular matrix components. **J.Appl.Physiol** v.101, p.1136-1148, 2006.

WAKIM, K.G., KRUSEN, F.H. The influence of electrical stimulation on the work output and endurance of denervated muscle. **Arch Phys Med Rehabil**. v. 36, p. 370-381, 1955.

WALLENIUS, V., WALLENIUS, K., AHRÉN, B., RUDLING, M., CARLSTEN, H., DICKSON, S.L., OHLSON, C., JANSSON, J.O. Interleukin-6-deficient mice develop mature-onset obesity. **Nat Med**. v.8, p.75-79, 2002.

6. COMENTÁRIOS E CONSIDERAÇÕES GERAIS

A manutenção das condições energéticas do músculo esquelético é extremamente importante para o equilíbrio homeostático e depende de um suprimento constante associado à eficiência de sistemas transmembrânicos responsáveis pela captação de substratos metabolizáveis (JURCZAK et al., 2007). Uma atenção especial deve ser direcionada ao conteúdo de glicogênio, uma vez que, estas reservas podem interferir na performance, ou seja, quando elevadas podem melhorar a resistência, porém, quando depletadas podem participar dos processos associados à fadiga muscular (BACURAU, 2001; SHULMAN & ROTHMAN, 2000, SESTI, 2006).

Dentre os hormônios que participam da regulação e modulação do padrão metabólico, a insulina é extremamente importante, visto que, as vias sinalizadoras fazem parte de uma cascata de amplificação de sinais que tem início após a ligação da molécula ao receptor, desencadeando eventos intracelulares por vias distintas ligadas ao sistema IRS, uma das quais tem expressão na atividade da enzima PI3-K, nos processos ligados a síntese protéica e de glicogênio e na translocação dos transportadores GLUT4 para a membrana celular (KOBAYASHI et al., 2006).

Hirose et al. (2000) estudaram a via sinalizadora da insulina em ratos que tiveram a pata imobilizada por fixação do joelho e tornozelo a 90° durante sete dias, e verificaram redução na transdução do sinal insulínico, sugerindo déficit na ativação do receptor de insulina e nas enzimas ativadas a partir deste, incluindo a fosforilação do IRS-1 (substrato 1 do receptor de insulina) e a ativação da PI3-K, sugerindo que o quadro de resistência à insulina também pode ser desencadeado na imobilização. Essa alteração na dinâmica de sinalização da insulina pode explicar os resultados deste estudo, onde foi observado que há redução nas reservas de glicogênio já no segundo dia do desuso e, pode estar relacionado com uma possível redução na interface entre os mecanismos ativados pela via insulínica e o padrão contrátil da musculatura como postulado por Ploug et al. (1995). Cabe salientar que frente a redução na sensibilidade insulínica desenvolve-se a curto prazo o quadro de resistência que apresenta caráter multifatorial diferindo quanto ao tempo da imobilização, posição articular, atividade eletromiográfica e tipo de fibra muscular analisada.

Nossos resultados mostram que a imobilização provoca uma expressiva redução nas reservas glicogênicas e corrobora com a hipótese de expressão multifatorial no controle metabólico da musculatura esquelética acrescentando o fato desta alteração ter manifestação precoce.

É sabido que a regulação protéica nos músculos é produto da relação síntese/degradação que é finamente regulado por inúmeros fatores neurais, endócrinos autócrinos e parácrinos (ZDANOWICZ e TEICHBERG, 2003).

Além das reservas energéticas serem afetadas, a relação PT/DNA também foi comprometida pela imobilização do membro. Neste sentido, é importante destacar que na década de 80, foi descrito que o decréscimo mais

pronunciado no diâmetro das fibras ocorre durante a primeira semana de imobilização e que as fibras tipo I são as que apresentam sinais mais evidentes de hipotrofia, sugerindo que tal fato ocorra devido à redução da atividade das enzimas oxidativas (Appell, 1986). Dentro desta abordagem nosso estudo se reveste de grande importância ao demonstrar que as alterações quimio-metabólicas desencadeadas na musculatura imobilizada ocorrem precocemente antecedendo os sete primeiros dias preconizados na literatura.

Tanaka et al. (2004) também associaram o tipo de fibras ao grau de hipotrofia muscular e verificaram que o músculo sóleo possui um maior número de fibras tipo I e sofre mais pela diminuição de estímulo durante a imobilização, devido à menor solicitação das fibras posturais (PLOUG et al., 1995). Recentemente Herrera et al. (2001) estudaram a inatividade muscular em membros posteriores de ratos e observaram que o músculo sóleo hipotrofia mais que os demais, fato que provavelmente esteja relacionado com a composição do tipo de fibra e com a função deste durante a condição normal de descarga de peso.

Acompanhando a proposta, estudamos a aplicação de um método fisioterapêutico, a estimulação elétrica neuromuscular, procedimento rotineiramente utilizado nessa prática para ativar as dinâmicas funcionais da musculatura esquelética imobilizada. A aplicação deste recurso possibilitou a verificação da elevação nas reservas glicogênicas, mostrando que a elevação na frequência contrátil modifica as dinâmicas musculares de captação de glicose, sugerindo sensibilização nas vias citosólicas que favorecem a translocação do transportador de glicose GLUT4 de reservatórios até a membrana, favorecendo a

elevação na captação da hexose, além de elevar a sensibilidade tecidual à insulina (AAS, 2002).

Destacamos ainda a importância da estimulação elétrica neuromuscular na manutenção da homeostasia do músculo esquelético imobilizado uma vez que a análise da sua ação sugere ação anti-catabólica, por impedir as alterações na razão PT/DNA geradas pelo desuso. Estes resultados têm implicações extremamente importantes para os fisioterapeutas ou para qualquer outro profissional que atue em situações de privação ou déficit da mobilidade músculo-esquelética. O conhecimento e o entendimento dessas adaptações permitem que o profissional seja mais efetivo na avaliação do indivíduo e no seu acompanhamento, compreendendo os efeitos fisiológicos da intervenção imposta, proporcionando melhores respostas às suas necessidades individuais.

As informações produzidas por este estudo permitiram o conhecimento de alguns aspectos ligados à participação de algumas citocinas em situações de desuso e de ação contrátil, neste caso, induzida pela eletroestimulação. Considerada de ação pleiotrópica, as citocinas parecem participar de inúmeros fenômenos biológicos relacionados com processos inflamatórios, atividades imunológicas, com a síntese e degradação protéica entre outros. A IL-6, entre outras ações, tem sido apresentada como uma citocina com potencial para induzir a fase aguda da síntese protéica, tanto em ratos quanto em humanos (HEINRICH et al., 1990). As dúvidas que pairavam sobre esta participação da IL-6 referiam-se ao fato de que sua produção poderia ocorrer ou não diretamente pelas células musculares ou se sua síntese seria mediada por sinalizações sistêmicas e ainda se os exercícios físicos ou as contrações musculares poderiam ter influências diretas ou indiretas neste processo. ULLUM et al. (1994)

demonstraram a elevação da concentração sérica da IL-6 detectada em exercícios utilizando o ciclismo enquanto que, BRUUNSGAARD et al (1997) demonstraram aumento significativo da IL-6 circulante em exercícios de alta intensidade, correlacionando a possíveis danos no citoesqueleto, sobretudo nos exercícios excêntricos, que sabidamente produzem maiores lesões musculares (ASP et al. 1995). Em 1998, OSTROWSKI et al., realizando biópsias nos músculos quadríceps de maratonistas, detectaram o RNAm da IL-6 logo após uma competição, o que não ocorreu nas células sanguíneas mononucleares (BMNCs), garantindo que estes achados não seriam influenciados por possíveis contaminações das amostras musculares pelo sangue dos indivíduos. Mais recentemente JONSDOTTIR et al. (2000), conduziram um estudo que contribuiu significativamente para elucidar algumas destas questões. Estudando os efeitos da eletroestimulação muscular associada com contrações concêntricas e excêntricas sobre a síntese do RNAm da IL-6 nos músculos da panturrilha de ratos, estes autores conseguiram demonstrar que o aumento significativo na produção da IL-6 ocorreu independentemente dos tipos de fibras musculares (gastrocnêmio branco, gastrocnêmio vermelho e sóleo) e dos tipos de exercícios, não demonstrando relação com danos musculares potencialmente provocados pelos exercícios excêntricos. Concluíram ainda que esta produção fora local, pois a mesma análise nos músculos contralaterais não demonstrou qualquer aumento significativo na IL-6 e que o estímulo para o aumento da transcrição gênica para a IL-6 não fora geral, visto que não houve a mesma elevação na transcrição gênica para o GLUT-4 nas células estudadas. Em um trabalho atual, ONO et al (2007), estudando a produção da IL-6 pelas contrações musculares eletricamente estimuladas no masseter de ratos, também encontraram elevações

na expressão gênica do RNAm da IL-6 já a partir de 30 minutos de estimulação elétrica, não encontrando a mesma relação significativa na expressão gênica para a IL-1beta, um marcador do processo inflamatório. Desta forma, estes autores puderam concluir que as contrações musculares induzidas pela eletroestimulação provocaram um aumento na expressão gênica da IL-6 pelas células musculares independentemente de qualquer fenômeno inflamatório ou lesional e que quando utilizaram um relaxante muscular de ação local, (Dantrolene Sódico), que bloqueia a liberação de cálcio dos retículos sarcoplasmáticos, a produção da IL-6 reduziu-se significativamente, indicando a potencial participação deste ion como mensageiro intra celular para a expressão gênica da IL-6. No presente estudo, ao observarmos a dissociação das respostas da CK e da IL-6 durante a imobilização e a eletroestimulação, consideramos que estes fenômenos podem ocorrer independentemente, ou seja, a elevação da IL-6 no modelo estudado não demonstrou relações a possíveis danos das fibras musculares, estando relacionada com ajustes no metabolismo energético e no *turnover* das proteínas musculares.

No contexto dos dados e para demonstrar aos resultados apresentamos um quadro sinóptico dos estudos onde os resultados estão organizados permitindo a visualização global das ações.

ESTUDO 1: Participação da interleucina 6 nos ajustes metabólicos desencadeados na fase aguda da imobilização articular. Estudo em ratos.

IMOBILIZAÇÃO		Reservas de glicogênio
SÓLEO Reservas de glicogênio	1º dia	NIHIL
	2º dia	↓ 40%
	3º dia	↓ 60%
GASTROCNÊMIO PORÇÃO BRANCA Reservas de glicogênio	1º dia	↓ 20%
	2º dia	↓ 33%
	3º dia	↓ 56%

CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE INTERLEUCINA - 6	1º dia	↑ 166%
	2º dia	↑ 146%
	3º dia	↑ 146%
CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE ÁCIDOS GRAXOS LIVRES	1º dia	↑ 107%
	2º dia	↑ 35%
	3º dia	↑ 16%
RELAÇÃO PT/DNA DO SÓLEO	1º dia	NIHIL
	2º dia	↓ 27% GB
	3º dia	↓ 30% GB

ESTUDO 2: A utilização da estimulação elétrica neuromuscular na fase aguda da imobilização do tornozelo em 90°. estudo em ratos.

ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA	
Teste de tolerância à insulina (ITT)	↑ Captação de glicose
Teste de tolerância à glicose (GTT)	Não houve modificação
Concentração plasmática de INTERLEUCINA - 6	↑ concentração plasmática
Concentração plasmática de TNF- α	↑ concentração plasmática
Concentração plasmática de INTERLEUCINA - 10	↑ concentração plasmática no terceiro dia
Concentração plasmática de INTERLEUCINA - 4	Não houve modificação

ESTUDO 3: Ajustes metabólicos no músculo sóleo imobilizado e submetido à estimulação elétrica neuromuscular.

	Reservas de glicogênio
SÓLEO IMOBILIZADO 2 DIAS	↓
Relação PT/DNA	↓
Creatina Quinase	↑
ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA	↑ controle e no imobilizado
Relação PT/DNA	Não houve modificação
CREATINA QUINASE	↓

Por fim os resultados possibilitaram concluir que :

1 - A estimulação elétrica promoveu uma maior remoção de glicose plasmática, o que pode refletir na maior sensibilização periférica provocada por este recurso.

2 - O modelo de imobilização e o tipo de corrente elétrica utilizada provocaram maiores respostas no músculo tipo II.

3 - A imobilização e a eletroestimulação são recurso que geram elevação nas concentrações plasmáticas de algumas citocinas como a IL-6 e a TNF- α .

4 - A fase inicial da imobilização muscular é acompanhada de elevação na produção e secreção de interleucina 6, a qual promove mobilização das reservas energéticas dando suporte nutricional aos processos de reparos teciduais. Assim, temos que destacar que estas respostas fisiológicas são precocemente ativadas enquanto o processo de hipotrofia se instala.

5 - A estimulação elétrica neuromuscular é uma ferramenta importante na manutenção das condições energéticas da musculatura submetida ao desuso, apresentando mecanismos multifatoriais que convergem para a manutenção do equilíbrio energético do tecido em desuso.

6 - A estimulação elétrica potencializou a síntese da IL-6, sem provocar danos adicionais na fibra muscular em desuso.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS COMPLEMENTARES

AAS, V., TORBLA, S., ANDERSEN, M. H., JENSEN, J. e RUSTAN, A.C. Electrical stimulation improves insulin responses in a human skeletal muscle cell models of hyperglycemia. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** v.967, p.506-515, 2002.

APPELL, H. J. Skeletal muscles atrophy during immobilization. **Int. J. Sports Med.** v.7, p. 1-5, 1986.

APPELL, H.J. Muscular atrophy following immobilization. A review. **Sports Med.** v.10, n.1, p.42-58,1990.

ASP, S., KRISTIANSEN, S., RICHTER, E.A. Eccentric muscle damage transiently decreases rat skeletal muscle GLUT-4 protein. **J Appl Physiol.**, v.79, p.833-841, 1995.

BRUUNSGAARD, H., GALBO, H., HALKJAER-KRISTENSEN, J., JOHANSEN, T.L., MACLEAN, D. A., PEDERSEN, B. K. Exercise-induced increase in serum interleukin-6 in humans is related to muscle damage. **J Physiol.**, v.299, p.833-841, 1997

CHANTRAINE, A., GOBELET, C., ZILTENER, J.L. Électrologie et applications. **Enycl. Med. Chir.** Elsevier, Paris, France, 26-145-A-10, p. 01-23, 1998.

CHEN, Y.W., GREGORY, C.M., SCARBOROUGH, M.T., SHI, R., WALTER, G.A., VANDENBORNW, K. Transcriptional pathways associated with skeletal

muscle disuse atrophy in humans. **Physiol Genomics**, v.14, n.31(s3), p.510-520, 2007.

COUTINHO, E. L., GOMES, A. R., FRANÇA, C. N., SALVINI, T. F. A new model for the immobilization of the rat hind limb. **Braz. J. Med. Biol. Res**, v.35, p.1329-1332, 2002.

EDGERTON, V.R., ROY, R.R., ALLEM, D.L., MONTI, R.J. Adaptations in skeletal muscle disuse or decreased-use atrophy. **Am J Phys Med Rehabil**. v.81, n.11, p.127-47, 2002.

FORTI, F., GUIRRO, R. R. J., SILVA, C. A. Efeitos da glutamina e da estimulação elétrica sobre o perfil metabólico de músculos desnervados. **Rev. Bras. Edu. Fis. Esp**. v.18, n.3, p.273-281, 2004.

GERRIT, V., STEENSBERG, T.H.E., SACCHETTO, M., FISHER, C., KELLER, C., SCHJERLING, P., HISCOCK, N., MOLLER, K., SALTIN, B., FEBBRAIO, M.A., PEDERSEN, B.K. Interleukin-6 stimulates lipolysis and fat oxidation in humans. **J. Clin Endocrinol Metab**. v.88, n.7, p.3005-3010, 2003.

GLEESON, M. e BISHOP, N. C. Special feature for the Olympics: effects of exercise on the immune system: modification of immune responses to exercise by carbohydrate, glutamine and anti-oxidant supplements. **Immunology and Cell Biology**, v.78, p.554-561, 2000.

GRIMBLE, R.F. Inflammatory response in the elderly. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**. v.16, p.21-29, 2003.

HADDAD, D.F., ZALDIVAR, F., COOPER D.M., ADAMS G.R. IL-6 induced skeletal muscle atrophy. **J. Appl. Physiol.**, v.98, p.911-917, 2005.

- HADDAD, F., ROY, R.R., ZHONG, H., EDGERTON, V.R., BALDWIN, K.M. Atrophy responses to muscle inactivity. II molecular markers of protein deficits. **J Appl Physiol.** v.95 n.2, p.791-802, 2003.
- HEINRICH, P., CASTELL, J.V., ANDUS, T. Interleukin-6 and the acute response. **Biochem J.** v.256, p.621-636, 1990.
- HERBISON, G. J. JAWOED, M. M.; DITUNNI, J. F. Muscle fiber atrophy after cast immobilization in the rat. **Arch. Phys. Med. Rehabil.** v.59, p.301-305, 1978.
- JAFFE, L. F. e STERN, C.D..Strong electric currents leave the primitive streak of early chick embryos. **Science**, v.206, p.569-571, 1979.
- JONSDOTTIR, I.H., SCHJERLING, P., OSTROWSKI, K., ASP, S., RICHTER, E.A., PEDERSEN, B.K. Muscle contractions induce interleukin-6 mRNA production in rat skeletal muscles. **J Physiol.**, v.528, pp.157-163, 2000.
- JURCZAK, M.J., DANOS, A.M., REHRMANN, V.R., BRADY, M.J. The role of protein translocation in the regulation of glycogen metabolism. **J Cell Biochem.** v.16, p.01-06, 2007.
- KASPER, C.E., TALBOT, L.A., GAINES, J.M. Skeletal muscle damage and recovery. **AACN Clin Issues**, v.13, n.2, p.237-247, 2002.
- KOBAYASHI, H., KATO, H., HIRABAYASHI, Y., MURAKAMI, H., SUZUKI, H. Modulations of muscle protein metabolism by branched-chain amino acids in normal and muscle-atrophying rats. **J Nutr.** v.136, (S1), p.234-238, 2006.
- LYNGSO, D., SIMONSEN, L., BULOW, J. Metabolic effects of interleukin-6 in humans splanchnic and adipose tissue. **J Physiol.**, v.543, p.379-386, 2002.
- McCONNELL, G.K., KINGWELL, B.A. Does nitric oxide regulate skeletal muscle glucose uptake during exercise? **Exerc Sport Sci Rev.** v.34, n.1, p.36-41, 2006.

MINDLIN, R.L., BUTLER, A.M. The determination of ascorbic acid. A micromethod. **J. Biol. Chem.** v.122, p.673-686, 1938.

ONO, T., MAEKAWA, K., WATANABE, S., OKA, H., KUBOKI, T. Muscle contraction accelerates IL-6mRNA expression in the rat masseter muscle. **Arch. Oral Biol.** p.479-486, 2007.

OSTROWSKI, K., ROHDE, T., ZACHO, M., ASP, S., PEDERSEN B. K. Evidence that interleukin-6 is produced in human skeletal muscle during prolonged running. **J Physiol.**, v.508, p.949-953, 1998.

PALMA, L.D., MARINELLI, M., PAVAN, M., ORAZI, A. Ubiquitin ligases MuRF1 and MAFbx in human skeletal muscle atrophy: **Joint Bone Spine**, p.212-222, 2007.

PEDERSEN, B.K., STEENBERG, A., FISCHER, C., KELLER, C., PLOMGAARD, P., FEBBRAIO, M., SALTIN, B. Searching for the exercise factor: is IL-6 a candidate? **J. Muscle Res Cell Motil.** v.24, p.113-119, 2003.

STARKIE, R., OSTROWSKI, S.R., JAUFFRED, S., FEBBRAIO, M., PEDERSEN B.K. Exercise IL-6 infusion inhibit endotoxin-induced TNF-alpha production in humans. **FASEB J.**, v.17, p.884-886, 2003.

STEENBERG A., FISCHER C.P., KELLER C., MOLLER K., PEDERSEN B.K. IL-6 enhances plasma IL-1ra, IL-10, and cortisol in humans. **Am J Physiol Endocrinol Metab.**, v.285, p.433-437, 2003.

TSUJINAKA, T., EBISUI, C., FUJITA, J., KISHIBUCHI, M., MORIMOTO T., OGAWA, A., KATSUME, A., OHSUGI, Y., KOMINAMI, E., MONDEN, M. Muscle undergoes atrophy in association with increase of lysosomal cathepsin activity in interleukin-6 transgenic mouse. **Bioch Biophys Res Comm.**, v.207, p.168-174, 1995.

TSUJINAKA, T., FUJITA, J., EBISUI, C., YANO, M., KOMINAMI, E., SUZUKI, K., TANAKA, K., KATSUME, A., OHSUGI, Y., SHIOSAKI, H., MONDEN M. Interleukin-6 receptor antibody inhibits muscle atrophy and modulates proteolytic systems in interleukin-6 transgenic mice. **J Clin Invest.**, v.97, p.244-249, 1996

ULLUN, H., HAAIIR, P.M., DIAMANT, M., PALMO, J., HALKJAER-KRISTENSEN J., KLARLUND, PEDERSEN, B. Bicycle exercise enhances plasma IL-6 but does not change IL-1a, IL-1b, IL-6 or TNF-a pre-mRNA in BMNC. **J Appl Physiol.**, v.77, p.93-97, 1994.

WALLENIIUS, V., WALLENIIUS, K., AHREN, B., RUDLING, M., CARLSTEN, H., DICKSON, S.L. Interleukin-6-deficient mice develop mature-onset obesity. **Nat Med.**, v.8, p75-79, 2002.