
ARTIGO ORIGINAL

Morfologia e histomorfometria do músculo esquelético de ratas submetidas à estimulação elétrica neuromuscular

Musculoskeletal morphology and histomorphometry of female rats submitted to neuromuscular electrical stimulation

Vinícius Cestari do Amaral, Ft., M.Sc.*, Rodrigo Rodrigues Marcondes, Ft.**, Luiz Carlos Rodrigues Guanabara, Ft., Esp, M.Sc.**, Manuel de Jesus Simões, D.Sc.****, Cristiano Schiavinato Baldan, Ft.*****, Jairo José Matozinho Cubas, Esp, M.Sc.*****

Doutorando da Disciplina de Ginecologia, Laboratório de Ginecologia Estrutural e Molecular - LIM 58, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), São Paulo/SP, **Mestrando da Disciplina de Ginecologia, Laboratório de Ginecologia Estrutural e Molecular - LIM 58, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), São Paulo/SP, *Professor e Coordenador do Curso de Fisioterapia da Universidade de Ribeirão Preto (UNAERP - Campus Guarujá), Guarujá-SP, ****Chefe da Disciplina de Histologia e Biologia Estrutural da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), São Paulo/SP, *****Coordenador Geral do Curso de Fisioterapia da Universidade Paulista (UNIP), Professor do Curso de Graduação em Fisioterapia da Universidade Paulista (UNIP) e Universidade Metodista de São Paulo (UMESP), *****Biólogo, Professor Adjunto da Faculdade Unida de Suzano (UNISUZ), Suzano/SP*

Resumo

Objetivo: Analisar a morfologia e a histomorfometria do tecido muscular esquelético de ratas submetidas à estimulação elétrica neuromuscular (EENM). **Material e métodos:** Foram utilizadas oito ratas divididas em dois grupos, contendo quatro animais cada, sendo: grupo I (GI) - controle; e grupo II (GII) - submetido à EENM. A EENM foi realizada no músculo gastrocnêmio das ratas do GII durante 8 semanas. Após esse período, os animais foram sacrificados e o músculo gastrocnêmio foi removido para montagem nas lâminas com a coloração de hematoxilina e eosina. As lâminas foram analisadas em microscopia de luz e as imagens capturadas em um sistema de análise de imagens, no qual foi mensurada a circunferência das fibras musculares e os dados foram analisados estatisticamente. **Resultados:** Nossos dados revelaram maior circunferência das fibras musculares no GII ($1876,1 \pm 33,98 \mu\text{m}^2$) em relação ao GI ($1516,6 \pm 318,1 \mu\text{m}^2$), diferença esta sendo estatisticamente significativa ($P < 0,001$). **Conclusão:** Foi mostrado que a EENM promove a hipertrofia do músculo esquelético.

Palavras-chave: morfologia, músculo gastrocnêmio, eletroterapia.

Abstract

Objective: To analyze the morphology and histomorphometry of musculoskeletal tissue of female rats submitted to neuromuscular electrical stimulation (NMES). **Material and methods:** Eight female rats divided into two groups, each containing four animals, were used as follows: group I (GI) - control; and group II (GII) - submitted to NMES. NMES was performed in rats gastrocnemius muscle of GII for 8 weeks. After this period, the animals were sacrificed and the gastrocnemius muscle was removed and mounted on glass slides with haematoxylin and eosin staining. Glass slides were analyzed by optical microscopy and their images were captured in a picture analysis system, the musculoskeletal cells circumference was measured and data were statistically analyzed. **Results:** Our data showed that musculoskeletal cells circumference of GII ($1876.1 \pm 33.98 \mu\text{m}^2$) was larger than GI ($1516.6 \pm 318.1 \mu\text{m}^2$), and this difference is statistically significant ($P < 0,001$). **Conclusion:** We concluded that NMES promotes musculoskeletal hypertrophy.

Key-words: morphology, gastrocnemius muscle, electrotherapy.

Recebido em 7 de fevereiro de 2012; aceito em 25 de setembro de 2012.

Endereço para correspondência: Vinícius Cestari do Amaral, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Laboratório de Ginecologia Estrutural e Molecular - LIM 58, Av. Dr. Arnaldo, 455/2113, 01246-903 São Paulo SP, Tel: (11) 3061-7033, E-mail: lim58usp@gmail.com

Introdução

A estimulação elétrica neuromuscular (EENM) consiste na aplicação intermitente de corrente elétrica para promover a contração em músculos superficiais [1]. Esse tipo de corrente produz contrações musculares através de estimulações elétricas que despolarizam o nervo motor, produzindo uma resposta sincrônica em todas as unidades motoras do músculo [2].

A resposta da unidade motora muscular proporciona a base para a aplicação terapêutica da estimulação elétrica, a qual a atividade fica restrita ao músculo estimulado, e o músculo é menos influenciado pelas outras alterações que podem ocorrer no corpo durante o exercício [3]. As alterações induzidas pela estimulação elétrica na propriedade contrátil do músculo estão associadas às alterações na composição das proteínas miofibrilares, determinadas por alterações na expressão gênica dessas proteínas e enzimas musculares, como forma de adaptação do músculo às mudanças do seu padrão de atividade [4].

De acordo com Dellito e Snyder-Mackler [5], há duas teorias distintas para a explicação do fortalecimento usando a EENM. A primeira teoria propõe que o ganho de força com EENM ocorre de maneira similar ao ganho de força com exercício voluntário. Uma segunda teoria propõe diferenças fisiológicas entre a excitação elétrica e a contração voluntária, por exemplo, a forma inversa de ordem do recrutamento das unidades motoras.

Durante a contração voluntária recrutam-se primeiro as células de formato pequeno, de condução lenta (tônicas) que são mais resistentes à fadiga e, posteriormente, recrutam-se as do tipo II (fásicas). Já na contração eletricamente induzida, o recrutamento ocorre primeiro nas células do tipo II (menos resistentes à fadiga) e posteriormente nas células do tipo I [6].

Segundo Evangelista *et al.* [7], a EENM pode ter o mesmo efeito que a contração muscular voluntária no que se diz respeito ao aumento temporário do metabolismo muscular. Porém, ainda são necessários estudos para se pesquisar mais especificamente quais os efeitos da EENM na variação metabólica.

Nas clínicas de Fisioterapia, a EENM é um recurso físico empregado para o fortalecimento e hipertrofia muscular [8], sendo aplicado para as situações de coadjuvante do exercício, cura de enfermidades ou melhora do condicionamento físico [9]. Mas existe certo ceticismo na aplicação de EENM devido à escassez de conhecimento sobre os efeitos que este recurso exerce na fisiologia muscular [1].

Atualmente, espera-se um maior desenvolvimento nas pesquisas em relação à aplicação da EENM, tendo em vista que a terapia por EENM ainda é incipiente e abre novas perspectivas em relação às estratégias para o recondicionamento do músculo esquelético [10].

Devido à carência de estudos de embasamento histofisiológico para a aplicação da EENM em músculos saudáveis, o presente trabalho teve como objetivo analisar a morfologia e a histomorfometria do tecido muscular esquelético de ratas submetidas à EENM.

Material e métodos

Animais

Após a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo (CEP - UNIFESP) sob o parecer 0986/07, o experimento foi iniciado. Para o estudo, foram utilizadas oito ratas adultas (*Rattus norvegicus albinus*), de aproximadamente três meses de idade, e peso médio de 195 gramas, sendo estas fornecidas pelo Centro de Desenvolvimento de Modelos de Experimentação (CEDEME) da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) e mantidas no Biotério da Disciplina de Histologia e Biologia Estrutural em condição de confinamento em gaiolas plásticas medindo 45 x 35 x 15 cm, respectivamente, de comprimento, largura e altura, com tampa gradeada de metal, com alimentação e água *ad libitum*, em temperatura ambiente de 22 °C, iluminação artificial com lâmpadas fluorescentes (modelo luz do dia de 40W, Phillips) mantendo-se fotoperíodo claro de 12 horas intercalado com escuro de 12 horas, considerando-se o período de luz das 7:00 às 19:00 horas. Os animais foram divididos em dois grupos, alocados em duas gaiolas plásticas diferentes, com quatro animais cada, de modo que o grupo I (GI) foi utilizado como controle e o grupo II (GII) foi submetido à EENM.

Protocolo de aplicação da EENM

Após anestesia na região peritoneal e tricotomia da região posterior da pata esquerda, os animais foram imobilizados em decúbito ventral, de modo a permitir movimentação livre da articulação talocrural esquerda no momento da EENM. Dois eletrodos, de 1 cm² cada, com gel condutor (CARCI) foram acoplados à pele dos animais, sendo um eletrodo próximo à inserção distal do músculo gastrocnêmio e o outro no ponto motor do referido músculo, próximo a sua inserção proximal. A EENM foi realizada através do aparelho FESMED II (CARCI), com pulso bifásico assimétrico, parametrizado em frequência de 50 Hz, ciclo ON-OFF na proporção de 1/1 e rampa de subida de trens de pulso de 2,2 segundos. A intensidade aplicada foi de, aproximadamente, 0,5 mA. O experimento teve duração de oito semanas, de modo que as intervenções com EENM ocorreram três vezes por semana em dias não consecutivos. Em cada intervenção foram induzidas eletricamente 20 contrações musculares. Este protocolo foi adaptado de Camargo *et al.* [8].

Processamento do músculo gastrocnêmio para histologia

Após oito semanas de experimento, os animais, sob efeito anestésico, foram sacrificados e o músculo gastrocnêmio esquerdo foi retirado de cada animal. Estes músculos foram fixados em formol a 10% por 12 horas, e em seguida desidra-

tados em concentrações crescentes de álcool etílico absoluto, diafanizados pelo xilol e impregnados pela parafina líquida em estufa com a temperatura em 60°C. A inclusão foi realizada para que fosse possível observar, nas lâminas histológicas, cortes transversais do músculo esquelético. Em seguida, os blocos foram cortados em micrótomo do tipo Minot, ajustado para 4 µm. Os cortes obtidos foram colocados em lâminas previamente untadas com albumina de Mayer e, depois, mantidas em estufa regulada à temperatura de 46°C, durante 24 horas, para secagem. As lâminas foram então submetidas ao método de coloração pela hematoxilina e eosina (HE) para posteriores análises morfológica e histomorfométrica ao microscópio de luz (modelo Axiolab Standart 20, Carl Zeiss), com aumento de 400x.

Protocolo para análise histomorfométrica

A análise histomorfométrica foi realizada por meio de um microscópio de luz (Axiolab Standart 20, Carl Zeiss) acoplado a uma câmera de vídeo colorida (modelo Hyper Had SSC-DC 54, Sony) que transmite a imagem para um computador, dotado de um software de análise gráfica (Imagelab, Softium) instalado em sistema operacional Windows XP.

Foi utilizado um campo representativo de toda região do tecido muscular esquelético para o estudo das lâminas e, em seguida, foi mensurada a circunferência em µm² de cada fibra muscular para posterior análise estatística.

Análise estatística

Após o cálculo da média do total de mensurações da circunferência das fibras musculares das ratas do grupo I e grupo II, verificou-se a significância estatística entre os valores das mensurações dos grupos experimentais pelo teste *T-student* não pareado, com valor de significância estipulado em $p < 0,05$.

Resultados

Análise macroscópica do músculo gastrocnêmio

Após a observação macroscópica do músculo gastrocnêmio notou-se que não houve alteração significativa na morfologia macroscópica básica em todos os grupos, ou seja, o músculo encontrou-se ligado a estruturas ósseas através dos tendões, contínuos com o tecido conjuntivo que o reveste, o epimísio.

Análise morfológica

Microscopicamente, o tecido muscular dos dois grupos experimentais apresentou epimísio visível, com essa camada de tecido conjuntivo penetrando o músculo e circundando os feixes de fibras musculares, formando o perimísio, que, finalmente dividiu-se em uma camada delicada de fibras

reticulares ao redor de cada célula muscular, camada esta denominada como endomísio. As fibras musculares em corte transversal apresentaram-se normais com sua forma poligonal, multinucleada e núcleos periféricos (Figuras 1 e 2). Porém, foi observada uma diferença entre a área das células musculares dos grupos experimentais, de modo que as células do GII apresentaram maior área, sugerindo uma hipertrofia muscular (Figura 2).

Figura 1 - Fotomicrografia do tecido muscular esquelético de rata do grupo controle (400x).

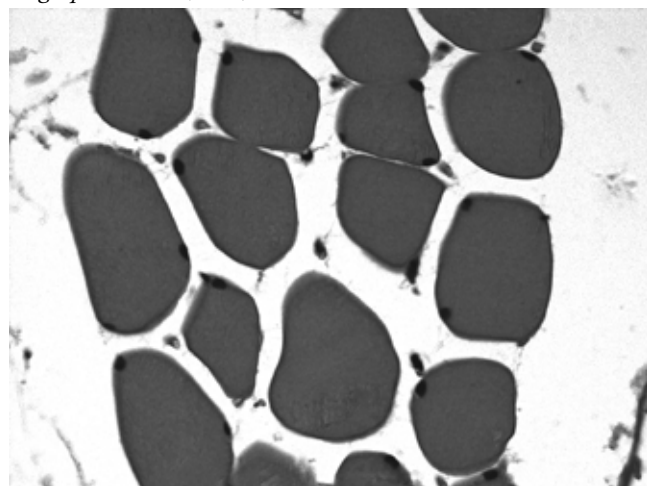
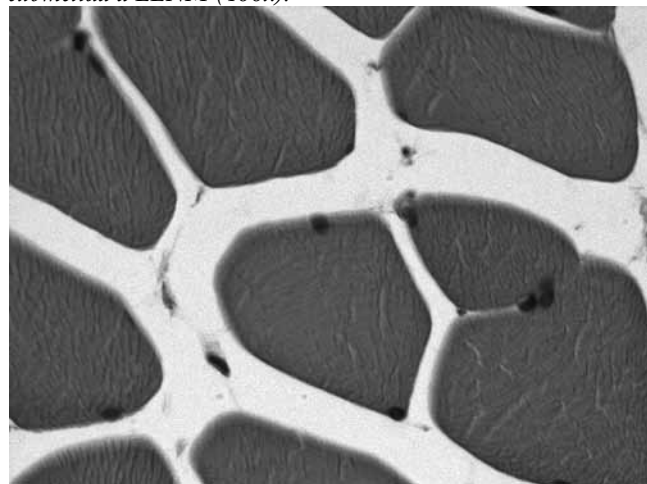


Figura 2 - Fotomicrografia do tecido muscular esquelético de rata submetida à EENM (400x).



Análise histomorfométrica

A média das circunferências das fibras musculares apresentou-se maior no GII em relação ao GI, sendo que a média do GII foi de $1876,1 \pm 33,98 \mu\text{m}^2$ e a média do GI foi de $1516,6 \pm 318,1 \mu\text{m}^2$. Conforme análise pelo teste *T-student*, nota-se que o GII obteve aumento estatisticamente significativo no diâmetro das fibras musculares quando comparado ao GI ($P < 0,001$) (Tabela I).

Tabela I - Médias e desvio padrão da histomorfometria do tecido muscular esquelético.

Grupos experimentais	Histomorfometria do tecido muscular	
	μm^2	P
Controle (GI)	1516,6 \pm 318,1	<0,001
EENM (GII)	1876,1 \pm 33,98	

Discussão

A utilização de EENM vem sendo amplamente difundida na clínica fisioterápica quando se tem por objetivo o fortalecimento e hipertrofia muscular. Porém, muitos clínicos são céticos em relação ao uso da EENM devido à falta de evidências de que a eficiência deste recurso seja superior ao treinamento voluntário e pela escassez de conhecimento sobre a fisiologia e metodologia de uso deste recurso. Geralmente, os parâmetros da EENM são definidos de forma empírica, sobrepondo a experiência pessoal sobre as evidências científicas [1]. Por virtude disso, os estudos das ciências básicas de saúde são extremamente essenciais para a aplicação da eletroterapia.

Em nosso estudo, as células musculares esqueléticas eletroestimuladas apresentaram padrão morfológico normal, sem nenhuma alteração compatível com indícios patológicos. Tal resultado é de extrema importância para a base da aplicação da estimulação elétrica neuromuscular, no intuito de provar que o recurso não é prejudicial ao tecido muscular. Porém, a literatura apresenta escassez de estudos que visam analisar a morfologia do tecido muscular esquelético submetido à EENM em seus diversos protocolos de aplicação, de modo que pesquisas nesse sentido seriam úteis para melhorar o embasamento histofisiológico para a utilização deste recurso eletroterápico.

Segundo Bax *et al.* [11], em sua revisão sistemática, a maioria dos estudos com EENM são realizados em músculos saudáveis. Mas em relação a histomorfometria muscular, a literatura apresenta maior parte de seus estudos de EENM concentrados em músculos acometidos pelo enfraquecimento ocasionado pela imobilidade [12-14].

No presente trabalho, a aplicação de EENM no músculo gastrocnêmio, com o protocolo adaptado de Camargo *et al.* [8], promoveu aumento significativo da circunferência das células musculares esqueléticas. Este resultado corroborou os achados do estudo de Durigan *et al.* [15], no qual houve aumento significativo da circunferência das células musculares eletroestimuladas, de forma que a EENM foi aplicada por quinze dias no músculo sóleo sadio de ratos.

Para este estudo, foram utilizados animais do gênero feminino, sendo que isso pode interferir no resultado da hipertrofia, já que Celichowski e Drzymala [16] relatam que a contração e o tempo de relaxamento são significativamente maiores nas unidades motoras dos ratos do que nas ratas, o que leva à diferença no tamanho do músculo.

Conclusão

Conclui-se que o tratamento com a EENM por 8 semanas, com o protocolo utilizado neste trabalho, é eficiente na indução da hipertrofia das fibras musculares esqueléticas em ratas.

Referências

- Maffiuletti NA. Physiological and methodological considerations for the use of neuromuscular electrical stimulation. *Eur J Appl Physiol* 2010;110:223-34.
- Prado RA, Nunes LT, Koda LC, Gomes C. Proposta de tratamento com estimulação elétrica funcional - FES, associada a cinesioterapia na doença de Parkinson. *Med Reabil* 2000;52:23-7.
- Scott O. Efeitos estimulantes. In: Kitchen S, Bazin S. *Eletroterapia de Clayton*. Barueri: Manole; 1998. p.111-9.
- Pette D, Vrbová G. Adaptation of mammalian skeletal muscle fibers to chronic electrical stimulation. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 1992;20:115-202.
- Delitto A, Snyder-Mackler L. Two theories of muscle strength augmentation using percutaneous electrical stimulation. *Phys Ther* 1990;70:158-64.
- Bisschop G, Bisschop E, Commandré F. *Eletrofisioterapia*. São Paulo: Santos; 2001.
- Evangelista AR, Graviana GA, Borges FS, Vilard Junior NP. Adaptação da característica fisiológica da fibra muscular por meio de eletroestimulação. *Fisioter Bras* 2003;4:326-34.
- Camargo LC, Minamoto VB, Noronha MA, Castro CES, Salvini TFA. Estimulação elétrica neuromuscular do tibial anterior não altera a morfologia dos músculos sóleo (antagonista) e extensor digital longo (sinergista) do rato. *Rev Fisioter Univ São Paulo* 1998;5:120-126.
- Brasileiro JS, Villar AFS. Comparação dos torques gerados por estimulação elétrica e contração muscular voluntária no músculo quadríceps femoral. *Rev Bras Fisiot* 2000;4:75-81.
- Dourado VZ, Godoy I. Recondicionamento muscular na DPOC: principais intervenções e novas tendências. *Rev Bras Med Esporte* 2004;10:331-34.
- Bax L, Staes F, Verhagen A. Does neuromuscular electrical stimulation strengthen the quadriceps femoris? A systematic review of randomised controlled trials. *Sports Med* 2005;35:191-212.
- Durigan JLQ, Cancellieri KM, Dias CNK, Silva CA, Guirro RRJ, Polacow MLO. Estudo morfométrico do músculo sóleo de ratos submetidos à imobilização aguda associado à estimulação elétrica neuromuscular. *Fisioter Mov* 2006;19:117-26.
- Fernandes KCBG, Polacow MLO, Guirro RRJ, Campos GER, Somazz MC, Pinto VF, et al. Análise morfométrica dos tecidos muscular e conjuntivo após desnervação e estimulação elétrica de baixa frequência. *Rev Bras Fisioter* 2005;9:235-41.
- Pelizzari C, Mazzanti A, Raiser AG, Lopes STA, Graça DL, Ramos AT et al. Estimulação elétrica neuromuscular em cães com atrofia muscular induzida. *Arq Bras Med Vet Zootec* 2008;60:76-82.
- Durigan JLQ, Cancellieri KM, Guirro RRJ, Silva CA, Polacow MLO. Efeitos da estimulação elétrica neuromuscular no músculo sóleo de ratos: análise morfométrica e metabólica. *Acta Ortop Bras* 2008;16:238-41.
- Celichowski J, Drzymala H. Differences between properties of male and female motor units in the rat medial gastrocnemius muscle. *J Physiol Pharmacol* 2006;57:83-93.