

UNIVERSIDADE METODISTA DE PIRACICABA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO – MESTRADO EM FISIOTERAPIA

KARINA MARIA CANCELLIERO

**ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA NEUROMUSCULAR ASSOCIADA AO
CLEMBUTEROL MELHORA O PERFIL METABÓLICO MUSCULAR DE
MEMBRO IMOBILIZADO DE RATOS**

ORIENTADOR: Prof. Dr. Carlos Alberto da Silva

Piracicaba – SP

2004

UNIVERSIDADE METODISTA DE PIRACICABA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO – MESTRADO EM FISIOTERAPIA

KARINA MARIA CANCELLIERO

**ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA NEUROMUSCULAR ASSOCIADA AO
CLEMBUTEROL MELHORA O PERFIL METABÓLICO MUSCULAR DE
MEMBRO IMOBILIZADO DE RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação - Mestrado em Fisioterapia - da Universidade Metodista de Piracicaba como requisito para obtenção do Título de Mestre em Fisioterapia.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Carlos Alberto da Silva

Piracicaba – SP

2004

UNIVERSIDADE METODISTA DE PIRACICABA

BANCA EXAMINADORA :

Dr. Carlos Alberto da Silva – Professor orientador

Dr. Fabio Viadanna Serrão – Professor examinador - UFSCar

Dr. Rinaldo Roberto de Jesus Guirro - Professor examinador - UNIMEP

SUPLENTES:

Dra. Tânia de Fátima Salvini – Professora suplente - UFSCar

Dr. Dirceu Costa – Professor suplente - UNIMEP

UNIVERSIDADE METODISTA DE PIRACICABA

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus pela minha vida.

Aos meus pais, pelo grande e constante incentivo e pela oportunidade que me proporcionaram na realização desse estudo.

Aos meus colegas, alunos da UNIMEP, pelo incentivo e colaboração no desenvolvimento desse e outros trabalhos.

À Patrícia e Melissa, pela extensa ajuda no laboratório de Fisiologia e às funcionárias da limpeza.

Ao professor Dr. Rinaldo Guirro, pela grande ajuda nesses anos nos quais conheci a área da pesquisa.

E, especialmente ao Carlos, meu orientador desde a graduação, pela proposta e colaboração na realização desse trabalho, pelo incentivo e pela grande amizade nesses anos.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	06
LISTA DE TABELAS.....	08
LISTA DE FIGURAS.....	09
RESUMO.....	14
ABSTRACT.....	17
1. INTRODUÇÃO	20
2. REVISÃO DA LITERATURA	
1.1. Imobilização.....	23
1.2. Estimulação elétrica neuromuscular.....	25
1.3. Clenbuterol.....	26
3. OBJETIVO.....	31
4. MATERIAL E MÉTODOS	
4.1. Animais.....	33
4.2. Grupos experimentais.....	33
4.3. Procedimentos	
4.3.1. Tratamento com clenbuterol.....	33
4.3.2. Técnica da confecção da órtese	34
4.3.3. Imobilização	35
4.3.4. Estimulação elétrica neuromuscular	37
4.4. Amostragem do tecido muscular e hepático.....	40
4.5. Determinação do conteúdo de glicogênio muscular.....	40

4.6.	Teste de tolerância à glicose.....	40
4.7.	Teste de tolerância à insulina.....	41
4.8.	Frequência cardíaca.....	41
4.9.	Ácidos graxos livres.....	42
4.10.	Proteínas totais.....	42
4.11.	Fragilidade osmótica.....	42
4.12.	Perfil hematológico	
4.12.1.	Hemoglobina.....	43
4.12.2.	Hematócrito.....	43
4.12.3.	Eritrometria.....	43
4.13.	Captação de 2-deoxiglicose.....	43
4.14.	Concentração plasmática de glicose, lactato, creatinina e uréia.....	44
4.15.	Avaliação diária de ingesta (água e ração) e peso corporal.....	44
4.16.	Índice de hidratação do músculo sóleo.....	44
4.17.	Dosagem de ácido ascórbico.....	45
4.18.	Análise estatística.....	45
5.	RESULTADOS.....	47
6.	DISCUSSÃO.....	71
7.	CONCLUSÃO.....	88
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	90

LISTA DE ABREVIATURAS

α = alfa

AMPC = adenosina monofosfato cíclico

β = beta

bat/min = batimento por minuto

$^{\circ}\text{C}$ = grau Celsius

cm^2 = centímetro quadrado

dL = decilitro

f = frequência

g = grama

gf = grama força

Gs = proteína G estimulatória

GLUTs = transportadores de glicose

GLUT1 = transportador de glicose 1

GLUT4 = transportador de glicose 4

GLUT5 = transportador de glicose 5

GTT = teste de tolerância à glicose

h = hora

Hz = Hertz

i = intensidade

IR = receptor de insulina

IRS-1 = substrato 1 do receptor de insulina

ITT = teste de tolerância à insulina

Kg = quilograma

L = litro

μ = micro

mA = miliamper

mg = miligrama

mL = mililitro

mM (mmol) = milimolar

ms = milisegundo

nm = nanômetro

PI3-K = fosfatidilinositol 3-quinase

rpm = rotação por minuto

T = largura de pulso

TCA = ácido tricloroacético

U = unidade

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Grupos experimentais (n=6).

Tabela 2. Valor da média \pm epm da concentração de proteínas totais (g/dL) dos músculos sóleo (S), gastrocnêmio branco (GB), gastrocnêmio vermelho (GV), extensor longo dos dedos (ELD) e tibial anterior (TA) dos grupos controle e imobilizado. n=6, * comparado ao respectivo controle ($p < 0,05$).

Tabela 3. Perfil hematológico do grupo controle e tratado com clenbuterol (n=6), constando-se de eritrometria (10^6), hematócrito (%), hemoglobina (g/dL). Os valores do grupo controle são baseados no *CANADIAN COUNCIL ON ANIMAL CARE* (Guide to the care and use of experimental animals, Vol I, 1980). $p < 0,05$, * comparado ao respectivo controle.

Tabela 4. Concentração plasmática de glicose (mg/dL), lactato (mmol/L), uréia (mg/dL) e creatinina (mg/dL) dos grupos controle (C) e tratado com clenbuterol. n=6, $p < 0,05$, * comparado ao respectivo C.

Tabela 5. Valor da média \pm epm da concentração de proteínas totais dos músculos sóleo (S), gastrocnêmio branco (GB), gastrocnêmio vermelho (GV), extensor longo dos dedos (ELD) e tibial anterior (TA) dos grupos controle e tratado com clenbuterol. n=6, * comparado ao respectivo controle ($p < 0,05$).

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Vista lateral (A) e anterior (B) da órtese composta pelo modelo de resina acrílica (1), rotadores laterais (2) e cinta abdominal (3).

Figura 2. Órtese adaptada no membro posterior do animal, mantendo o ângulo de 90° da articulação do tornozelo.

Figura 3. Vista superior do animal com a órtese adaptada no membro posterior esquerdo.

Figura 4. Órtese adaptada no membro posterior do animal, sem interferir na deambulação, permitindo a descarga de peso no membro imobilizado.

Figura 5. Posicionamento dos eletrodos para a aplicação da estimulação elétrica neuromuscular no membro posterior do grupo controle, sendo um eletrodo na região inguinal (eletrodo 1) e outro na porção posterior da perna (eletrodo 2).

Figura 6. Posicionamento dos eletrodos para a aplicação da estimulação elétrica neuromuscular no membro posterior imobilizado, sendo um eletrodo na região inguinal (eletrodo 1) e outro na porção posterior da perna, acoplado dentro da órtese (eletrodo 2).

Figura 7. Equipamento Dualpex 961 (Quark®) utilizado para a realização da estimulação elétrica neuromuscular.

Figura 8. Valor da média \pm epm da concentração de glicogênio (mg/100mg) dos músculos sóleo (S), gastrocnêmio branco (GB), gastrocnêmio vermelho (GV), extensor longo dos dedos (ELD) e tibial anterior (TA) dos grupos controle (C) e imobilizado (I). n=6, p<0,05, * comparado ao respectivo C.

Figura 9. Valor da média \pm epm do peso (mg) dos músculos sóleo (S) e extensor longo dos dedos (ELD) dos grupos controle (C) e imobilizado (I). n=6, p<0,05, * comparado ao respectivo C.

Figura 10. Valor da média \pm epm da captação de 2-deoxiglicose (μ mol/g.h) do músculo sóleo dos grupos controle (C), imobilizado (I) e da pata contra-lateral do grupo imobilizado (CL). n=4 (10 amostras), p<0,05, * comparado ao C e # comparado ao I.

Figura 11. Valor da média \pm epm da síntese de glicogênio ($\mu\text{mol/g.h}$) do músculo sóleo dos grupos controle (C), imobilizado (I) e da pata contra-lateral do grupo imobilizado (CL). n=4 (10 amostras), $p<0,05$, * comparado ao C e # comparado ao I.

Figura 12. Valor da média \pm epm da oxidação de glicose ($\mu\text{mol/g.h}$) do músculo sóleo dos grupos controle (C), imobilizado (I) e da pata contra-lateral do grupo imobilizado (CL). n=4 (10 amostras), $p<0,05$, * comparado ao C e # comparado ao I.

Figura 13. Teste de tolerância à insulina (ITT) aplicado nos grupos controle (n=5) e imobilizado (n=6), analisando o decaimento da glicemia (mg/dL) nos tempos (em minutos) 0; 2,5; 5; 10 e 20, após a aplicação da insulina.

Figura 14. Valor da média \pm epm da concentração hepática de glicogênio (mg/100mg) dos grupos controle e tratado com clenbuterol. n=6, $p<0,05$, * comparado ao controle.

Figura 15. Valor da média \pm epm da concentração plasmática de ácidos graxos livres (mmol/L) dos grupos controle e tratado com clenbuterol. n=6, $p<0,05$ * comparado ao controle.

Figura 16. Valor da média \pm epm da frequência cardíaca (batimentos/minuto) dos grupos controle e tratado com clenbuterol. n=8, $p<0,05$, * comparado ao controle.

Figura 17. Teste de fragilidade osmótica nos grupos controle e tratado com clenbuterol. n=6.

Figura 18. Teste de tolerância à glicose (GTT) aplicado nos grupos controle (n=5) e tratado com clenbuterol (n=5), analisando a glicemia (mg/dL) nos tempos (em minutos) 0, 5, 10, 15, 20, 30 e 60, após a sobrecarga da glicose.

Figura 19. Teste de tolerância à insulina (ITT) aplicado nos grupos controle (n=5) e tratado com clenbuterol (n=5), analisando a glicemia (mg/dL) nos tempos (em minutos) 0; 2,5; 5; 10 e 20, após a aplicação da insulina.

Figura 20. Valor da média \pm epm da concentração de glicogênio (mg/100mg) do músculo sóleo dos grupos controle (C), imobilizado (I), controle tratado com clenbuterol (C+Cle), imobilizado tratado com clenbuterol (I+Cle), controle tratado com estimulação elétrica neuromuscular (C+EE), imobilizado tratado com estimulação elétrica neuromuscular (I+EE), controle tratado com clenbuterol e estimulação elétrica neuromuscular (C+A),

imobilizado tratado com clenbuterol e estimulação elétrica neuromuscular (I+A). n=6, $p < 0,05$, * comparado ao C e # comparado ao I.

Figura 21. Valor da média \pm epm da concentração de glicogênio (mg/100mg) do músculo gastrocnêmio branco dos grupos controle (C), imobilizado (I), controle tratado com clenbuterol (C+Cle), imobilizado tratado com clenbuterol (I+Cle), controle tratado com estimulação elétrica neuromuscular (C+EE), imobilizado tratado com estimulação elétrica neuromuscular (I+EE), controle tratado com clenbuterol e estimulação elétrica neuromuscular (C+A), imobilizado tratado com clenbuterol e estimulação elétrica neuromuscular (I+A). n=6, $p < 0,05$, * comparado ao C e # comparado ao I.

Figura 22. Valor da média \pm epm da concentração de glicogênio (mg/100mg) do músculo gastrocnêmio vermelho dos grupos controle (C), imobilizado (I), controle tratado com clenbuterol (C+Cle), imobilizado tratado com clenbuterol (I+Cle), controle tratado com estimulação elétrica neuromuscular (C+EE), imobilizado tratado com estimulação elétrica neuromuscular (I+EE), controle tratado com clenbuterol e estimulação elétrica neuromuscular (C+A), imobilizado tratado com clenbuterol e estimulação elétrica neuromuscular (I+A). n=6, $p < 0,05$, * comparado ao C e # comparado ao I.

Figura 23. Valor da média \pm epm da concentração de glicogênio (mg/100mg) do músculo extensor longo dos dedos dos grupos controle (C), imobilizado (I), controle tratado com clenbuterol (C+Cle), imobilizado tratado com clenbuterol (I+Cle), controle tratado com estimulação elétrica neuromuscular (C+EE), imobilizado tratado com estimulação elétrica neuromuscular (I+EE), controle tratado com clenbuterol e estimulação elétrica neuromuscular (C+A), imobilizado tratado com clenbuterol e estimulação elétrica neuromuscular (I+A). n=6, $p < 0,05$, * comparado ao C e # comparado ao I.

Figura 24. Valor da média \pm epm da concentração de glicogênio (mg/100mg) do músculo tibial anterior dos grupos controle (C), imobilizado (I), controle tratado com clenbuterol (C+Cle), imobilizado tratado com clenbuterol (I+Cle), controle tratado com estimulação elétrica neuromuscular (C+EE), imobilizado tratado com estimulação elétrica neuromuscular (I+EE), controle tratado com clenbuterol e estimulação elétrica neuromuscular (C+A), imobilizado tratado com clenbuterol e estimulação elétrica neuromuscular (I+A). n=6, $p < 0,05$, * comparado ao C e # comparado ao I.

Figura 25. Valor da média \pm epm do peso muscular (mg) do sóleo dos grupos controle (C), imobilizado (I), controle tratado com clenbuterol (C+Cle), imobilizado tratado com

clembuterol (I+Cle), controle tratado com estimulação elétrica neuromuscular (C+EE), imobilizado tratado com estimulação elétrica neuromuscular (I+EE), controle tratado com clembuterol e estimulação elétrica neuromuscular (C+A), imobilizado tratado com clembuterol e estimulação elétrica neuromuscular (I+A). n=6, p<0,05, * comparado ao C e # comparado ao I.

Figura 26. Valor da média \pm epm do peso muscular (mg) do extensor longo dos dedos dos grupos controle (C), imobilizado (I), controle tratado com clembuterol (C+Cle), imobilizado tratado com clembuterol (I+Cle), controle tratado com estimulação elétrica neuromuscular (C+EE), imobilizado tratado com estimulação elétrica neuromuscular (I+EE), controle tratado com clembuterol e estimulação elétrica neuromuscular (C+A), imobilizado tratado com clembuterol e estimulação elétrica neuromuscular (I+A). n=6, p<0,05, * comparado ao C e # comparado ao I.

RESUMO

RESUMO

O objetivo do trabalho foi avaliar a ação do clenbuterol (Cle, 10 μ g/Kg peso, via subcutânea) e da estimulação elétrica neuromuscular (EE, f=10Hz, T=0,4ms, i=5mA, 20 minutos, diariamente) no músculo esquelético de membro posterior imobilizado. Ratos machos *Wistar* foram divididos em 10 grupos (n=6), sendo inicialmente realizado um experimento piloto entre quatro grupos (controle (C), imobilizado (I) 3 dias, I 7 dias e I 15 dias) para escolher o grupo que apresentasse o maior comprometimento metabólico e da massa muscular decorrente da imobilização, sendo escolhido o período de 7 dias. Após essa observação os tratamentos foram aplicados durante 7 dias nos grupos: C tratado com Cle (C+Cle), C tratado com EE (C+EE), I tratado com Cle (I+Cle), I tratado com EE (I+EE), C tratado com a associação Cle e EE (C+A) e I tratado com a associação Cle e EE (I+A). As avaliações direcionadas ao grupo C+Cle estão representadas pela frequência cardíaca, ácidos graxos livres, glicogênio hepático, fragilidade osmótica, perfil hematológico e bioquímico, objetivando a viabilidade do tratamento, além de outras como o teste de tolerância à glicose, teste de tolerância à insulina, análise de proteínas totais, índice de hidratação, ingesta alimentar e peso corporal. Outros testes também foram aplicados no grupo I, representado pela captação de 2-deoxiglicose, proteínas totais, índice de hidratação, teste de tolerância à insulina e dosagem de ácido ascórbico. A análise das reservas de glicogênio (RG) muscular do sóleo (S), gastrocnêmio branco (GB) e vermelho (GV), tibial anterior (TA), extensor longo dos dedos (ELD) e a avaliação do peso do S e ELD foram realizadas em todos os grupos. A análise estatística constou-se da ANOVA e teste t ($p < 0,05$). O grupo I apresentou redução significativa ($p < 0,05$) nas RG (31,6% S, 56,6% GB, 39% GV, 41,7% ELD, 45,2% TA) e no peso muscular (34% S, 27% ELD), por outro lado, Cle promoveu aumento significativo ($p < 0,05$) nas RG de todos os músculos do grupo C (81,6% S, 58,7% GB, 65,8% GV, 77,8% ELD, 61,3% TA) e nos músculos S (92,3%), GB (150%) e GV (48%) do grupo I, além de promover aumento significativo ($p < 0,05$) no peso muscular (C: 21,4% S, 35,2% ELD; I: 15,7% S, 27,5% ELD). A EE também promoveu aumento significativo ($p < 0,05$) nas RG dos músculos S (42,1%), GB (41,3%) e TA (74,2%) do grupo C e no S (34,6%), GB (45%), GV (44%) e ELD (42,8%) do grupo I, apesar de não interferir no peso. Quanto aos grupos associados, as RG foram

elevadas significativamente ($p < 0,05$) tanto no grupo C (147,4% S, 193,5% GB, 124,4% GV, 175% ELD, 203,2% TA) quanto no I (223,1% S, 250% GB, 200% GV, 171,4% ELD, 211,8% TA). Nesses grupos o aumento do peso foi significativo ($p < 0,05$) no ELD (26,2%) do C e em ambos os músculos (25,5% S, 51,3% ELD) do grupo I. Conclui-se que o perfil energético e a massa muscular foram melhores na presença simultânea do Cle e da EE durante o período de imobilização do membro.

ABSTRACT

ABSTRACT

The objective of the work was to evaluate the clenbuterol (Cle, 10g/Kg weight, subcutaneously) and the neuromuscular electrical stimulation (ES, $f=10\text{Hz}$, $T=0,4\text{ms}$, $i=5\text{mA}$, 20 minutes, daily) action in skeletal muscle of immobilized hindlimb. Male rats *Wistar* were divided in 10 groups ($n=6$) and firstly a pilot experiment was accomplished among four groups (control (C), immobilized (I), I 3 days and I 15 days) to choose the group to present the largest muscular metabolism and mass compromising due to the immobilization, and the period chosen was of 7 days. After this observation the treatments were applied for 7 days in the groups: C treated with Cle (C+Cle), C treated with ES (C+ES), I treated with Cle (I+Cle), I treated with ES (I+ES), C treated with the association Cle and ES (C+A), I treated with the association Cle and ES (I+A). The evaluations addressed to the C+Cle group are represented like this: cardiac frequency, free fatty acid, liver glycogen, osmotic fragility, hematological and biochemical profile, aiming the viability of the treatment, besides other as the glucose tolerance test, insulin tolerance test, total protein analysis, hydration index, food consume and body weight. Other tests were also applied in the I group acted by the 2-deoxyglucose uptake, total proteins, hydration index, insulin tolerance test and ascorbic acid dosage. The glycogen reserves (GR) analysis (RG) of soleus (S), white gastrocnemius (WG), red gastrocnemius (RG), tibialis anterior (TA), extensor digitorum longus (EDL) muscles and the S and EDL weight evaluation were realized in all of the groups. The statistic analysis was realized by ANOVA and t test ($p<0,05$). The I group presented significant decrease ($p<0,05$) in GR (31,6% S, 56,6% WG, 39% RG, 41,7% EDL, 45,2% TA) and in muscular weight (34% S, 27% EDL), on the other hand, the Cle promoted significant increase ($p<0,05$) in GR of all the muscles of C group (81,6% S, 58,7% GB, 65,8% GV, 77,8% EDL, 61,3% TA) and in S (92,3%), WG (150%) and RG (48%) muscles of I group, besides to promote significant increase in muscular weight (C: 21,4% S, 35,2% EDL; I: 15,7% S, 27,5% EDL). The ES also promoted significant increase ($p<0,05$) in GR of S (42,1%), WG (41,3%) and TA (74,2%) muscles of C group and in S (34,6%), WG (45%), RG (44%) and EDL (42,8%) muscles of I group, in spite of not interfering in the weight. With relation the associated groups, the GR were elevated significantly ($p<0,05$) as much in C group (147,4% S, 193,5% WG, 124,4% RG, 175% EDL, 203,2% TA) as in

the I (223,1% S, 250% WG, 200% RG, 171,4% EDL, 211,8% TA). In these groups, the weight increase was significant ($p < 0,05$) in EDL (26,2%) of C group and in both muscles (25,5% S, 51,3% EDL) of I group. This work ends that the muscular energetic profile and the mass were better in the simultaneous presence of Cle and ES during the limb immobilization period.

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A imobilidade é uma condição frequente na prática clínica fisioterapêutica que pode ocorrer devido a diversas situações como rupturas ligamentares, fraturas ósseas, lesões musculares e medulares, patologias degenerativas articulares e musculares, inflamações, cirurgias, entre outras, nas quais o indivíduo pode ter uma restrição de um segmento corporal até a permanência de períodos longos no leito.

O desuso muscular pode trazer várias conseqüências não somente à musculatura esquelética, mas também à cartilagem, ossos, ligamentos e tendões devido à diminuição de estímulos a essas estruturas. Dentre as diferentes alterações musculares a mais abordada na literatura é a atrofia muscular, a qual merece uma especial atenção no que tange à reabilitação.

Particularizando, a imobilização de membro, que tem como consequência a atrofia muscular, necessita de procedimentos de reabilitação durante um longo período, *locus* de ação da fisioterapia. Porém, muitas vezes, o tempo de imobilização é muito extenso, o que pode levar a uma atrofia mais relevante.

Este fato levou a direcionar o trabalho à avaliação da musculatura esquelética durante o período de imobilização do membro, tendo como enfoque o perfil metabólico muscular. Como em trabalhos anteriores o grupo direcionava os estudos na condição de desnervação, na qual havia o comprometimento metabólico e tecidual muscular, e aplicava protocolos de tratamento com o objetivo de minimizar a perda de peso muscular e o comprometimento energético, isto poderia ser aplicado na condição de imobilização de membro, que também se caracteriza por um modelo de resistência à insulina.

Assim, o direcionamento foi caracterizar o desuso muscular no modelo animal e a partir deste escolher e aplicar dois tratamentos. Um deles foi a estimulação elétrica neuromuscular, recurso fisioterapêutico, a qual era utilizada pelo grupo na musculatura desnervada, pelo fato desta promover a contração muscular. E o outro foi um fármaco, pelo fato do grupo já estudar a associação do recurso fisioterapêutico com substâncias, como fármacos e suplementações,

como aminoácidos, sendo que o escolhido para esse trabalho foi o clembuterol, utilizado na medicina esportiva, pelo seu efeito anabólico.

Na literatura há diversos trabalhos relacionados a modelos de desuso muscular, que podem ser caracterizados por desnervação, tenotomia, suspensão de membro e imobilização de um dos membros de animais. Um modelo bastante utilizado é a suspensão de membro com o objetivo da microgravidade e outro é a imobilização por auxílio de órtese.

Esses modelos de desuso muscular se diferem quanto ao período e a posição articular. Com relação à articulação do tornozelo, bastante estudada, ela pode se encontrar em flexão plantar ou em dorsiflexão para que os músculos sejam analisados em posições de encurtamento e alongamento, além de outros trabalhos que mantêm a articulação em posição neutra. Porém, em estudos que mantêm a posição neutra, há concomitante imobilização das articulações do quadril e joelho. Esse fato foi sugestivo para se confeccionar uma órtese que mantivesse a articulação do tornozelo em posição neutra, porém com as demais articulações livres, para que assim tornasse mais próxima da realidade, além de ser funcional ao animal.

Destaca-se ainda que o objetivo foi aplicar os tratamentos durante o período de imobilização do membro, no qual não é comum a atuação fisioterapêutica.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. IMOBILIZAÇÃO

A homeostasia celular está diretamente relacionada com a capacidade de adaptação a novas condições, uma vez que, as modificações anatomo-funcionais dependem de um constante redirecionando do fluxo de energia de acordo com a disponibilidade de substratos metabolizáveis. Neste contexto, a plasticidade metabólica das fibras musculares permite ajustes constantes e seqüenciais buscando adaptar-se a tríade atividade/demanda/disponibilidade de substratos.

A homeostasia metabólica das fibras musculares pode ser comprometida por diferentes fatores, como, por exemplo, na imobilização (KANNUS et al., 1998a), que é uma condição frequente na prática clínica da fisioterapia. Neste sentido, sabe-se que a atrofia muscular induzida por desuso ocorre em associação com desordens ortopédicas como na osteoartrite crônica ou frente à imobilização no tratamento de fraturas, de rupturas ligamentares, lesão medular, tratamento com glicocorticóides ou ainda em situações de manutenção por longos períodos no leito por razões médicas ou cirúrgicas (REARDON, et al., 2001).

Apesar de ser benéfica à lesão musculoesquelética, a imobilização apresenta efeitos colaterais como atrofia da célula muscular, fibrose intramuscular, perda de extensibilidade muscular e limitação de movimento articular (WILLIAMS, 1988; KANNUS et al., 1998a). Diversos estudos demonstraram que concomitante à atrofia muscular, ocorrem grandes modificações na homeostasia do músculo esquelético, comprometendo a síntese de proteínas miofibrilares ou não fibrilares, afetando a dinâmica contrátil bem como a efetividade das vias metabólicas.

A plasticidade das fibras musculares esqueléticas permite que estas sejam capazes de se adaptar deflagrando mudanças na tipagem de fibras ou tamanho. Múltiplos estímulos podem promover estas mudanças, merecendo destaque a desnervação, imobilização, inatividade prolongada, alterações hormonais, nutrição, estimulação elétrica entre outros (SALVINI, 2000). Mesmo frente a uma diversidade de observações contidas na literatura, Matthews & St. Pierre (1996)

ressaltaram que tanto a atrofia muscular quanto a redução da força ocasionada pela imobilização ou ato cirúrgico nem sempre volta ao normal mesmo frente a um extensivo processo de reabilitação.

Segundo Diaz-Herrera et al. (2001) a atrofia induzida por imobilização inclui alterações bioquímicas e morfofuncionais das fibras tipo I e II. Essas alterações podem indicar mudanças na área de secção transversa bem como na composição do tipo de fibra (KANNUS et al., 1998a, b).

Não somente o tipo de fibra muscular interfere no grau de atrofia, mas também a posição articular, sendo que dependendo do tipo de imobilização o músculo pode se encontrar encurtado ou alongado, estimulando a diminuição ou aumento do número de sarcômeros em série (WILLIAMS & GOLDSPIK, 1978; APPELL, 1986). Os estudos se diferenciam em relação à posição articular, sendo que alguns mantêm a posição neutra do tornozelo (PLOUG et al., 1995), outros a dorsiflexão (SEKI et al., 2001) e outros a flexão plantar (SAKAKIMA et al., 2004).

Outro aspecto observado em pacientes inativos fisicamente ou imobilizados é a presença da resistência à insulina, porém ainda não está claro como o desuso muscular crônico ou a imobilização alteram a sinalização de insulina, embora sejam situações conhecidas em diminuir a captação de glicose estimulada pela insulina (HIROSE et al., 2000). Há uma diminuição dos transportadores GLUT4 pelo desenvolvimento da resistência ao transporte de glicose estimulado pela insulina (HENRIKSEN et al., 1991).

Vários modelos experimentais são propostos no intuito de identificar os eventos desencadeados pelo desuso muscular e deflagração dos processos precursores da atrofia, merecendo destaque, a desnervação neuromuscular, a suspensão dos membros posteriores do animal ou ainda a imobilização unilateral de membros por órteses (DESPLANCHES et al., 1990; REARDON et al., 2001).

Há concordância entre os estudos de que a perda muscular com ausência de descarga de peso e outros modelos de desuso é um produto de atrofia das fibras musculares esqueléticas e aumento da degradação protéica (BOOTH & CRISWELL, 1997). Porém, os mecanismos desencadeadores celulares e

moleculares que levam a essa perda ainda não são bem entendidos (LAWLER et al., 2003).

2.2. ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA NEUROMUSCULAR

Tem sido demonstrado que o aumento na atividade contrátil induzida pelo exercício físico favorece a captação de glicose pelas fibras musculares, cujo mecanismo é explicado pela translocação de transportadores GLUT4 insensíveis à insulina de reservatórios citosólicos para a membrana, aumentando com isso a captação de glicose (GOODYEAR et al., 1992). Convém salientar que a associação da insulina com a atividade contrátil promove um aumento adicional no número de transportadores de glicose, sendo que esse efeito é mais pronunciado nos músculos ricos em fibras oxidativas do que nos músculos compostos apenas de fibras glicolíticas (MEGENEY et al., 1992). Há evidências de que há dois espaços intracelulares distintos de transportadores de glicose no músculo esquelético, um responde pelo exercício e outro pela insulina (FRANCH et al., 1999). O exercício induz uma melhora na sensibilidade do músculo para a insulina, sendo que seus efeitos podem durar por várias horas após o final do exercício (GOODYEAR & KAHN, 1998).

Como a contração e a insulina estimulam o transporte de glicose por mecanismos distintos, a via de sinalização para contração que estimula o transporte de glicose e síntese de glicogênio tem provocado grande interesse porque a contração muscular pode estimular o transporte de glicose e a translocação de GLUT4 igualmente nos músculos resistentes à insulina (RICHARDSON et al., 1991).

Porém, muitos pacientes não podem se beneficiar com o exercício físico, por alguma debilidade física ou por permanência longa no leito ou período longo de imobilização do membro. Neste período um recurso fisioterapêutico que pode substituir a atividade contrátil voluntária, trazendo benefícios ao paciente, é a estimulação elétrica neuromuscular, pelo fato desta promover a contração muscular prevenindo ou retardando os efeitos deletérios do desuso.

Segundo Vanderthommen & Crielaard (2001) a estimulação elétrica neuromuscular é frequentemente usada para fortalecer o músculo normal, mas na área médica vários pesquisadores têm ressaltado o seu valor para tratar atrofia decorrente da imobilização. Sua eficácia durante a reabilitação do músculo quadríceps, seguida de cirurgia do ligamento cruzado anterior, tem sido bastante documentada.

Segundo Mercier et al. (1999) a estimulação elétrica tem potencial para limitar a degeneração muscular em situações onde também é difícil ou impossível os humanos se exercitarem, não somente em patologias, mas também no ambiente espacial, onde poderia ser uma vantagem usar a estimulação elétrica, devido o tamanho dos veículos espaciais. Segundo Canon et al. (1995) o uso da estimulação elétrica como "mantenedor de medidas" contra degeneração muscular induzida por perda de peso, poderia ser efetiva, mas dependeria do padrão de estimulação elétrica escolhido.

A estimulação elétrica neuromuscular crônica de baixa frequência pode causar alterações na contratilidade e propriedades metabólicas tanto em músculos de contração rápida como em músculos de contração lenta. Dentre as mudanças metabólicas que são observadas pode-se citar o aumento das enzimas responsáveis pela fosforilação e oxidação da glicose (WALTERS et al., 1991).

2.3. CLEMBUTEROL

Dentre os sistemas de controle que participam na manutenção das condições homeostáticas destaca-se a intensa e precisa atividade do sistema nervoso que utiliza sinalizadores químicos (neurotransmissores) enquanto desencadeadores de reações em cascata modulando a atividade dos sistemas.

Dentre os mediadores do sistema nervoso destaca-se a noradrenalina e adrenalina liberada pelas fibras simpáticas pós-ganglionares e medula adrenal, que iniciam suas ações por interação com receptores de membrana específicos denominados adrenoceptores (DOCHERTY, 1998; KABLE et al., 2000).

A mediação das ações fisiológicas das catecolaminas é realizada pelos adrenoceptores, os quais podem ser encontrados em 5 subtipos, sendo α_{1B} , α_2 , β_1 , β_2 e β_3 . Os receptores diferem entre si quanto à seqüência de aminoácidos de sua estrutura protéica, à afinidade a agonistas e antagonistas adrenérgicos e ao sistema de segundo mensageiro a que estão acoplados (BYLUND et al., 1994; BRODDE & MICHEL, 1999; SIRVIÖ & MacDONALD, 1999).

Mesmo frente à natureza glicoprotéica comum e atuação por meio do mesmo sistema de segundo mensageiro, o subtipo dos receptores β adrenérgicos, apresentam especificidades estruturais e funcionais relacionadas ao tipo de tecido onde são expressos bem como do estado funcional do organismo. A ativação dos receptores β adrenérgicos pelas catecolaminas promove acoplamento a uma proteína G_s (estimulatória) e ativação da adenilil ciclase, promovendo aumento na concentração intracelular de AMPc (adenosina monofosfato cíclico) e subsequente ativação das proteínas quinase A. Estudos *in vivo* mostraram que os adrenoceptores β_1 e β_2 estão envolvidos nos efeitos cronotrópicos e inotrópicos positivos no coração humano e de animais de laboratório (BRODDE & MICHEL, 1999; LOWE et al., 1999; SIRVIÖ & MacDONALD, 1999; KABLE et al, 2000).

Os adrenoceptores β_2 estão presentes também nas membranas celulares dos músculos esqueléticos, comandando o crescimento celular em resposta à circulação das catecolaminas (CUNNINGHAM, 1963). A ativação pelos agonistas modifica o metabolismo protéico, resultando em hipertrofia muscular (CHOO et al., 1992).

Guarner & Alvarez-Byulla (1989) verificaram que os eritrócitos captam glicose dependendo da concentração de glicose no meio a que estão expostos, *in vivo* e *in vitro*, ocorrendo incorporação de glicose aos reservatórios de glicogênio durante a elevação da glicemia e redução nas reservas quando diminui a glicemia. Nessas células também já foi constatado a presença dos receptores β_2 indicando que a adrenalina pode mobilizar as reservas de glicogênio da mesma maneira que o faz nos hepatócitos, sendo que esse efeito se manifesta também durante a hiperglicemia, isto faz que os eritrócitos participem dos ajustes glicêmicos rápidos,

finos e locais dando um suprimento energético inicial enquanto se processa a glicogenólise hepática (SMUROVA, 1994).

Os agonistas ligantes a adrenoceptores do tipo β são extremamente importantes enquanto recurso que pode contrapor a atrofia por desuso devido sua segurança e propriedades anabólicas que exerce. Cabe ressaltar que as vias sinalizadoras bem como os mecanismos pelos quais o agente β adrenérgico induz anabolismo ainda não são totalmente conhecidos (DEUTSCH et al., 2003).

O Clenbuterol é um agonista adrenoceptor β_2 que é utilizado como broncodilatador no tratamento de doenças pulmonares em humanos e também nas espécies pecuárias, embora nestas, seu objetivo seja também promover efeito anabólico muscular, além de sua ação lipolítica.

O clenbuterol é um de uma série dos agonistas β -adrenérgicos que promove o anabolismo muscular de forma eficaz em ambos músculos normal e lesado (COSTELLI et al., 1995). O aumento protéico induzido pela substância tem sido mostrado como resultado de um aumento inicial na síntese protéica e uma subsequente diminuição na degradação (MALTIN et al., 1992b). O mecanismo que envolve o estímulo do clenbuterol no aumento da síntese protéica ainda é desconhecido (SNEDDON et al., 2001).

No estudo de Fitton et al. (2001) foi demonstrado que o Clenbuterol tem um efeito protetor no músculo desnervado antes da sua reinervação, reduzindo a perda de proteínas e a atrofia das fibras musculares e, em parte, preservando a performance contrátil.

Em ratos, doses terapêuticas (10 μ g/Kg peso) de clenbuterol bloqueiam parcialmente a atrofia muscular associada com a desnervação sem demonstrar efeitos nos músculos inervados (MALTIN et al., 1992a).

Como o coração possui uma pequena proporção de adrenoceptores β_2 , pode ocorrer hipertrofia cardíaca. Porém, Fitton et al. (2001) utilizando baixa dose de Clenbuterol (10 μ g/Kg peso, por via oral pela sonda orogástrica) não verificaram efeitos anabólicos no coração, contrastando com estudos que utilizaram altas doses (mg/Kg peso), onde observaram efeitos hipertróficos neste órgão (MALTIN et al., 1992a).

Não somente a dose interfere na resposta, mas também o período do tratamento. Segundo Von Deutsh et al. (2000, 2002) o Clombuterol pode ser administrado pela via subcutânea, sendo que o período de 5 a 7 dias é considerado período agudo. Uma outra possibilidade de administração é a cada 2 dias, para que seja minimizado a *down-regulation* dos adrenoceptores.

O clombuterol vem sendo utilizado em situações da prática clínica médica, destacando a área neurológica, ortopédica e geriátrica, com objetivo de prevenir ou retardar atrofia muscular decorrente da diminuição do uso muscular. Dentre as situações já avaliadas, destacam os pacientes acamados por longo período e que não toleram exercícios em curto prazo, a imobilização de membros, as distrofias musculares, a desnervação, os períodos pós-cirúrgicos e as reabilitações ortopédicas (MALTIN et al., 1993; HERRERA et al., 2001; FITTON *et al.*, 2001).

Segundo Ferry et al. (1999) o mecanismo de ação do clombuterol envolve a ativação da enzima adenilciclase resultando em uma elevada concentração citoplasmática de AMPc. O AMPc, atuando como sinalizador que deflagra uma cascata de eventos celulares, leva à ativação das vias que coordenam o anabolismo, aumentando a síntese protéica e o tamanho da célula, porém, ainda não se conhece o mecanismo celular específico para este fato (HERRERA et al., 2001).

A proposta em tela foi construída a partir da constatação, na literatura, que há uma aplicação do fármaco clombuterol na clínica médica, enquanto ferramenta de auxílio no tratamento de doenças neuromusculares. Por outro lado, pouco se conhece sobre sua aplicação enquanto coadjuvante na ação de profissionais ligados à reabilitação, emergindo a proposta de avaliação/aplicabilidade na fisioterapia.

3. OBJETIVO

3. OBJETIVO

Sendo a imobilização uma condição clínica frequente na prática fisioterapêutica e sabendo que ela desencadeia o processo de atrofia muscular, prejudicando a atividade contrátil e a homeostasia metabólica, a proposta deste trabalho foi:

- 1) Avaliar três períodos (3, 7 e 15 dias) de imobilização do membro posterior, e escolher o período de maior comprometimento metabólico e tecidual, para a sequente aplicação dos tratamentos.
- 2) Determinar o perfil bioquímico plasmático de ratos tratados com clenbuterol;
- 3) Avaliar o comportamento quimio-metabólico de músculos normais e submetidos à condição de imobilização tratados com clenbuterol ou estimulação elétrica neuromuscular;
- 4) Avaliar o efeito da associação estimulação elétrica neuromuscular/clenbuterol sobre o comportamento quimio-metabólico de músculos normais e submetidos à condição de imobilização.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. ANIMAIS

Ratos, albinos, *Wistar* com idade variando de 3 a 4 meses fornecidos pelo Biotério da UNIMEP, foram alimentados com ração (Purina para roedores) e água *ad libitum* sendo submetidos a ciclo fotoperiódico de 12 h claro e 12 h escuro, sob temperatura controlada ($23^{\circ}\text{C}\pm 2$).

4.2. GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os animais foram divididos em 10 grupos, conforme mostra a tabela 1.

Tabela 1. Grupos experimentais (n=6):

Grupos
1. Controle
2. Imobilizado 3 dias
3. Imobilizado 7 dias
4. imobilizado 15 dias
5. Controle + Clembuterol 7 dias
6. Imobilizado + Clembuterol 7 dias
7. Controle + Estimulação Elétrica Neuromuscular 7 dias
8. Imobilizado + Estimulação Elétrica Neuromuscular 7 dias
9. Controle + Clembuterol + Estimulação Elétrica Neuromuscular 7 dias
10. Imobilizado + Clembuterol + Estimulação Elétrica Neuromuscular 7 dias

4.3. PROCEDIMENTOS

4.3.1. TRATAMENTO COM CLEMBUTEROL

O clembuterol foi administrado pela via subcutânea na concentração de $10\mu\text{g}/\text{Kg}$ de peso corporal (FITTON et al. 2001) diariamente durante 7 dias, no período matutino.

4.3.2. TÉCNICA DA CONFECÇÃO DA ÓRTESE

1º fase: Moldagem

Os ratos foram anestesiados com pentobarbital sódico (40 mg/Kg de peso) e a perna esquerda tricotomizada. A seguir, a perna foi flexionada unindo-se com barbante a ponta do pé a tibia. Para a moldagem foi utilizado alginato de potássio, o qual quando manipulado com água apresenta uma geleificação eficiente para recobrir e retirar a impressão do membro posicionado. A seguir, foi aguardado a geleificação final obedecendo ao ponto de gel a partir do desenvolvimento de propriedades elásticas.

2º fase: Modelagem

Após a geleificação, uma incisão foi feita lateralmente e a perna retirada. As partes que foram expulsivamente deformadas pela retirada da pata foram envolvidas com fita crepe unindo-as preparando para a modelagem. Gesso pedra foi espatulado e vertido no interior do molde sob agitação constante para reduzir as bolhas. A presa final foi determinada pela redução da fragilidade ao toque na superfície superior do modelo.

3º fase: Desgaste do Modelo

O modelo de gesso foi separado do alginato tendo as partes excedentes raspadas e lixadas.

4º fase: Expulsividade

Como auxílio de lamparina e espátula, cera nº 7 foi colocada nos pontos de retenção criando zonas de expulsividade.

5º fase: Aplicação da resina acrílica

O modelo de gesso foi mergulhado em isolante “SELLAC” para criar uma película isolante e após a secagem, o polímero (pó) de metacrilato de etila foi

misturado ao monômero (líquido) em recipiente de vidro sob isolamento. A mistura passou pelas seguintes fases: arenosa, pegajosa, plástica e borrachóide.

Na fase pegajosa, a resina foi transferida do recipiente para a superfície do modelo de gesso, acomodada sob o modelo, esculpida e ajustada com a mão e com Lecron pequeno.

6º fase: Acrilização

Como a resina acrílica aplicada sob o modelo é do tipo quimicamente ativada, a presa final foi determinada pela reação exotérmica.

7º fase: 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 nº 5 e pedra de polimento.

4.3.3. IMOBILIZAÇÃO

Os ratos foram anestesiados e a pata posterior esquerda imobilizada com a órtese de resina acrílica, a qual manteve em posição neutra (90°) a articulação do tornozelo, deixando as articulações do joelho e quadril livres (figuras 1 e 2).

O modelo de resina foi adaptado no membro posterior dos ratos, associado a uma cinta de PVC por dois rotadores laterais, os quais permitiram a sua movimentação (figura 2 e 3). O conjunto, com aproximadamente 22 gramas de peso, não interferiu na deambulação do animal, havendo descarga de peso no membro imobilizado, sendo uma movimentação do membro em bloco, com movimentação ântero-posterior e lateral quadril (figura 4).

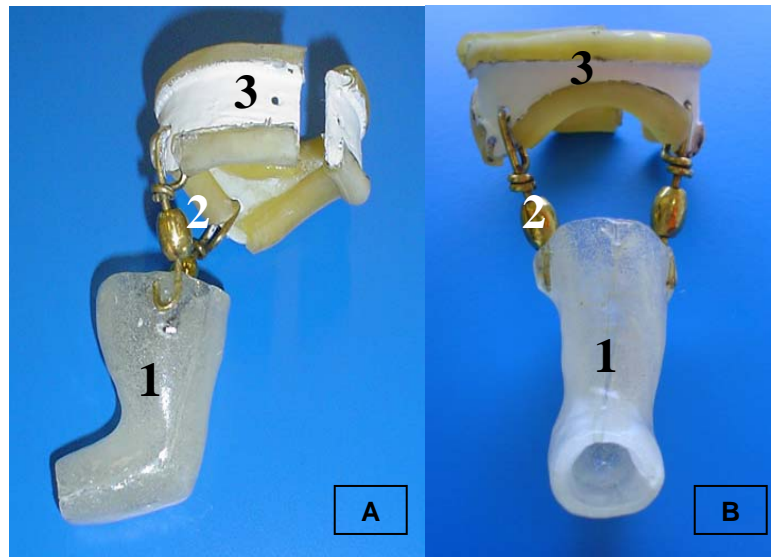


Figura 1. Vista lateral (A) e anterior (B) da órtese composta pelo modelo de resina acrílica (1), rotadores laterais (2) e cinta abdominal (3).

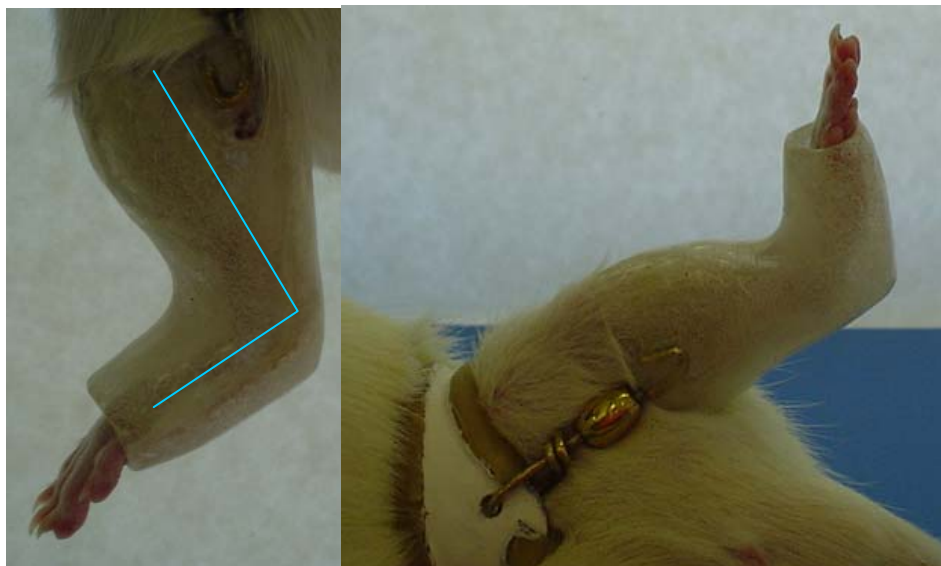


Figura 2. Órtese adaptada no membro posterior do animal, mantendo o ângulo de 90° da articulação do tornozelo.



Figura 3. Vista superior do animal com a órtese adaptada no membro posterior esquerdo.



Figura 4. Órtese adaptada no membro posterior do animal, sem interferir na deambulação, permitindo a descarga de peso no membro imobilizado.

4.3.4. ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA NEUROMUSCULAR

Os animais foram anestesiados e o membro posterior esquerdo tricotomizado para garantir uma maior efetividade da estimulação e do posicionamento dos eletrodos. Os músculos sóleo e gastrocnêmio dos grupos que receberam estimulação elétrica neuromuscular foram submetidos à sessão diária de 20 minutos, por um período de 7 dias, iniciado 24 horas após a imobilização,

sendo que um eletrodo foi colocado na região inguinal e o outro no músculo tríceps sural (figura 5), ressaltando que no membro imobilizado este segundo eletrodo foi acoplado dentro da órtese (figura 6). A frequência estabelecida foi de 10Hz, devido à ênfase ser dada ao músculo sóleo, constituído principalmente por fibras do tipo I (contração lenta) e a largura de fase de 0.4 ms. A intensidade da corrente foi padronizada em 5.0 mA, a partir da visualização da contração muscular, sendo que a cada 5 minutos foi aplicado um acréscimo de 1.0 mA à corrente para não haver acomodação.

O equipamento utilizado para a estimulação elétrica neuromuscular foi o Dualpex 961 (figura 7), além de dois eletrodos de silicone-carbono com 1 cm² cada e gel de acoplamento.

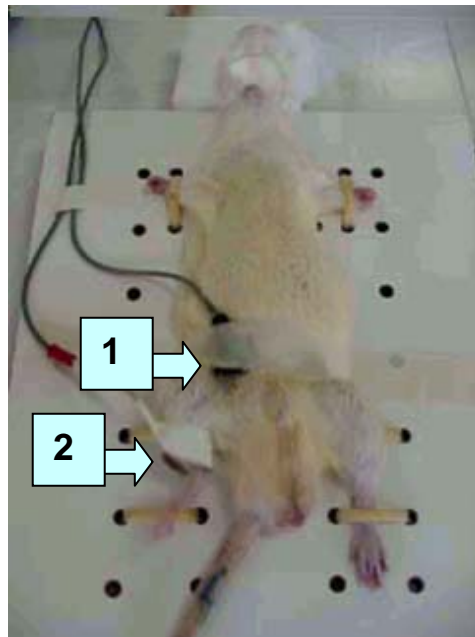


Figura 5. Posicionamento dos eletrodos para a aplicação da estimulação elétrica neuromuscular no membro posterior do grupo controle, sendo um eletrodo na região inguinal (eletrodo 1) e outro na porção posterior da perna (eletrodo 2).

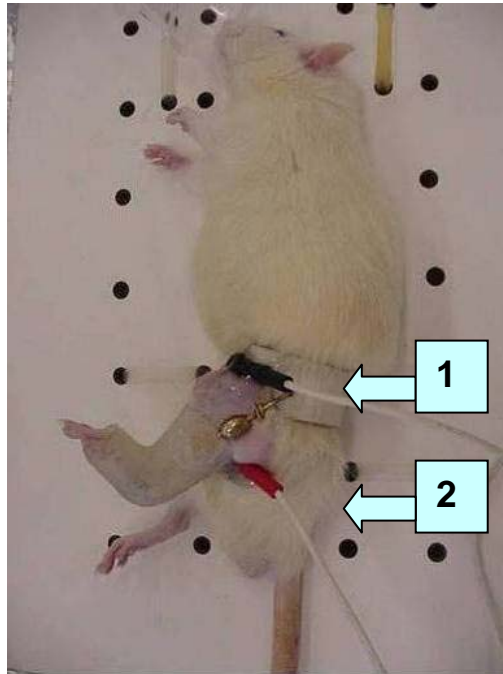


Figura 6. Posicionamento dos eletrodos para a aplicação da estimulação elétrica neuromuscular no membro posterior imobilizado, sendo um eletrodo na região inguinal (eletrodo 1) e outro na porção posterior da perna, acoplado dentro da órtese (eletrodo 2).

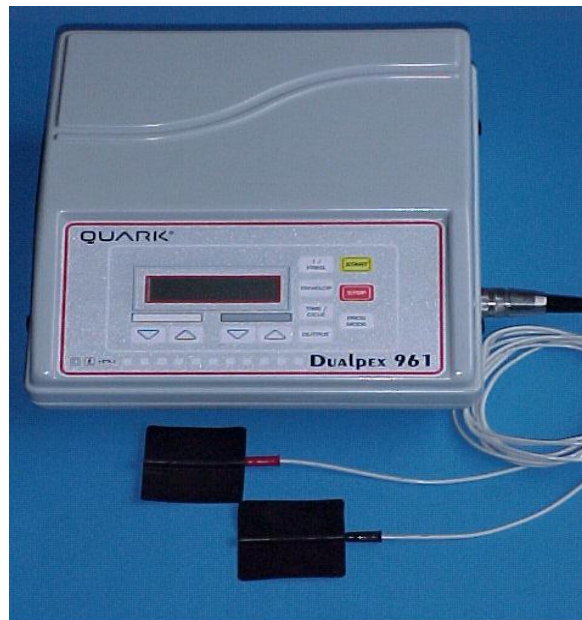


Figura 7. Equipamento Dualpex 961 (Quark®) utilizado para a realização da estimulação elétrica neuromuscular.

4.4. AMOSTRAGEM DO TECIDO MUSCULAR E HEPÁTICO

Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e os músculos sóleo, porção branca do gastrocnêmio, porção vermelha do gastrocnêmio, tibial anterior e extensor longo dos dedos foram isolados, retirados e encaminhados para as avaliações do conteúdo de glicogênio e proteínas totais, sendo que os músculos sóleo e extensor longo dos dedos também passaram pela avaliação do peso.

O fígado também foi coletado para avaliação do conteúdo de glicogênio.

4.5. DETERMINAÇÃO DO GLICOGÊNIO MUSCULAR

Para a determinação do glicogênio muscular seguiu-se a proposta de Siu et al., (1970), que consta da digestão das amostras musculares em KOH 30% a quente e o glicogênio precipitado a partir da passagem por etanol a quente. Entre uma fase e outra da precipitação, a amostra foi centrifugada a 3000 rpm (rotação por minuto) durante 15 minutos. O glicogênio precipitado foi submetido à hidrólise ácida na presença de fenol. Os valores foram expressos em mg/100 mg de peso úmido.

4.6. TESTE DE TOLERÂNCIA À GLICOSE (GTT):

Para o GTT os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico (40 mg/Kg de peso) e após 40 minutos foi feita uma incisão próxima à veia femoral por onde foi coletada amostra de sangue. 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 e a glicemia avaliada pelo método enzimático do kit laboratorial da marca Labtest diagnóstica®.

4.7. TESTE DE TOLERÂNCIA À INSULINA (ITT):

Para o ITT os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico (40 mg/Kg de peso) e após 40 minutos foi feita uma incisão próximo à veia femural por onde foi coletada amostra de sangue. 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 e a glicemia avaliada pelo método enzimático do kit laboratorial da marca Labtest diagnóstica[®].

4.8. FREQUÊNCIA CARDÍACA

Foi mensurada pelo método de isolamento do átrio direito do coração dos ratos, realizado no Laboratório de Stress da UNICAMP – FOP (Faculdade de Odontologia de Piracicaba).

Para realização deste experimento, os animais foram anestesiados por inalação de halotano a 2% e sacrificados, sob efeito do anestésico, por secção dos vasos cervicais (ZANESCO et al., 1997). Em seguida, o tórax foi aberto e o coração removido. O átrio direito foi excisado e preparado para registro isométrico das contrações espontâneas, sob tensão diastólica de 0.5 gf (grama força), em câmara para órgãos isolados, contendo 20 mL de solução de Krebs-Henseleit, com a seguinte composição [mM]: NaCl 115,0; KCl 4,7; CaCl₂.2H₂O 2,5; KH₂PO₄ 1,2; MgSO₄.7H₂O 2,5; NaHCO₃ 25,0; glicose 11,0; EDTA 0,04; ácido ascórbico 0,11. O líquido de incubação foi borbulhado continuamente com 95% de O₂ e 5% de CO₂ e a temperatura mantida a 36,5 ± 0,1°C, utilizando-se uma bomba de perfusão. Para registro das concentrações espontâneas foi utilizado um transdutor isométrico de tensão acoplado a um polígrafo (Ugo-Basile).

A estabilização da frequência de batimentos do átrio direito isolado foi determinada por variações de frequência menores que 5 batimentos por minuto, durante 15 minutos, com contagens sucessivas a cada 5 minutos. Durante o período de incubação, o líquido foi substituído a cada intervalo de 15 minutos.

4.9. ÁCIDOS GRAXOS LIVRES

Os animais foram anestesiados e o sangue foi coletado pela veia renal, centrifugado e o plasma separado para a avaliação pelo método de Regouw (1971), pelo qual se adiciona um líquido extrator às amostras, seguido de centrifugação, uma mistura reagente (nitrato de cobre, trietanolamina, hidróxido de sódio e água destilada) seguida de centrifugação e um reagente cromogênico (dietilditiocarbamato de sódio e butanol secundário), sendo a absorbância lida em espectrofotômetro em filtro de 435 nm e o ácido palmítico considerado como padrão.

4.10. PROTEÍNAS TOTAIS

Amostras dos músculos foram separadas para a avaliação de determinação das proteínas totais pelo kit laboratorial da marca bio Diagnóstica[®].

4.11. FRAGILIDADE OSMÓTICA

Foi preparada uma solução mãe de NaCl (cloreto de sódio) equivalente a 100 g/L. Esta solução foi colocada em balões volumétricos separados, conforme a concentração que foi analisada, sendo: 3,5; 4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5 mL da solução mãe associada à água destilada suficiente para completar 100 mL. Após, foi colocado 5 mL de cada solução em cada tubo e adicionado 0,5 mL de sangue total coletado pela veia renal. Depois de homogeneizado, as amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 1200-1500 rpm. O grau de hemólise foi medido no sobrenadante em espectrofotômetro em 540 nm, sendo o tubo NaCl 0,65% considerado como branco. O cálculo para a porcentagem de hemólise foi calculada pela densidade óptica do tubo desconhecido multiplicado por 100 e dividido pela densidade óptica do tubo com NaCl a 0,35%.

4.12. PERFIL HEMATOLÓGICO

4.12.1. Hemoglobina

A dosagem de hemoglobina plasmática foi realizada por kit laboratorial da marca Labtest diagnóstica[®]. O valor foi expresso em g/dL.

4.12.2. Hematócrito

Para determinação da porcentagem de eritrócitos foi utilizado o método do microhematócrito que consiste na coleta do sangue em capilares de vidro heparinizados, os quais são centrifugados e a porcentagem de células determinada em tabela de aplicação laboratorial (LIMA et al., 1977).

4.12.3. Eritrometria

O número de eritrócitos foi determinado pela contagem de células sob microscópio e consiste no isolamento das hemáceas em pipeta de vidro contendo líquido de Hayem, agitação manual e contagem em câmara de Neubauer (LIMA et al., 1977).

4.13. CAPTAÇÃO DE 2-DEOXIGLICOSE

Esta análise foi realizada no Departamento de Educação Física, no Laboratório de Biodinâmica na UNESP de Rio Claro – SP.

Imediatamente após o sacrifício dos animais por decapitação, as patas posteriores foram retiradas. O músculo sóleo foi isolado e dividido em fatias (25 a 35 g), que foram colocadas no meio pré-incubação durante 30 minutos com gaseamento constante e depois transferidas para o meio de incubação durante 60 minutos, sendo adicionado CO₂ (15 minutos). Após, o músculo foi suspenso no

frasco e adicionado TCA (ácido tricloroacético) 20%, deixando por 3 horas para ocorrer a absorção de CO₂.

A solução contida no aparato do tubo foi colocada em frasco de cintilação (200 µL) com adição de líquido de cintilação (10 mL) para contagem da radiação beta, obtendo-se assim os resultados da oxidação da glicose. Do homogenato do tubo de cintilação foi retirado 50 µL, adicionando-o com 10 µL de líquido de cintilação para contagem da radiação beta, resultando na captação de glicose. Para avaliar a incorporação da glicose em glicogênio, o homogenato foi passado por várias etapas resultando numa solução, a qual foi transferida para tubo de cintilação com 10 mL do líquido de cintilação, também para contagem da radiação beta.

4.14. CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE GLICOSE, LACTATO, CREATININA E URÉIA.

O sangue foi retirado pela veia renal, centrifugado e o plasma separado para as avaliações de glicose e lactato por glicosímetro e lactímetro, respectivamente, e de creatinina e uréia pelos kits laboratoriais da Sigma Diagnósticos[®].

4.15. AVALIAÇÃO DIÁRIA DE INGESTA (ÁGUA E RAÇÃO) E PESO CORPORAL

Essa avaliação foi realizada no grupo tratado com clenbuterol, pela pesagem da ração e dos animais, diariamente por sete dias. A ingestão de água também foi observada por meio de garrafas com medidas em mililitros (mL).

4.16. ÍNDICE DE HIDRATAÇÃO DO MÚSCULO SÓLEO

Após a retirada do músculo sóleo, este foi pesado (peso úmido) e logo após colocado na estufa a 60°C. Em intervalos de 1 hora, o músculo foi pesado até

obter um peso constante (peso seco). Do peso inicial ao final, se obteve o índice de hidratação muscular em porcentagem.

4.17. DOSAGEM DE ÁCIDO ASCÓRBICO

A avaliação foi realizada pelo método de Mindklin & Butler (1938), que consiste na retirada da glândula supra-renal, a qual é macerada no ácido perclórico seguida da adição de ácido metafosfórico. O conteúdo é filtrado, retirando-se uma amostra na qual se adiciona novamente ácido metafosfórico e uma solução que será utilizada para as leituras, preparada com 2,6-diclorofenol indofen (corante) e acetato de sódio com ácido acético (tampão). As amostras e os padrões (obtidos com ácido ascórbico) são levados para a leitura da absorvância em espectrofotômetro em filtro de 520nm.

4.18. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Primeiramente, os dados passaram pelo teste de normalidade Shapiro Wilk (software JMP) e, se apresentaram normais, passaram pela análise de variância para médias independentes. Quando a análise de variância mostrou-se significativa, o teste “t” de student foi aplicado para a comparação das médias. Em todos os cálculos foi fixado o nível crítico de 5% ($p < 0,05$).

As exceções foram os testes GTT e ITT. Para o teste GTT a variável analisada foi a área sob a curva glicêmica. Foi feita a curva de cada animal e assim calculada a respectiva área, seguido pelo cálculo da média da área de cada grupo, passando pela comparação das médias dos grupos pelo teste t ($p < 0,05$).

Para o teste ITT a variável analisada foi a porcentagem de decaimento (Kitt). Foi calculada a porcentagem de cada animal e após calculada a média dessa variável, a qual foi comparada com a média do outro grupo pelo teste t ($p < 0,05$).

O teste de fragilidade osmótica foi realizado comparando o comportamento da curva do grupo controle com a do grupo tratado com clembuterol.

O programa utilizado para todos os testes foi o Origin[®] 6.0.

5. RESULTADOS

5. RESULTADOS

Na primeira fase deste trabalho foi realizado um experimento piloto constituído de três grupos, com animais que tiveram a pata esquerda imobilizada com a órtese de resina acrílica, mantendo a posição neutra do tornozelo e diferenciados pelo período da imobilização, sendo de 3, 7 e 15 dias.

Após o período experimental e a análise dos resultados, constatou-se que o maior comprometimento metabólico se encontrava nos grupos de 7 e 15 dias. Porém, a maior redução da massa muscular do sóleo e do extensor longo dos dedos foi observada no grupo que teve a pata imobilizada durante 7 dias (CANCELLIERO, comunicação pessoal).

A partir dessa constatação, o objetivo do trabalho foi fazer uma avaliação mais ampla da imobilização durante 7 dias, além de buscar metodologia para minimizar as alterações deflagradas por meio de dois recursos, sendo um bastante utilizado pela fisioterapia em distúrbios músculo-esqueléticos, a estimulação elétrica neuromuscular, e o outro usado pela medicina em casos clínicos com presença de atrofia muscular, o fármaco clenbuterol.

Com relação ao perfil energético da musculatura esquelética submetida durante 7 dias à imobilização do membro posterior, houve significativa diminuição na concentração de glicogênio muscular (mg/100mg), representado por redução de 31,6% (média±epm, C: $0,38\pm 0,03$ e I: $0,26\pm 0,02$, $p<0,05$) no músculo sóleo, 56,6% (C: $0,46\pm 0,02$ e I: $0,20\pm 0,02$, $p<0,05$) no gastrocnêmio branco, 39% (C: $0,41\pm 0,01$ e I: $0,25\pm 0,03$, $p<0,05$) no gastrocnêmio vermelho, 41,7% (C: $0,36\pm 0,03$ e I: $0,21\pm 0,02$, $p<0,05$) no extensor longo dos dedos e 45,2% (C: $0,31\pm 0,03$ e I: $0,17\pm 0,02$, $p<0,05$) no tibial anterior, sugerindo uma integração funcional entre a homeostasia no processo contrátil das fibras e o controle no metabolismo muscular dos carboidratos (figura 8).

Um ponto merecedor de destaque é a alteração no peso muscular (mg) induzido pela imobilização nesse período. Para esta avaliação, foram escolhidos os músculos sóleo e extensor longo dos dedos, sendo observado redução de 34% (média±epm, C: $123,5\pm 2,1$ e I: $81,3\pm 1,89$, $p<0,05$) e 27% (C: $120,6\pm 8,5$ e I:

88,1±7,8, $p < 0,05$), respectivamente, sugerindo que se trata de dois eventos integrados e representados pela proteólise desencadeada pelo desuso, associada à mobilização de reservas energéticas osmoticamente ativas (figura 9).

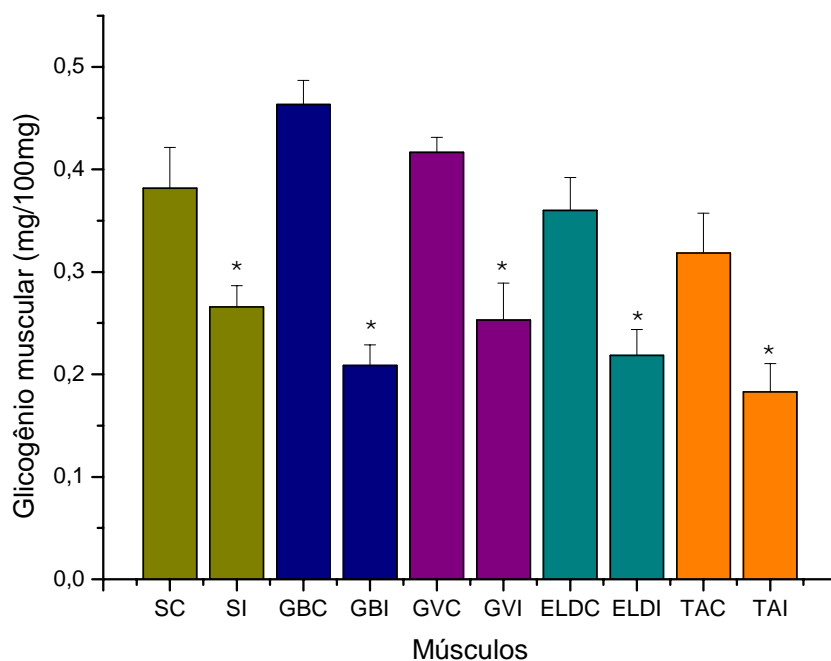


Figura 8. Valor da média \pm epm da concentração de glicogênio (mg/100mg) dos músculos sóleo (S), gastrocnêmio branco (GB), gastrocnêmio vermelho (GV), extensor longo dos dedos (ELD) e tibial anterior (TA) dos grupos controle (C) e imobilizado (I). $n=6$, $p < 0,05$, * comparado ao respectivo C.

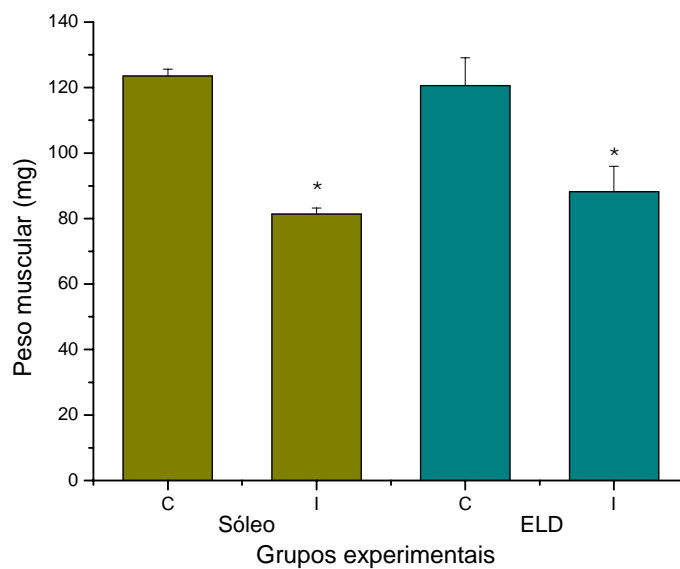


Figura 9. Valor da média \pm epm do peso (mg) dos músculos sóleo (S) e extensor longo dos dedos (ELD) dos grupos controle (C) e imobilizado (I). $n=6$, $p<0,05$, * comparado ao respectivo C.

Diversos cientistas buscam aprimorar seus conhecimentos no intuito de entender as alterações funcionais, fisiológicas, estruturais e bioquímicas que são desencadeadas frente à imobilização, visto que a base etiológica da atrofia da musculatura esquelética imobilizada ainda não é conhecida.

A partir das alterações desencadeadas no músculo sob essa condição, o trabalho teve como foco caracterizar o perfil quimio-metabólico da musculatura sob a condição de desuso muscular na fase aguda. Primeiramente foi avaliada a captação de 2-deoxiglicose ($\mu\text{mol/g.h}$) pelo músculo sóleo imobilizado, e verificou-se que este apresentou aumento significativo de 17% (média \pm epm, C: $5,74\pm 0,33$ e I: $6,72\pm 0,27$, $p<0,05$), quando comparado ao grupo controle, porém a pata contralateral não apresentou diferença quando comparada ao controle (figura 10). A seguir, foram analisadas duas vias ligadas ao metabolismo da glicose, ou seja, a síntese de glicogênio e a oxidação. A avaliação da síntese de glicogênio não mostrou diferença ($p>0,05$) entre os grupos (figura 11). Por outro lado, no que

tange à oxidação ($\mu\text{mol/g.h}$) foi observado aumento de 52% (C: $4,12\pm 0,71$ e I: $6,29\pm 0,74$, $p<0,05$) no sóleo imobilizado e de 56% (C: $4,12\pm 0,71$ e CL: $6,43\pm 0,59$, $p<0,05$) no sóleo contralateral (figura 12).

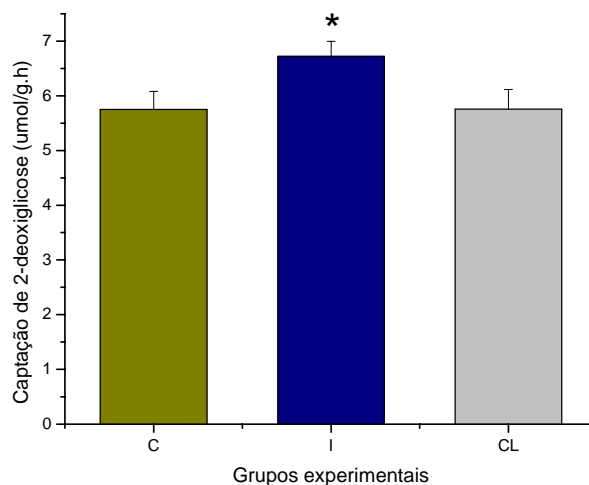


Figura 10. Valor da média \pm epm da captação de 2-deoxiglicose ($\mu\text{mol/g.h}$) do músculo sóleo dos grupos controle (C), imobilizado (I) e da pata contra-lateral do grupo imobilizado (CL). $n=4$ (10 amostras), $p<0,05$, * comparado ao C e # comparado ao I.

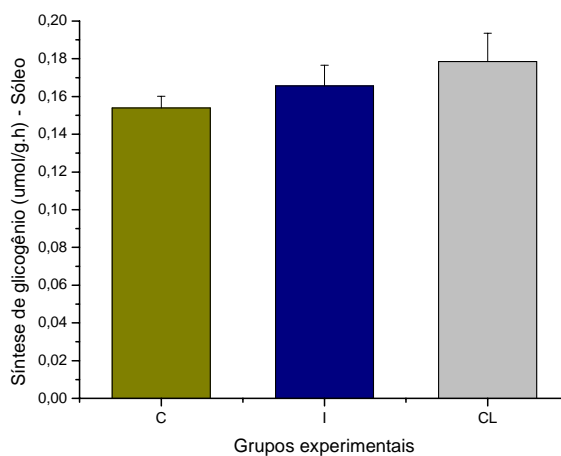


Figura 11. Valor da média \pm epm da síntese de glicogênio ($\mu\text{mol/g.h}$) do músculo sóleo dos grupos controle (C), imobilizado (I) e da pata contra-lateral do grupo imobilizado (CL). $n=4$ (10 amostras), $p<0,05$, * comparado ao C e # comparado ao I.

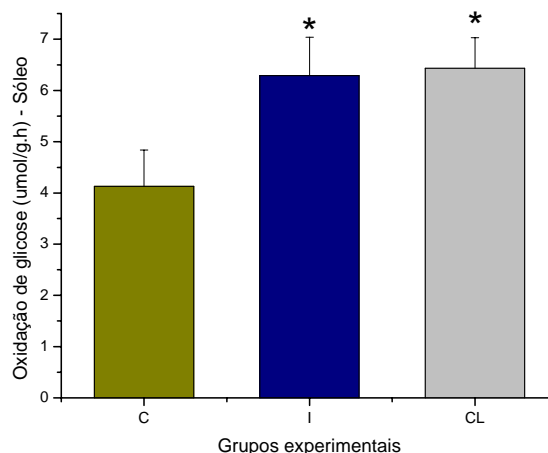


Figura 12. Valor da média \pm epm da oxidação de glicose ($\mu\text{mol/g.h}$) do músculo sóleo dos grupos controle (C), imobilizado (I) e da pata contra-lateral do grupo imobilizado (CL). $n=4$ (10 amostras), $p<0,05$, * comparado ao C e # comparado ao I.

A segunda avaliação realizada foi a análise de proteínas totais (g/dL) dos músculos do membro posterior imobilizado, abrangendo o sóleo, gastrocnêmio branco e vermelho, tibial anterior e extensor longo dos dedos. Pode-se verificar, na tabela 2, que a imobilização não alterou significativamente ($p>0,05$) essa variável em nenhum dos músculos analisados.

Tabela 2. Valor da média \pm epm da concentração de proteínas totais (g/dL) dos músculos sóleo (S), gastrocnêmio branco (GB), gastrocnêmio vermelho (GV), extensor longo dos dedos (ELD) e tibial anterior (TA) dos grupos controle e imobilizado. $n=6$, * comparado ao respectivo controle ($p<0,05$).

	S	GB	GV	ELD	TA
Controle	2,43 \pm 0,20	2,09 \pm 0,11	2,00 \pm 0,08	1,81 \pm 0,13	2,11 \pm 0,11
Imobilizado	2,29 \pm 0,15	1,93 \pm 0,07	1,92 \pm 0,15	1,99 \pm 0,17	1,99 \pm 0,25

Diante da observação do aumento da captação de glicose pelo músculo sóleo imobilizado e no contra lateral, optou-se por fazer um teste de tolerância à insulina no grupo submetido à imobilização. Neste, foi observado que a porcentagem de decaimento da glicemia foi de 3,11% no grupo controle e de 4,0±% no grupo imobilizado, não se diferenciando estatisticamente (figura 13).

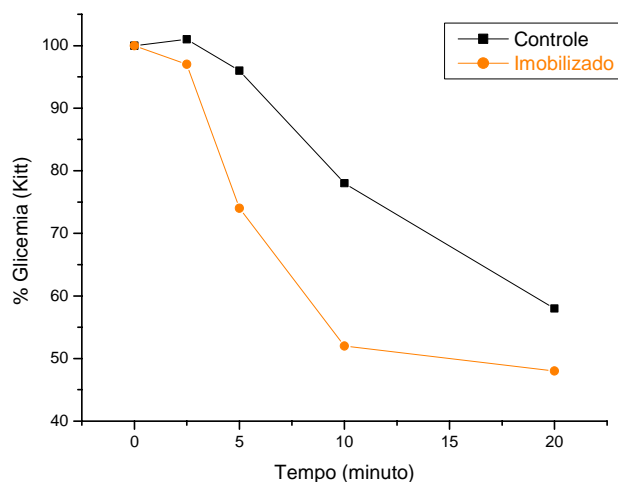


Figura 13. Teste de tolerância à insulina (ITT) aplicado nos grupos controle (n=5) e imobilizado (n=6), analisando a glicemia (mg/dL) nos tempos (em minutos) 0; 2,5; 5; 10 e 20, após a aplicação da insulina.

Outra análise realizada foi o índice de hidratação do músculo sóleo sob a condição de imobilização do membro. Foi observado que não houve diferença significativa ($p > 0,05$) na porcentagem de hidratação muscular do grupo imobilizado (média±epm, 74,89±0,28%) em relação ao grupo controle (74,59±0,27%).

Um fator preocupante foi a possibilidade da imobilização estar gerando estresse ao animal e com isso interferir nos resultados. Para isso, foi realizado a dosagem de ácido ascórbico da glândula supra-renal do grupo que teve o membro imobilizado por 3 dias. O valor médio ± epm do ácido ascórbico foi de 4,98±0,6

$\mu\text{g}/\text{mg}$ de adrenal, não se diferenciando estatisticamente ($p>0,05$) quando comparado ao grupo controle ($3,65\pm 0,4$).

As fases experimentais seguintes foram programadas para que de forma integrada e complementar possam abordar primeiramente as nuances da ação do clenbuterol na musculatura esquelética sem esquecer da possível interação com outros tecidos alvos da modulação adrenérgica.

Dentre os diferentes recursos ergogênicos plausíveis de utilização, se optou por estudar o clenbuterol, agonista β_2 adrenérgico, pois, segundo a literatura, apresenta propriedades anabólicas. Porém, como este poderia estar trazendo efeitos colaterais, a opção inicial foi avaliar suas ações sistêmicas para validar de forma mais segura o tratamento.

Assim, foram avaliadas as ações do clenbuterol sobre os sistemas que participam dos ajustes metabólicos, principalmente sobre tecidos-alvos do agonista β_2 adrenérgico, como o fígado, tecido adiposo e eritrócitos.

Inicialmente, foi avaliado o conteúdo hepático de glicogênio ($\text{mg}/100\text{mg}$) e como pode ser observado na figura 14 não houve diferença estatística entre os grupos controle e tratado ($\text{média}\pm\text{epm}$, C: $5,06\pm 0,1$, Cle: $4,31\pm 0,3$, $p<0,05$).

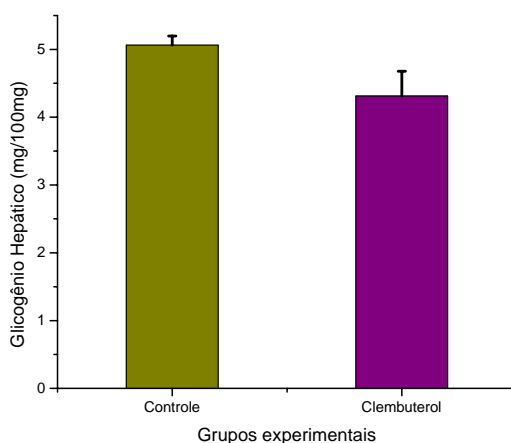


Figura 14. Valor da média \pm epm da concentração hepática de glicogênio ($\text{mg}/100\text{mg}$) dos grupos controle e tratado com clenbuterol. $n=6$, $p<0,05$, * comparado ao controle.

Dentro da proposta, tornou-se sugestivo o fato do agonista adrenérgico exercer ação sobre a homeostasia dos adipócitos. Neste sentido, foi avaliada a concentração plasmática de ácidos graxos livres (mmol/L) e como se pode verificar na figura 15, a concentração plasmática foi significativamente elevada em 229,8% demonstrando lipólise na presença do clenbuterol (média±epm, C: $0,47 \pm 0,01$, Cle: $1,55 \pm 0,37$, $p < 0,05$).

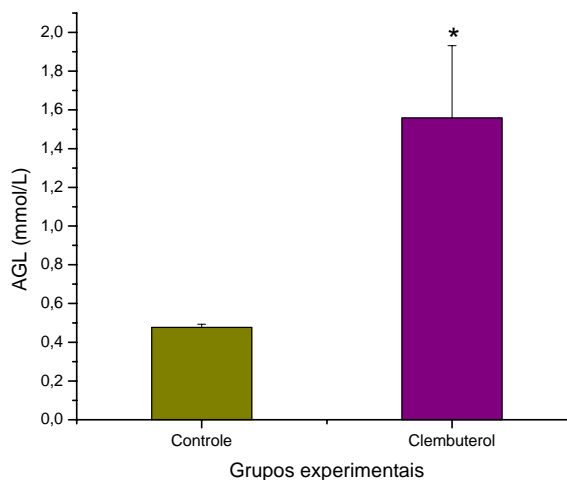


Figura 15. Valor da média \pm epm da concentração plasmática de ácidos graxos livres (mmol/L) dos grupos controle e tratado com clenbuterol. $n=6$, $p < 0,05$ * comparado ao controle.

Frente ao observado, surgiu a necessidade de avaliar o comportamento da frequência cardíaca (batimentos/minuto) de átrios isolados de ratos tratados com clenbuterol. Na figura 16 pode-se observar que o grupo tratado não diferiu do controle (média±epm, C: $273,7 \pm 6,2$, Cle: $282,5 \pm 6,4$, $p > 0,05$).

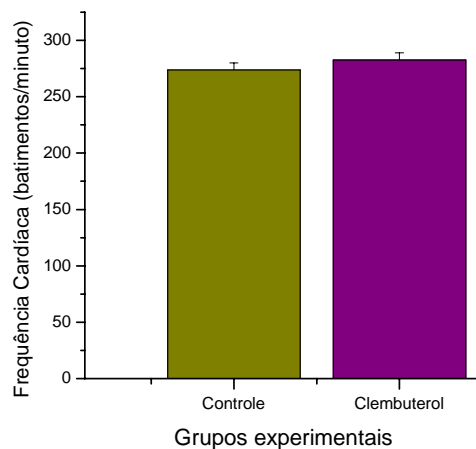


Figura 16. Valor da média \pm epm da frequência cardíaca (batimentos/minuto) dos grupos controle e tratado com clenbuterol. $n=8$, $p<0,05$, * comparado ao controle.

Trabalhos realizados na década de 90 destacaram a presença de receptores β_2 adrenérgicos na membrana de eritrócitos com ação glicogenolítica apontando para a participação destas células no ajuste glicêmico, principalmente em situações quando a necessidade de uma maior disponibilidade de glicose torna-se elevada. Para dirimir esta dúvida, o experimento foi direcionado no intuito de avaliar a fragilidade osmótica das hemácias, visto que a capacidade de resistir a uma pequena variação na osmolaridade do meio está diretamente relacionada ao conteúdo de moléculas osmoticamente ativas presentes no citosol.

A figura 17 mostra que o comportamento osmótico dos eritrócitos controle não se difere daqueles coletados de ratos tratados com clenbuterol.

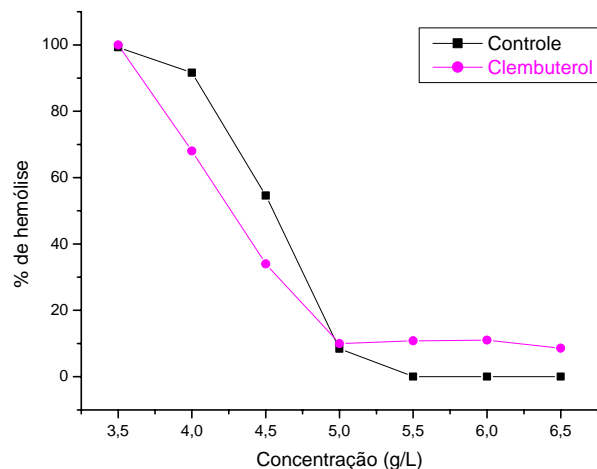


Figura 17. Teste de fragilidade osmótica nos grupos controle e tratado com clenbuterol. n=6.

Após constatar o efeito do clenbuterol sobre a resposta das hemáceas à variação hiposmótica, optou-se por determinar o perfil hematológico dos ratos tratados e como se pode observar na tabela 3 o tratamento não promoveu alteração no hematócrito, eritrometria e na concentração de hemoglobina em comparação com valores considerados normais ($p > 0,05$) pelo *Canadian Council on Animal Care* (1980).

Tabela 3. Perfil hematológico do grupo controle e tratado com clenbuterol (n=6), constando-se de eritrometria (10^6), hematócrito (%), hemoglobina (g/dL). Os valores do grupo controle são baseados no *CANADIAN COUNCIL ON ANIMAL CARE* (Guide to the care and use of experimental animals, Vol I, 1980). $p < 0,05$, * comparado ao respectivo controle.

	Eritrometria	Hematócrito	Hemoglobina
Controle	6 - 10	40 - 50	11,0 - 17,0
Clenbuterol	8,13±0,14	39±1	11,7±0,2

Em seguida foi avaliado o padrão bioquímico plasmático dos ratos submetidos ao tratamento com clenbuterol, enfocando as concentrações plasmáticas de glicose (mg/dL), lactato (mmol/L), uréia (mg/dL) e creatinina (mg/dL). A tabela 4 mostra que não houve diferença comparada ao grupo controle ($p>0,05$).

Tabela 4. Concentração plasmática de glicose (mg/dL), lactato (mmol/L), uréia (mg/dL) e creatinina (mg/dL) dos grupos controle (C) e tratado com clenbuterol. n=6, $p<0,05$, * comparado ao respectivo C.

	<i>Glicose</i>	<i>Lactato</i>	<i>Uréia</i>	<i>Creatinina</i>
Controle	104,6±5,1	1,97±0,08	44,5±1,04	0,56±0,03
Clenbuterol	88,8±4,8	2,60±0,19*	41,6±1,56	0,48±0,06

O padrão glicêmico é determinado pelo equilíbrio entre a concentração plasmática de secretagogos ou inibidores da secreção de insulina. Assim, as células β pancreáticas apresentam uma grande variação na sua atividade imposta pelo perfil de substratos circulantes. Uma vez que o sistema nervoso autônomo exerce ação moduladora sobre a atividade secretória, optou-se por realizar um teste de tolerância à glicose para avaliar a resposta das células β frente a uma sobrecarga de glicose.

No teste de tolerância à glicose (GTT) a variável analisada foi a área sob a curva, a qual foi formada pela variação na concentração glicêmica (mg/dL), nos tempos, em minutos, 0 (momento da aplicação da glicose), 5, 10, 15, 20, 30 e 60 (após a aplicação da glicose). O grupo tratado com clenbuterol mostrou uma área estatisticamente maior (11.042 ± 522 , $p<0,05$) do que o grupo controle (8.102 ± 348), conforme mostra a figura 18.

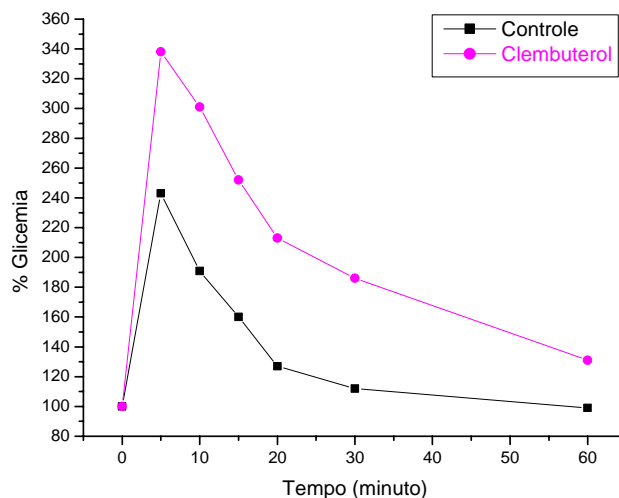


Figura 18. Teste de tolerância à glicose (GTT) aplicado nos grupos controle (n=5) e tratado com clembuterol (n=5), analisando a glicemia (mg/dL) nos tempos (em minutos) 0, 5, 10, 15, 20, 30 e 60, após a sobrecarga da glicose.

Uma vez que a resposta da célula β à sobrecarga de glicose mostrou-se alterada, optou-se por realizar um teste de tolerância à insulina (ITT) para avaliar a sensibilidade tecidual.

O ITT está representado pela porcentagem de decaimento da glicemia (Kitt) na presença da insulina, sendo analisados os tempos, em minutos, 0 (seguido da aplicação da insulina); 2,5; 5; 10 e 20 (após a aplicação da insulina). A figura 19 mostra que o grupo tratado teve um maior valor (média \pm epm, $6,67\pm 0,23\%$, $p<0,05$) na porcentagem de decaimento da glicemia, quando comparado ao controle ($3,11\pm 0,88\%$). Isso mostra que o clembuterol alterou a sensibilidade à insulina, pois a velocidade de redução da glicemia se apresentou maior.

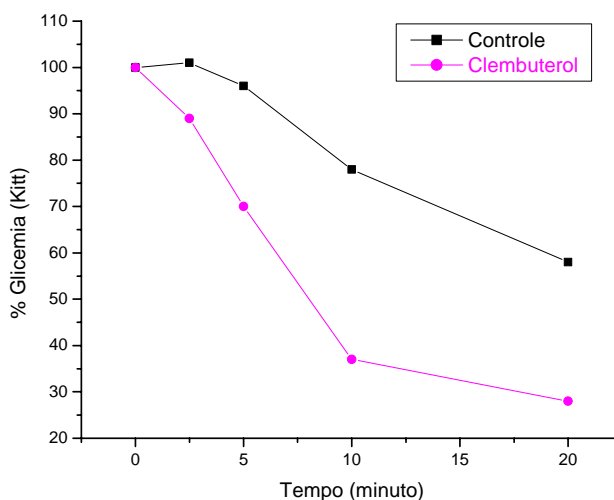


Figura 19. Teste de tolerância à insulina (ITT) aplicado nos grupos controle (n=5) e tratado com clenbuterol (n=5), analisando a glicemia (mg/dL) nos tempos (em minutos) 0; 2,5; 5; 10 e 20, após a aplicação da insulina.

Outro aspecto avaliado foi a ingesta de água e ração dos animais tratados com o agonista β_2 adrenérgico, devido à possibilidade do tratamento levar à diminuição da ingesta alimentar. Porém, não houve diferença estatística nas ingestas líquida (média \pm epm diária em mL; C: 34 \pm 1,22, Cle: 36 \pm 1,1, p>0,05) e sólida (média \pm epm diária em gramas; C: 28 \pm 0,40, Cle: 24,3 \pm 0,59, p>0,05) em relação ao grupo controle.

É importante observar, que o tratamento também não promoveu alteração no peso corporal dos animais no decorrer do tratamento durante 7 dias, tendo uma média \pm epm de 364,13 \pm 13,3 gramas.

Estando os parâmetros dentro da normalidade, e demonstrando que a dose utilizada não inviabilizou o tratamento, o clenbuterol foi administrado primeiramente na musculatura normal. Neste sentido, foi avaliada sua ação sobre o conteúdo de glicogênio muscular (mg/100mg) e foi observado que o mesmo promoveu um aumento significativo de 81,6% (média \pm epm, C: 0,38 \pm 0,03, Cle: 0,69 \pm 0,06, p<0,05) no músculo sóleo, 58,7% (C: 0,46 \pm 0,02, Cle: 0,73 \pm 0,1, p<0,05)

no gastrocnêmio branco, 65,8% (C: $0,41 \pm 0,01$, Cle: $0,68 \pm 0,1$, $p < 0,05$) no gastrocnêmio vermelho, 77,8% (C: $0,36 \pm 0,03$, Cle: $0,64 \pm 0,03$, $p < 0,05$) no extensor longo dos dedos e 61,3% (C: $0,31 \pm 0,03$, Cle: $0,50 \pm 0,03$, $p < 0,05$) no tibial anterior, mostrando que na musculatura, as vias glicogênicas são potencializadas na presença do agonista β_2 adrenérgico (figuras 20 a 24). Neste ínterim, foi avaliado o peso muscular (mg) na presença do clenbuterol e observado elevação significativa de 21,4% (C: $123,5 \pm 2,1$, Cle: $150 \pm 5,05$, $p < 0,05$) no sóleo e de 35,2% (C: $120,6 \pm 8,5$, Cle: $163,1 \pm 4,05$, $p < 0,05$) no extensor longo dos dedos (figuras 25 e 26).

Depois de observado a ação glicogênica do clenbuterol, passou-se a avaliar se sua ação também manifesta-se na musculatura sob a condição de imobilização em posição neutra da articulação do tornozelo. Nesta condição, o clenbuterol também foi eficaz em aumentar as reservas (mg/100mg), atingindo 92,3% (média \pm epm, I: $0,26 \pm 0,02$, ICle: $0,50 \pm 0,06$, $p < 0,05$) no sóleo, 150% (I: $0,20 \pm 0,02$, ICle: $0,50 \pm 0,06$, $p < 0,05$) no gastrocnêmio branco, 48% (I: $0,25 \pm 0,03$, ICle: $0,37 \pm 0,06$, $p < 0,05$) no gastrocnêmio vermelho, 9,5% (I: $0,21 \pm 0,02$, ICle: $0,23 \pm 0,03$, $p > 0,05$) no extensor longo dos dedos e 17,6% (I: $0,17 \pm 0,02$, ICle: $0,20 \pm 0,02$, $p > 0,05$) no tibial anterior (figuras 20 a 24). Cabe ressaltar que, neste grupo imobilizado, o clenbuterol também influenciou significativamente no peso (mg) atingindo valores maiores se comparados aos não tratados (15,7% (I: $81,3 \pm 1,89$, ICle: $94,1 \pm 1,7$, $p < 0,05$) no sóleo e 27,5% (I: $88,1 \pm 7,8$, ICle: $112,3 \pm 4,3$, $p < 0,05$) no extensor longo dos dedos) (figuras 25 e 26).

Após a observação da melhora na massa e perfil energético muscular, foi realizada a análise de proteínas totais na musculatura tratada com o clenbuterol, porém, conforme a tabela 5, não houve diferença estatística ($p > 0,05$) em nenhum dos músculos analisados em relação ao grupo controle.

Tabela 5. Valor da média \pm epm da concentração de proteínas totais dos músculos sóleo (S), gastrocnêmio branco (GB), gastrocnêmio vermelho (GV), extensor longo dos dedos (ELD) e tibial anterior (TA) dos grupos controle e tratado com clenbuterol. n=6, * comparado ao respectivo controle ($p < 0,05$).

	S	GB	GV	ELD	TA
Controle	2,43 \pm 0,20	2,09 \pm 0,11	2,00 \pm 0,08	1,81 \pm 0,13	2,11 \pm 0,11
Clenbuterol	1,92 \pm 0,05	1,99 \pm 0,08	2,00 \pm 0,05	1,97 \pm 0,05	2,08 \pm 0,02

Outro aspecto analisado foi o índice de hidratação do músculo sóleo tratado com clenbuterol, para observar se o tratamento estava promovendo a retenção líquida e conseqüentemente o aumento do peso muscular, porém o índice de hidratação do grupo tratado não foi diferente do grupo controle (média \pm epm, Cle: 72,48 \pm 0,49% e C: 74,59 \pm 0,27%).

Ao analisar os dados até aqui apresentados, ficou sugestivo o fato de se inserir na análise um protocolo de estimulação elétrica neuromuscular, enquanto recurso fisioterapêutico, que poderia auxiliar na dinâmica quimio-metabólica das fibras.

Ao avaliar o comportamento das reservas musculares de glicogênio em músculos submetidos a tratamento com estimulação elétrica neuromuscular, foi verificado que houve um significativo aumento nas reservas (mg/100mg), atingindo 42,1% (média \pm epm, C: 0,38 \pm 0,03, EE: 0,54 \pm 0,004, $p < 0,05$) no músculo sóleo, 41,3% (C: 0,46 \pm 0,02, EE: 0,65 \pm 0,04, $p < 0,05$) no gastrocnêmio branco, 17,1% (C: 0,41 \pm 0,01, EE: 0,48 \pm 0,03, $p > 0,05$) no gastrocnêmio vermelho, 11,1% (C: 0,36 \pm 0,03, EE: 0,4 \pm 0,01, $p > 0,05$) no extensor longo dos dedos e 74,2% (C: 0,31 \pm 0,03, EE: 0,54 \pm 0,04, $p < 0,05$) no tibial anterior (figuras 20 a 24), apontando para uma elevação na mobilização das reservas de glicose.

De acordo com a proposta, analisou-se o efeito do tratamento com estimulação elétrica neuromuscular sobre o conteúdo de glicogênio dos músculos imobilizados e também foi verificada elevação nas reservas, atingindo 34,6% (média \pm epm, I: 0,26 \pm 0,02, IEE: 0,35 \pm 0,02, $p < 0,05$) no sóleo, 45% (I: 0,20 \pm 0,2, IEE: 0,29 \pm 0,009, $p < 0,05$) no gastrocnêmio branco, 44% (I: 0,25 \pm 0,03, IEE:

0,36±0,01, $p<0,05$) no gastrocnêmio vermelho, 42,8% (I: 0,21±0,02, IEE: 0,3±0,01, $p<0,05$) no extensor longo dos dedos e de 29,4% (I: 0,17±0,02, IEE: 0,22±0,004, $p>0,05$) no tibial anterior (figuras 20 a 24). Com relação ao peso muscular, verificou-se que a estimulação elétrica neuromuscular, durante 7 dias, não foi eficiente em modificar significativamente ($p>0,05$) o peso de músculos normais ou imobilizados (figuras 25 e 26).

A partir da constatação de efeitos metabólicos induzidos pelo agonista β -adrenérgico e pautados nas mudanças metabólicas que a estimulação elétrica neuromuscular induziu, optou-se por associar as terapias. Neste sentido, verificou-se que em músculos normais, a associação das terapias (A) induziu a formação de um maior conteúdo glicogênico, se comparado aos tratamentos isolados, atingindo reservas 147,4% (média±epm, C: 0,38±0,03, C+A: 0,94±0,01, $p<0,05$) maiores no sóleo, 193,5% (C: 0,46±0,02, C+A: 1,35±0,1, $p<0,05$) no gastrocnêmio branco, 124,4% (C: 0,41±0,01, C+A: 0,92±0,05, $p<0,05$) no gastrocnêmio vermelho, 175% (C: 0,36±0,03, C+A: 0,99±0,08, $p<0,05$) no extensor longo dos dedos e 203,2% (C: 0,31±0,03, C+A: 0,94±0,06, $p<0,05$) no tibial anterior. Isto aponta para um efeito aditivo ou potencializador gerado pela associação das terapias (figuras 20 a 24, grupo C+A). Quanto à massa muscular, foi verificado que na associação dos tratamentos, houve aumento significativo no extensor longo dos dedos em 26,2% (C: 120,6±8,5, C+A: 152,16±8,46, $p<0,05$), diferentemente no sóleo (6,5% (C: 123,5±2,1, C+A: 131,5±8,18, $p>0,05$)), onde esse aumento não foi significativo (figuras 25 e 26, grupo C+A).

Em seguida, o tratamento associado foi realizado na musculatura imobilizada e foram constatados aumentos mais relevantes no conteúdo de glicogênio muscular, sendo de 223,1% (média±epm, I: 0,26±0,02, I+A: 0,84±0,02, $p<0,05$) no sóleo, 250% (I: 0,20±0,02, I+A: 0,70±0,04, $p<0,05$) no gastrocnêmio branco, 200% (I: 0,25±0,03, I+A: 0,75±0,07, $p<0,05$) no gastrocnêmio vermelho, 171,4% (I: 0,21±0,02, I+A: 0,57±0,04, $p<0,05$) no extensor longo dos dedos e 211,8% (I: 0,17±0,02, I+A: 0,53±0,07, $p<0,05$) no tibial anterior (figuras 20 a 24, grupo I+A). A massa muscular também mostrou diferença com os tratamentos,

havendo aumento de 25,5% (I: $81,3 \pm 1,89$, I+A: $102 \pm 3,9$, $p < 0,05$) no sóleo e de 51,3% (I: $88,1 \pm 7,8$, I+A: $133,3 \pm 2,9$, $p < 0,05$) no extensor longo dos dedos (figuras 25 e 26, grupo I+A).

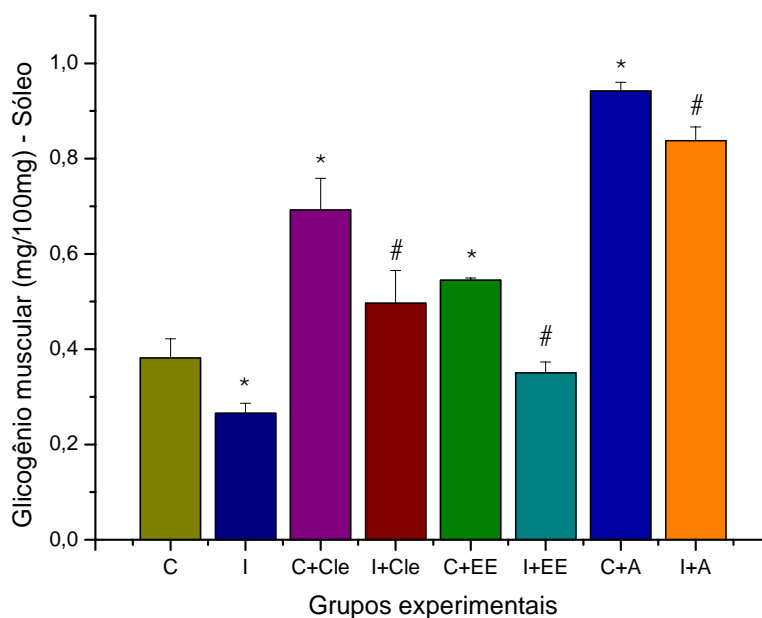


Figura 20. Valor da média \pm epm da concentração de glicogênio (mg/100mg) do músculo sóleo dos grupos controle (C), imobilizado (I), controle tratado com clenbuterol (C+Cle), imobilizado tratado com clenbuterol (I+Cle), controle tratado com estimulação elétrica neuromuscular (C+EE), imobilizado tratado com estimulação elétrica neuromuscular (I+EE), controle tratado com clenbuterol e estimulação elétrica neuromuscular (C+A), imobilizado tratado com clenbuterol e estimulação elétrica neuromuscular (I+A). $n=6$, $p < 0,05$, * comparado ao C e # comparado ao I.

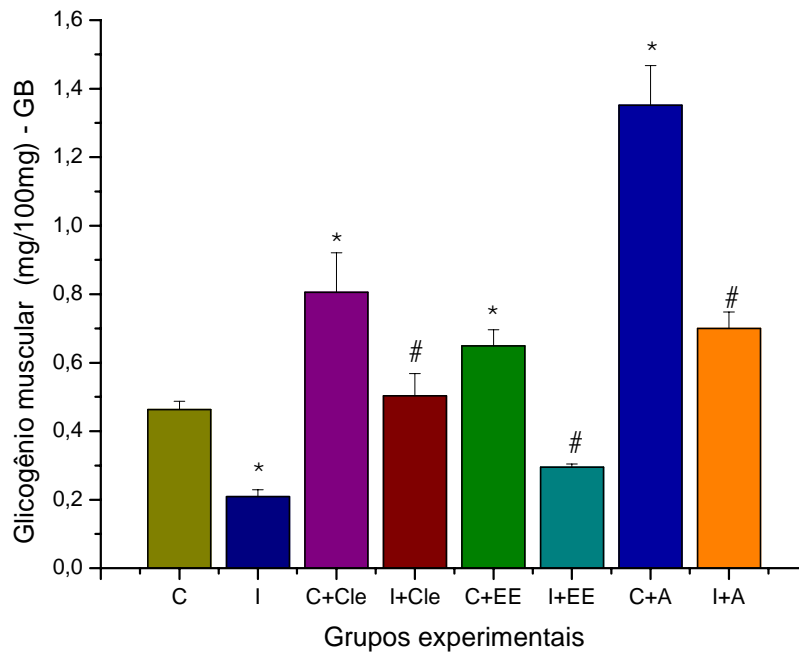


Figura 21. Valor da média \pm epm da concentração de glicogênio (mg/100mg) do músculo gastrocnêmio branco dos grupos controle (C), imobilizado (I), controle tratado com clenbuterol (C+Cle), imobilizado tratado com clenbuterol (I+Cle), controle tratado com estimulação elétrica neuromuscular (C+EE), imobilizado tratado com estimulação elétrica neuromuscular (I+EE), controle tratado com clenbuterol e estimulação elétrica neuromuscular (C+A), imobilizado tratado com clenbuterol e estimulação elétrica neuromuscular (I+A). $n=6$, $p<0,05$, * comparado ao C e # comparado ao I.

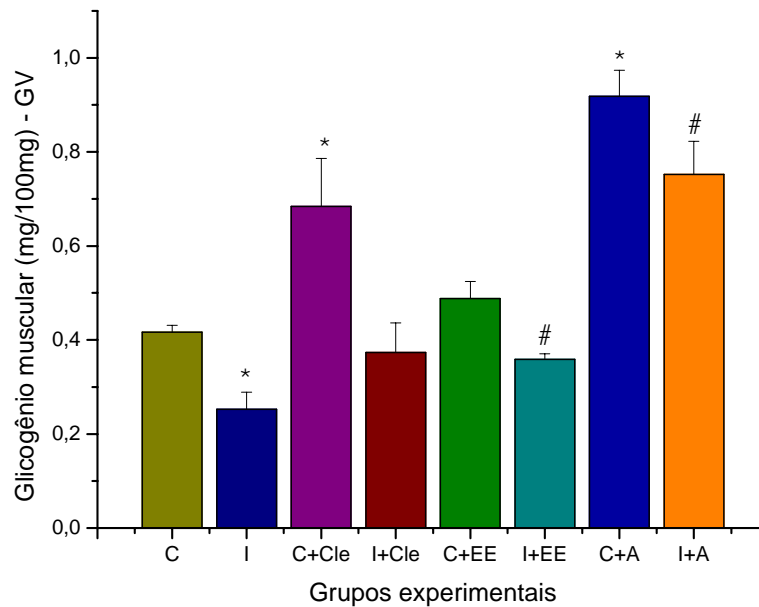


Figura 22. Valor da média \pm epm da concentração de glicogênio (mg/100mg) do músculo gastrocnêmio vermelho dos grupos controle (C), imobilizado (I), controle tratado com clenbuterol (C+Cle), imobilizado tratado com clenbuterol (I+Cle), controle tratado com estimulação elétrica neuromuscular (C+EE), imobilizado tratado com estimulação elétrica neuromuscular (I+EE), controle tratado com clenbuterol e estimulação elétrica neuromuscular (C+A), imobilizado tratado com clenbuterol e estimulação elétrica neuromuscular (I+A). $n=6$, $p<0,05$, * comparado ao C e # comparado ao I.

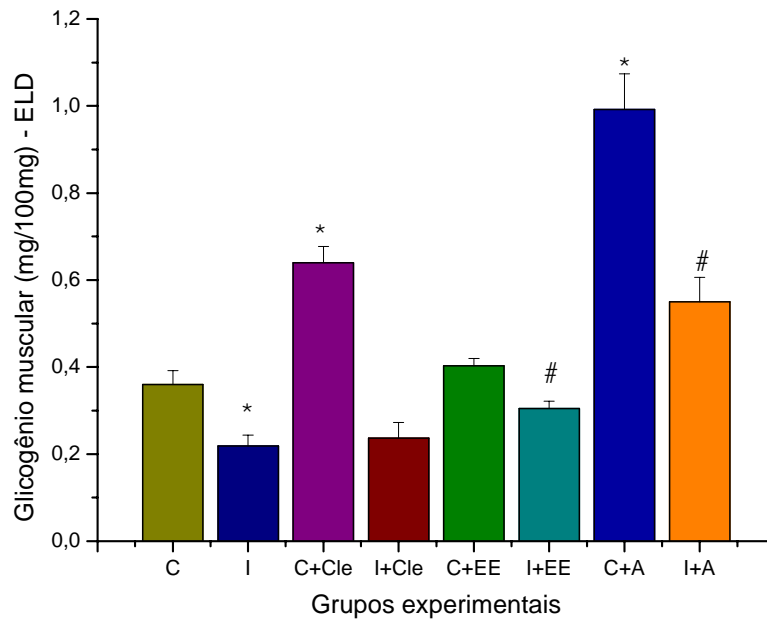


Figura 23. Valor da média \pm epm da concentração de glicogênio (mg/100mg) do músculo extensor longo dos dedos dos grupos controle (C), imobilizado (I), controle tratado com clenbuterol (C+Cle), imobilizado tratado com clenbuterol (I+Cle), controle tratado com estimulação elétrica neuromuscular (C+EE), imobilizado tratado com estimulação elétrica neuromuscular (I+EE), controle tratado com clenbuterol e estimulação elétrica neuromuscular (C+A), imobilizado tratado com clenbuterol e estimulação elétrica neuromuscular (I+A). $n=6$, $p<0,05$, * comparado ao C e # comparado ao I.

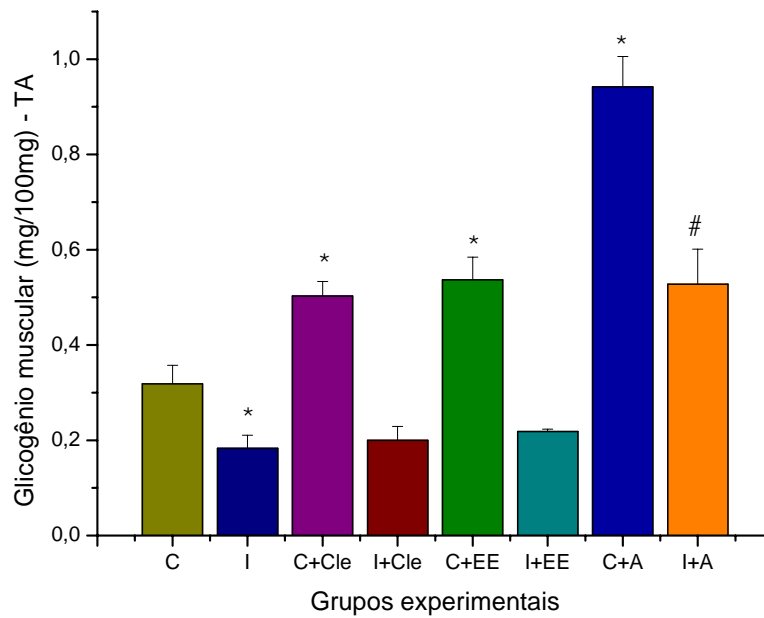


Figura 24. Valor da média \pm epm da concentração de glicogênio (mg/100mg) do músculo tibial anterior dos grupos controle (C), imobilizado (I), controle tratado com clenbuterol (C+Cle), imobilizado tratado com clenbuterol (I+Cle), controle tratado com estimulação elétrica neuromuscular (C+EE), imobilizado tratado com estimulação elétrica neuromuscular (I+EE), controle tratado com clenbuterol e estimulação elétrica neuromuscular (C+A), imobilizado tratado com clenbuterol e estimulação elétrica neuromuscular (I+A). $n=6$, $p<0,05$, * comparado ao C e # comparado ao I.

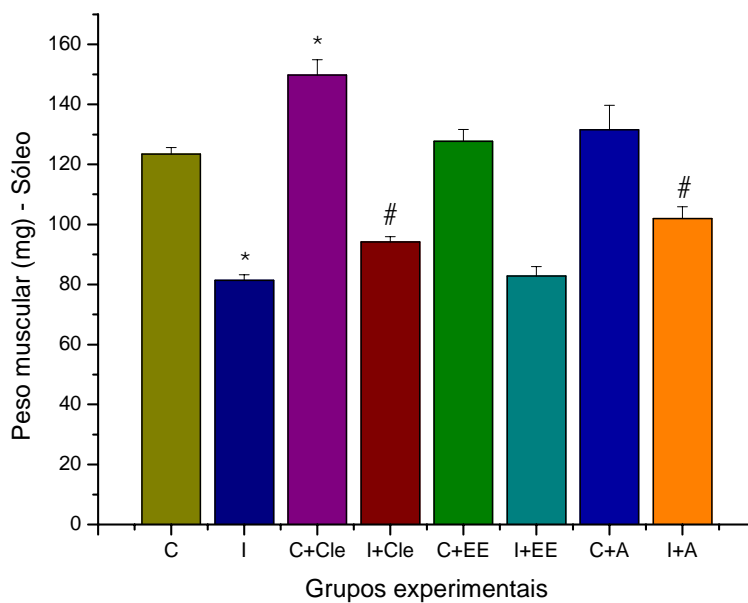


Figura 25. Valor da média \pm epm do peso muscular (mg) do sóleo dos grupos controle (C), imobilizado (I), controle tratado com clenbuterol (C+Cle), imobilizado tratado com clenbuterol (I+Cle), controle tratado com estimulação elétrica neuromuscular (C+EE), imobilizado tratado com estimulação elétrica neuromuscular (I+EE), controle tratado com clenbuterol e estimulação elétrica neuromuscular (C+A), imobilizado tratado com clenbuterol e estimulação elétrica neuromuscular (I+A). $n=6$, $p<0,05$, * comparado ao C e # comparado ao I.

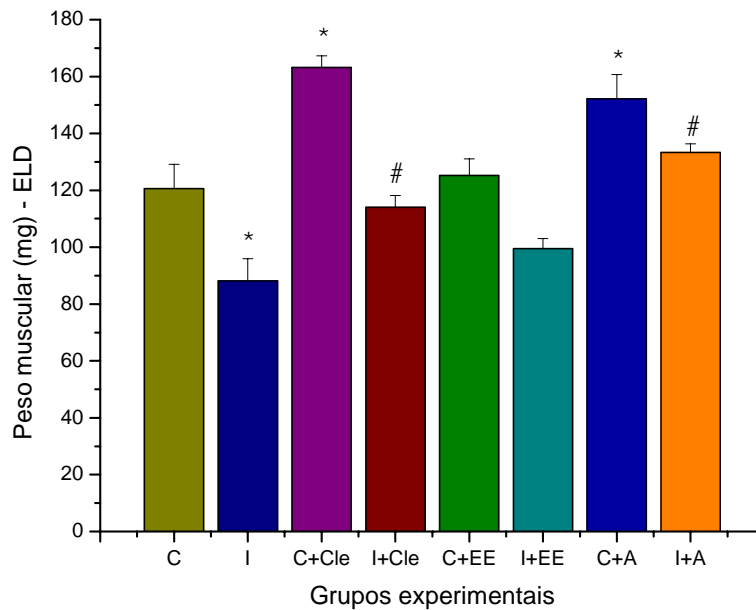


Figura 26. Valor da média \pm epm do peso muscular (mg) do extensor longo dos dedos dos grupos controle (C), imobilizado (I), controle tratado com clenbuterol (C+Cle), imobilizado tratado com clenbuterol (I+Cle), controle tratado com estimulação elétrica neuromuscular (C+EE), imobilizado tratado com estimulação elétrica neuromuscular (I+EE), controle tratado com clenbuterol e estimulação elétrica neuromuscular (C+A), imobilizado tratado com clenbuterol e estimulação elétrica neuromuscular (I+A). $n=6$, $p<0,05$, * comparado ao C e # comparado ao I.

6. DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

Sabe-se que o músculo esquelético representa de 40 a 45% do peso corporal total (GARRET, 1988), sendo um importante sítio participante do controle glicêmico, uma vez que apresenta mecanismos refinados de aporte de glicose, que é o substrato preferencialmente metabolizado.

A capacidade de captar a hexose está ligada à presença de transportadores denominados GLUTs. Dentre estes, destacam-se dois tipos, ou seja, o GLUT1 envolvido na captação basal da glicose e o GLUT4 ligado a mecanismos distintos, o dependente da insulina e o do aumento na atividade contrátil, este sem interferência da insulina (KERN et al., 1990). Após ser captada, cerca de 70 a 85% da glicose é direcionada a reservatórios de glicogênio, ou pode ainda ser oxidada e liberada na forma de lactato, alanina ou piruvato (HENRIKSEN et al., 1990). Quanto ao conteúdo muscular de glicogênio, sabe-se que é um componente importante no fornecimento de energia durante a realização do exercício (BACURAU, 2001) e que suas reservas musculares podem interferir na performance, ou seja, quando elevadas podem melhorar a resistência, porém, quando depletadas podem se associar à fadiga muscular (SHULMAN & ROTHMAN, 2000).

O desuso muscular provocado por condições de períodos longos no leito, colocação de órteses ou fixações em membros e microgravidades induzem resistência à insulina e a um estado catabólico nos músculos esqueléticos afetados de humanos (FERRANDO et al., 1996; STEIN et al., 1994).

Os sistemas biológicos apresentam diferentes mecanismos de controle destacando-se dentre eles, o controle endócrino representado pela insulina, cujo mecanismo de sinalização é constituído de uma dinâmica de amplificação de sinais, sendo que após a ligação da insulina ao receptor, uma cascata de eventos intracelulares é desencadeada. Segundo Bevan (2001) a ação da insulina, que se apresenta de maneira multifatorial, se faz por vias distintas e tem a participação da subunidade PI3-K (fosfatidilinositol 3-quinase) que é responsável pelo desencadeamento de vários mecanismos, merecendo destaque a síntese protéica, a síntese de glicogênio e a translocação dos transportadores GLUT4 para a membrana celular.

Hirose et al. (2000) estudaram a via sinalizadora da insulina em ratos que tiveram a pata esquerda imobilizada por fixação do joelho e tornozelo a 90° durante 7 dias, e verificaram redução na transdução do sinal intracelular estimulado pela insulina, sugerindo déficit na ativação do IR (receptor de insulina) e nas moléculas ativadas a partir deste, incluindo a fosforilação do IRS-1 (substrato 1 do receptor de insulina) e a ativação da PI3-K, indicando 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 redução nas reservas de glicogênio em todos os músculos analisados sob condição aguda de imobilização, por ser um dos mecanismos ativados pela subunidade PI3-K. Assim, este fato corrobora com a proposta dos autores citados referendando a efetividade do modelo de órtese utilizado.

Pautado na literatura, é importante salientar que ainda há contradição no entendimento dos efeitos da redução na atividade muscular sobre proteínas não miofibrilares causando uma especificidade na resposta, ou seja, em alguns modelos experimentais como a desnervação observa-se redução tanto na população de proteínas transportadoras de glicose do tipo GLUT4, quanto na efetividade das proteínas sinalizadoras citosólicas. No entanto, em modelos de imobilização de membros em humanos e suspensão dos membros posteriores em ratos, os estudos se contradizem com relação à expressão do GLUT4 e captação de glicose, dependendo de fatores como tempo e tipo de imobilização. Dois diferentes modelos experimentais de desuso muscular resultam em efeito discordante quanto à expressão do GLUT4, pois pouco se conhece sobre as relações fisiológicas que atuam na interface expressão de proteínas não fibrilares/modulação durante a imobilização (THOMASON & BOOTH, 1990).

Ploug et al. (1995) observaram a diminuição do transporte da glicose durante um curto período de imobilização (48 horas) nas fibras vermelhas, porém não houve diferença nas fibras brancas. Ainda observaram que não houve diminuição significativa dos transportadores GLUT1 e GLUT4 nos músculos estudados durante este período, além da não diminuição do número de receptores insulínicos e atividade kinase do receptor das fibras vermelhas. Assim, concluíram que no curto período a resistência ao transporte de glicose é tipo de fibra específica e seletiva a contrações ou à insulina. Em contraste, no modelo de desnervação por três dias, Henriksen et al. (1991) e Block et al. (1991) observaram diminuição dos transportadores GLUT4 pelo desenvolvimento da resistência ao transporte de glicose estimulado pela insulina .

Essa discordância entre estudos com relação às alterações quantitativas de receptor insulínico, transportadores de glicose e na sinalização talvez possa explicar que neste estudo, com a imobilização a curto prazo, as alterações no suprimento energético muscular não refletem em alterações na quantidade de proteínas totais musculares, fazendo inferência a sistemas que possam ser desencadeados tardiamente e que venham a interferir na síntese protéica. É importante salientar, que os estudos de imobilização apresentam caráter multifatorial diferindo quanto ao tempo da imobilização, posição articular, atividade eletromiográfica e tipagem de fibra muscular analisada, e isso, conseqüentemente, discrimina os resultados.

Ainda com relação às reservas de glicogênio, foi observado uma maior redução nas fibras brancas (contração rápida), representada pelo gastrocnêmio porção branca, do que nas fibras vermelhas (contração lenta), representadas pelo sóleo e gastrocnêmio vermelho. Um fato a ser destacado é que a órtese (vide figura 2) 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. Outro aspecto a ser ressaltado é que o modelo estudado é mais próximo do real, visto que a imobilização foi feita no tornozelo sem imobilizar as demais articulações, como a do quadril e do joelho, além de ser mais funcional ao animal.

Além das reservas energéticas serem afetadas, o peso muscular também foi comprometido pela imobilização do membro, atingindo tanto o músculo sóleo quanto o extensor longo dos dedos, dentre estes, o sóleo apresentou o maior comprometimento. Uma análise mais aprimorada dos dados gerou um paradoxo

inserido na tríade: perda de peso, redução nas reservas de glicogênio e constância no conteúdo de proteínas totais, sugerindo que possivelmente se tratava de alterações no índice de hidratação. Neste sentido, os resultados mostraram que os músculos não apresentaram diferença neste índice após os 7 dias de imobilização.

Assim, este fato acompanha o estudo de Ohira et al. (2002) os quais propuseram que a perda de peso muscular causada pelo desuso muscular, por suspensão de membro, não está relacionada à alteração na quantidade de proteínas totais.

Entre os anos 70 e 80, os estudos eram contraditórios quanto ao tipo de fibras mais susceptíveis à atrofia. Alguns autores descreveram as fibras brancas (tipo II) (McDOUGALL et al., 1980) e outros se referiram às fibras vermelhas (tipo I) (BOOTH & KELSO, 1973). No entanto, há trabalhos que não evidenciaram qualquer diferença no comportamento dos diferentes tipos de fibras à atrofia (WILLIAMS & GOLDSPINK, 1978). Em 1986, Appell afirmou que o decréscimo mais pronunciado do diâmetro das fibras registra-se durante a primeira semana de imobilização e que 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 atrofia, sugerindo que tal fato ocorra devido às enzimas oxidativas responderem pela diminuição da sua atividade.

Estudos mais recentes, como o de Herrera et al. (2001) que trabalharam com inatividade muscular em membros posteriores de ratos, observaram que o músculo sóleo atrofia mais que o extensor longo dos dedos, provavelmente relacionado pela composição do tipo de fibra e pela função destes 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) relacionaram a maior susceptibilidade do sóleo à atrofia por inatividade devido ser um músculo postural e assim possuir uma atividade basal maior do que os não posturais. No estudo de Tanaka et al. (2004) a imobilização durante duas semanas promoveu redução significativa (77,9%) das fibras lentas (tipo I) e aumento significativo das fibras musculares rápidas (IIC) quando comparado ao grupo controle. Mercier et al. (1999) também encontraram maiores perdas de massa no músculo sóleo de ratos jovens e idosos comparado ao extensor longo dos dedos submetidos à suspensão da pata posterior por 21 dias.

Assim, apoiados na literatura os resultados corroboram com os estudos mais atuais, uma vez que, o sóleo mostrou-se mais susceptível à atrofia por desuso muscular.

A posição de imobilização parece ser um fator determinante no desenvolvimento da atrofia. Se o músculo for imobilizado em encurtamento, dá-se uma diminuição significativa do comprimento muscular por diminuição do número de sarcômeros em série (APPELL, 1986). Pelo contrário, se o músculo for mantido numa posição de alongamento, aumenta de tamanho pela elevação do número de unidades sarcoméricas (WILLIAMS & GOLDSPINK, 1978). O número de sarcômeros estará provavelmente ajustado de forma a que seja permitido um

comprimento ótimo destas estruturas e, assim, a um *overlap* ideal dos filamentos para desenvolver tensão durante as contrações (HERRING et al., 1984). Picquet & Falempin (2003) sugeriram que a posição de encurtamento pode gerar atrofia muscular pela não ativação de sensores de estiramento no músculo nesta posição.

A proposta deste trabalho foi estudar a posição neutra devido à grande parte dos estudos induzirem posições articulares, mantendo músculos encurtados e alongados, seja por gesso, resina, fixações por pinos ou pelo modelo de suspensão do membro. Na literatura foram encontrados trabalhos que mantiveram o tornozelo imobilizado em posição neutra, a 90° , juntamente com a imobilização das articulações do joelho e quadril a 90° (PLOUG et al., 1995; QIN et al., 1997; HIROSE et al., 2000). Porém, o modelo de órtese utilizado neste trabalho se difere, pelo fato de manter as articulações do joelho e quadril livres.

Não somente a posição, mas também o período da imobilização interfere. Elder & McComas (1987) deixaram ratos jovens em suspensão por 14, 28 e 206 dias e observaram que o maior grau de atrofia ocorre nos 28 primeiros dias. Já McNulty et al. (1992) deixaram os ratos em suspensão por 28 dias e observaram que o maior grau de atrofia ocorre nos 7 primeiros dias.

Inicialmente, um experimento piloto foi realizado para identificar qual dos três períodos - 3, 7 e 15 dias - haveria maior comprometimento muscular. Apesar dos períodos de 7 e 15 dias apresentarem maior comprometimento metabólico do que o de 3 dias, o período de 7 dias foi escolhido pela maior redução na massa muscular, sendo sugestivo o fato que possivelmente no 15^o dia o músculo venha a apresentar processos de adaptação/regeneração.

Um aspecto a ser ressaltado neste trabalho foi o aumento na captação de glicose nos músculos submetidos à imobilização articular. Segundo Mondon et al. (1992) ratos que foram submetidos à suspensão apresentaram aumento da sensibilidade à captação de glicose induzida pela insulina e diminuição da sensibilidade à insulina associada com a diminuição da ligação da insulina e a atividade da tirosina quinase. Isso mostra que uma mesma via inicialmente ativada pode ser alterada entre os eventos que ocorrem na cascata desencadeada pela ligação da insulina ao receptor. Segundo Nicholson & Watson (1984) a significativa diminuição na resposta insulínica no músculo sóleo ocorre entre a terceira e oitava hora após a imobilização do membro.

Diante da observação do aumento da captação da hexose, duas vias ligadas ao metabolismo da glicose foram analisadas, e foi observado que não houve diferença na síntese de glicogênio, porém a oxidação foi expressivamente aumentada no músculo sóleo submetido à imobilização. Neste sentido, Kondo et al. (1992) no intuito de traçar um perfil bioquímico adquirido em decorrência da imobilização, avaliaram elementos traçadores de estresse oxidativo em ratos submetidos à imobilização na posição de extensão e foi observado que a atrofia aumenta significativamente nas primeiras 8 horas e apresenta redução com o seguimento do processo.

Em 1994, Kondo et al. afirmaram que a atrofia induzida pela imobilização é também acompanhada por um estresse oxidativo e sugere que radicais hidroxil são formados na atrofia pelo aumento dos ânions superóxido e peróxido de hidrogênio no citoplasma trazendo o aumento do ferro no microsomo. Ainda observaram uma resposta mais complexa na imobilização por gesso durante 8

dias. Ainda, pouco se sabe sobre os mecanismos celulares do estresse oxidativo e se ele é a causa ou o efeito da atrofia induzida pelo desuso (LAWLER *et al.*, 2003).

Para saber se a sensibilidade tecidual à insulina estava alterada pela imobilização, realizou-se o teste de tolerância à insulina e os resultados, mesmo sugerindo elevação na captação como mostra a figura 8, estatisticamente não foi constatada diferença na constante de decaimento da glicose.

Pelo fato da situação de imobilização poder estar gerando estresse ao animal e interferindo nos resultados, optou-se por dosar a quantidade de ácido ascórbico presente nas glândulas supra-renais. Os dados mostram que não houve alteração se comparado ao controle (AZEVEDO, 1994), apontando para a eficácia da órtese no estudo da atrofia muscular, sem se caracterizar como situação indutora de estresse.

A partir da constatação do comprometimento metabólico e no peso muscular induzidos pela imobilização, o objetivo seguinte foi propor tratamentos que pudessem interferir no processo de atrofia e melhorar o perfil energético durante a imobilização, já que o músculo tem que apresentar condições normais de massa e reservas energéticas para ter uma efetiva contração.

Assim, optou-se por um recurso utilizado na medicina, o fármaco clenbuterol e por um recurso fisioterapêutico, a estimulação elétrica neuromuscular.

Apesar do prévio conhecimento do anabólico clenbuterol ser usado tanto por atletas e *bodybuildings* quanto por pessoas que apresentam a condição clínica de atrofia muscular, o objetivo primordial foi avaliar seu efeito sistêmico, ou seja,

em tecidos-avlos. Inicialmente, a dose e a via foram cuidadosamente selecionadas e escolhida a via subcutânea na dose de 10µg/Kg, visto que em altas doses tem sido observados efeitos colaterais (LAVRADOR et al., 2002; FITTON et al., 2001).

Os três primeiros parâmetros avaliados foram o conteúdo hepático de glicogênio, o comportamento da frequência cardíaca e a concentração plasmática de ácidos graxos livres. Observou-se que os dois primeiros parâmetros não se alteraram frente ao tratamento, por outro lado, a concentração plasmática de ácidos graxos livres se mostrou significativamente elevada, indicando lipólise.

Apesar de alguns estudos relatarem efeitos tóxicos e hipertrofia muscular cardíaca com o uso prolongado por doses elevadas do agonista β_2 (PACK et al., 1994; BAKKER *et al.*, 1998; DUNCAN *et al.*, 2000), não é consenso, pois outros estudos não demonstram alterações induzidas pelo seu uso quando em microdoses (FITTON et al., 2001). Guldner et al. (2000) usaram dose de 150µg (3 vezes/semana durante 5-8 meses) de clenbuterol e observaram preservação de certas propriedades fisiológicas, como a função cardíaca sistólica e diastólica.

Com relação à lipólise provocada pelo clenbuterol, vários estudos afirmaram que os agonistas β adrenoceptores além de aumentar a massa muscular também diminuem a gordura corporal em roedores, porém o mecanismo ainda não é entendido (PAN et al., 2001; CASTLE et al., 2001; PAGE et al., 2004).

No bojo do trabalho, foi verificado que os receptores β -adrenérgicos também estão presentes nos eritrócitos e merecem uma melhor atenção, tendo em vista a possibilidade do tratamento desencadear alterações hematológicas significativas. Neste contexto, o foco foi direcionado à resposta das hemáceas ao

choque hiposmótico e foi observado que as células coletadas de ratos tratados com clenbuterol não se diferem daquelas coletadas de ratos controle, quando submetidos à variação osmótica, verificando ainda que os parâmetros hematológicos que pudessem indicar anemia estavam dentro da normalidade. Os resultados sugerem que os eritrócitos podem estar participando de outros sistemas ligados ao suprimento energético, como por exemplo, do ajuste glicêmico local, sem alterar sua ação fisiológica (GUARNER & ALVAREZ BUYLLA, 1990).

No mesmo contexto, despertou a preocupação de avaliar se o tratamento com clenbuterol promove alterações bioquímicas. Assim, optou-se por determinar o perfil bioquímico e verificou-se que a glicemia, lactatemia, uréia e creatinina plasmáticas não diferiram do grupo controle.

Estudos recentes observaram que o tratamento crônico com clenbuterol reduz as concentrações plasmáticas de insulina, além de melhorar a tolerância à glicose (HUNT et al., 2002; PAN et al., 2001; CASTLE *et al.*, 2001). Neste sentido, optou-se por realizar o teste de tolerância à glicose, método direcionado a avaliar a dinâmica secretória da insulina. Cabe salientar que, a regulação da captação da glicose pelo músculo esquelético é modificada na presença dos hormônios insulina e epinefrina (HUNT et al., 2002), sendo que a insulina, ativa as vias responsáveis por aumentar a captação de glicose por ativação do transporte de glicose e a formação de reservas de glicogênio, enquanto que a epinefrina, ativando as vias de receptores β adrenérgicos, atenua esse processo (ASLESEN & JENSEN, 1998). Porém, tem sido observado que a exposição crônica dos

agonistas β adrenérgicos melhora a ação da insulina e o *clearance* em ratos e humanos (LUPIEN et al., 1990).

Segundo Hunt et al. (2002) a possibilidade do aumento da sensibilidade da insulina no músculo esquelético após tratamento crônico com clenbuterol pode ser devido à reduzida influência da epinefrina sobre a ação da insulina como um resultado de *downregulation* dos receptores β adrenérgicos, ou seja, a efetividade da epinefrina inibir a captação de glicose estimulada pela insulina foi severamente diminuída em músculos de ratos tratados com clenbuterol. Ainda, sugere-se que esta atenuação na ação da epinefrina foi acompanhada pelo aumento na ativação da proteína de sinalização PI3-K. Assim, tanto a diminuição na captação da glicose estimulada pela insulina quanto à redução nas reservas de glicogênio e a inibição da atividade da PI3-K estimulada pela epinefrina foram antagonizadas pelo clenbuterol.

Os resultados deste estudo se relacionam com estes trabalhos pelo fato do tratamento com clenbuterol, que apesar de ser agudo, mostrou maior sensibilidade à insulina pelo teste de tolerância à insulina, o qual mostrou maior velocidade de decaimento da glicose na presença da insulina.

Quanto ao teste de tolerância à glicose houve uma maior área sob a curva, que possivelmente se deva ao fato do músculo estar mais sensível à insulina (ITT), e para não gerar hipoglicemia, o pâncreas estaria compensando com redução no processo secretório da insulina. Assim, o comportamento frente ao teste GTT se apresenta diferenciado por ajustes de retroalimentação.

Este resultado concorda com o estudo de Pan et al. (2001), onde observaram uma maior área sob a curva no teste de tolerância à glicose em ratos obesos tratados com clenbuterol. Esses pesquisadores sugeriram uma relação inversa entre as concentrações plasmáticas de insulina e glicose, sendo que o aumento nesse parâmetro foi devido ao aumento na ação da insulina ao invés do aumento na secreção deste hormônio.

Outro aspecto avaliado foi a ingesta líquida e sólida, pois segundo Mancini & Halpern (2002) a estimulação dos receptores β_2 adrenérgicos localizados na área perifornical leva à diminuição da ingesta alimentar. Porém, microdoses diárias de clenbuterol não foram capazes de interferir nesse processo. Os pesos corporais desses animais também não se alteraram pelo tratamento.

Com relação às reservas energéticas, o clenbuterol promoveu aumento tanto no grupo controle quanto no imobilizado, fato que pode ser explicado pela substância promover o aumento da captação tecidual de glicose, possivelmente por efeito permissivo à ação da insulina como sugerem Pan et al. (2001) e Torgan et al. (1995).

No estudo de Pan et al. (2001) o aumento na captação de glicose estimulado pelo clenbuterol foi paralelo ao aumento nas reservas de glicogênio, sendo representado por 75-90% da glicose captada. Castle et al. (2001) atribuiu a melhora da resistência à insulina induzida pelo clenbuterol à hipertrofia muscular e à melhora da resposta dos músculos de contração rápida à insulina.

Segundo Zanqueta (2004) a ativação do receptor β no pâncreas estimula a secreção da insulina, o que pode explicar as maiores reservas energéticas

induzidas pelo tratamento.

Quanto ao peso muscular do sóleo e do extensor longo dos dedos, dos grupos controle e imobilizado, houve aumento na presença do clenbuterol, condição que pode ser apontada como de responsabilidade de suas ações anabólicas. Este fato se relaciona com o estudo de Canu et al. (2001), onde foi observada a ação anabólica do clenbuterol tanto em músculos normais quanto nos atrofiados.

Conforme mostram os resultados, o clenbuterol promoveu o aumento mais pronunciado no peso muscular do extensor longo dos dedos do que no sóleo. Segundo Canu *et al.* (2001) o clenbuterol tem ação mais forte nos músculos de contração rápida do que nos de contração lenta, sendo que no seu estudo ele foi capaz de promover hipertrofia no gastrocnêmio tanto do grupo controle quanto no grupo que teve a pata em suspensão durante 2 semanas, diferente do sóleo. Já para Navegantes et al. (2001), apesar do músculo extensor longo dos dedos ser mais responsivo ao efeito hipertrófico estimulado pelo clenbuterol do que os músculos vermelhos, como o sóleo, o efeito da redução da proteólise muscular não se difere pela tipagem de fibra.

Embora o mecanismo celular seja desconhecido, a administração de clenbuterol tem sido associada com aumento na síntese protéica, no tamanho da célula e na força muscular (MALTIN *et al.*, 1993).

Apesar do tratamento agudo com o β_2 agonista promover a melhora energética e na massa muscular, ele não mostrou diferença na concentração de proteínas totais de todos os músculos analisados e no índice de hidratação do

músculo sóleo.

Mikines et al. (1991) demonstraram que a inatividade física causada por período acamado tão pouco quanto 7 dias está associado com redução na sensibilidade à insulina no músculo esquelético. A inatividade física prolongada também mostrou redução na capacidade de transporte de oxigênio de músculo esquelético, diminuição no conteúdo de GLUT4 e resistência à insulina como mostra o estudo de Hamada et al. (2003).

Um evento que conhecidamente melhora a dinâmica de captação e metabolismo da glicose, é a elevação na atividade contrátil das fibras musculares que aumentam a captação de substratos energéticos e a atividade das vias metabólicas celulares (RYDER et al., 1999; SILVA et al., 1999; WILKES & BONEN, 2000; CANCELLIERO et al., 2003; GUIRRO et al., 2004), fato comprovado pelos resultados, uma vez que os grupos submetidos somente à estimulação elétrica neuromuscular apresentaram maiores reservas de glicogênio.

O exercício físico tem profundos efeitos no metabolismo energético da contração do músculo esquelético. É bem estabelecido que o exercício pode ativar diretamente a captação de glicose no músculo esquelético por induzir translocação dos transportadores de glicose (GLUT4) para a superfície celular via um mecanismo independente da insulina (transporte de glicose estimulada pela contração) (GOODYEAR et al., 1991; LUND et al., 1995). O fenômeno é considerado responsável pelo efeito agudo do exercício no transporte de glicose, com a maioria da glicose sendo captada para contração muscular esquelética.

O período após o exercício é também caracterizado pelo aumento substancial na sensibilidade à insulina que leva à translocação de GLUT4

dependente de insulina e transporte de glicose como um fenômeno local restrito aos músculos exercitados (GAO et al., 1994; HANSEN et al., 1998).

Um achado importante do estudo de Hamada et al. (2003) foi que a captação de glicose corporal é agudamente aumentada em resposta a 20 minutos de estimulação elétrica neuromuscular e este aumento perdura por pelo menos 90 minutos após a finalização da estimulação elétrica.

Neste sentido, Polacow et al. (2003) demonstraram os benefícios da estimulação elétrica neuromuscular em músculos normais e desnervados, sendo observado uma expressiva melhora no perfil metabólico associado à redução na fibrose, fatos mantenedores de uma integridade parcial das fibras.

Apesar da melhora energética promovida pela estimulação elétrica neuromuscular, não houve diferença na massa muscular do sóleo e extensor longo dos dedos, tanto no grupo controle quanto no imobilizado.

Com relação à associação dos tratamentos, o perfil energético apresentou-se melhor do que os tratamentos isolados, tanto no grupo controle quanto no grupo imobilizado, no qual essa melhora foi ainda mais relevante. Quanto à massa muscular, o sóleo teve melhora na massa somente na condição imobilizada, diferente do extensor longo dos dedos, que apresentou melhora nos dois grupos associados.

Isso mostra que o clenbuterol pode ser um coadjuvante no tratamento fisioterapêutico devido sua ação em minimizar a perda de massa e o comprometimento metabólico muscular, principalmente em pacientes que estão incapacitados de realizar o exercício físico ou que não toleram a estimulação elétrica neuromuscular.

7. CONCLUSÃO

7. CONCLUSÃO

- A imobilização do membro em posição neutra do tornozelo durante 7 dias promoveu reduções nas reservas energéticas musculares, além de apresentar perda de peso significativa dos músculos sóleo e extensor longo dos dedos;
- A imobilização do membro não se mostrou uma condição estressora ao animal, promoveu aumento na captação de 2-deoxiglicose, não mostrou alteração no índice de decaimento da glicose após teste de tolerância à insulina, não modificou o índice de hidratação do músculo sóleo e não alterou a quantidade de proteínas totais musculares.
- Apesar do tratamento com clenbuterol elevar a disponibilidade de ácidos graxos livres plasmáticos, não promoveu alteração na frequência cardíaca, glicogênio hepático, fragilidade osmótica, perfil hematológico, perfil bioquímico, peso corporal e ingesta alimentar.
- O tratamento com clenbuterol promoveu melhora na sensibilidade tecidual à insulina determinado pelo teste de tolerância à insulina, devido à maior velocidade de decaimento da glicose.
- Os tratamentos isolados, do clenbuterol e da estimulação elétrica neuromuscular, promoveram elevação nas reservas energéticas musculares dos grupos controle e imobilizado, sendo que, quando associados, as reservas energéticas se apresentaram ainda maiores.
- Os músculos sóleo e extensor longo dos dedos dos grupos controle e imobilizado apresentaram aumento no peso pelo tratamento do clenbuterol e quando esse foi associado à estimulação elétrica neuromuscular.
- O trabalho mostra que tanto a estimulação elétrica neuromuscular isolada ou associada à proteção farmacológica induzida pelo tratamento com clenbuterol foram ferramentas importantes para a constância na homeostasia energética do músculo imobilizado, merecendo maior atenção quanto a sua aplicabilidade como coadjuvante em procedimentos utilizados na Fisioterapia.

8.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. APPELL, H.J. Skeletal muscle atrophy during immobilization *Int J Sports Med* 7: 1-5, 1986.
2. ASLESEN, R. & JENSEN, J. Effects of epinephrine on glucose metabolism in contracting rat skeletal muscles. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 275: 448-456, 1998.
3. AZEVEDO, J.R.M. Determinação de parâmetros bioquímicos em ratos sedentários e treinados durante e após o exercício agudo de natação. Tese de doutorado, Departamento de Fisiologia e Biofísica – I.B. – UNICAMP, 1994.
4. BACURAU, R.F. Nutrição e suplementação esportiva, 2ª edição, Phorte editora, São Paulo, pp.109-113, 2001.
5. BAKKER, A.J.; HEAD, S.L.; WAREHAM, A.C.; STEPHENSON, D.G. Effect of clenbuterol on sarcoplasmic reticulum function in single skinned mammalian skeletal muscle fibers. *Am J Physiol* 274: 1718-1726, 1998.
6. BEVAN, P. Insulin signaling. *Journal of Cell Science* 114(8): 1429-1430, 2001.
7. BLOCK, N.E.; MENICK, D.R.; ROBINSON, K.A.; BUSE, M.G. Effects of denervation on the expression of two glucose transporter isoforms in rat hindlimb muscle. *J Clin Invest* 88: 1546-1552, 1991.
8. BOOTH, F.W. & CRISWELL, D.S. Molecular events underlying skeletal muscle atrophy and the development of effective countermeasures. *Int J Sports Med* 18: 265-269, 1997.
9. BOOTH, F.W. & KELSO, J.R. Effect of hind-limb immobilization on contractile and histochemical properties of skeletal muscle. *Plurgers Arch* 342: 231-338, 1973.
10. BRODDE, O.E. & MICHEL, M.C. Adrenergic and muscarinic receptors in the human heart. *Pharmacol Rev* 51(4): 651-689, 1999.
11. BYLUND, D.B.; EIKENBERG, D.C.; HIEBLE, J.P.; LANGER, S.Z.; LEFKOWITZ, R.J.; MINNEMAN, K.P.; MOLINOFF, P.B.; RUFFOLO, R.R.; TRENDELENBURG, U. International Union of Pharmacology Nomenclature of Adrenoceptors. *Pharmacol Rev* 46(2): 121-136, 1994.

12. Canadian Council on Animal Care: Guide to the care and use of experimental animals, volume 1, p. 87, 1980.
13. CANCELLIERO, K.; FORTI, F.; GUIRRO, R.R.J.; SILVA, C. A Calcitonina inibe os efeitos benéficos da estimulação elétrica no músculo esquelético. *Anais da XVIII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental*, Curitiba. p.115, 2003.
14. CANON, F.; BIGARD, A.X.; MERINO, D.; LIENHARD, F.; GUEZENNEC, C.Y. Effects of chronic low frequency stimulation on structural and metabolic properties of hindlimb suspended rat soleus muscle. *Eur J Appl Physiol* 70: 528-535, 1995.
15. CANU, M.H.; STEVENS, L.; RICART-FIRINGA, C.; PICQUET, F.; FALEMPIN, M. Effect of the β_2 - agonist clenbuterol on the locomotor activity of rat submitted to a 14-day period of hypodynamia-hypokinesia. *Behavioural Brain Research* 122: 103-112, 2001.
16. CASTLE, A.; YASPELKIS III, B.B.; KUO, C.; IVY, J.L. Attenuation of insulin resistance by chronic β_2 -adrenergic agonist treatment. Possible muscle specific contributions. *Life Sciences* 69: 599-611, 2001.
17. CHOO, J.; HORAN, M.; LITTLE, R.; ROTHWELL, N. Anabolic effects of Clenbuterol on skeletal muscle are mediated by beta2-adrenoreceptor activation. *Am J Physiol* 263: 50-56, 1992.
18. COSTELLI, P.; GARCIA-MARTINEZ, C.; LLOVERA, M.; CARBO, N.; LOPEZ-SORIANO F.J.; NAGELL N.; TESSITORE L.; BACCINO, F.M.; ARGILES, J.M. Muscle protein waste in tumor-bearing rats is effectively antagonized by a beta 2-adrenergic agonist (clenbuterol). Role of the ATP-ubiquitin-dependent proteolytic pathway. *J Clin Invest* 95: 2367-2372, 1995.
19. CUNNINGHAM, H.M. Effects of epinephrine, norepinephrine and nicotine on growth and carcass composition of chicks. *Poultry Science* 42: 1197-1202, 1963.
20. DESPLANCHES, D.; KAYAR, S.R.; SEMPORE, B.; FLANDROIS, R.; HOPPELER, H. Rat soleus muscle ultrastructure after hindlimb suspension. *J Appl Physiol* 69(2): 504-508, 1990.

21. DEUTSCH, D.A.V.; ABUKHALAF, I.K.; WINESKI, L.E.; SILVERSTROV, N.A.; BAYORH, M.A.; POTTER, D.E. Changes in muscle proteins and spermidine content in response to unloading and clenbuterol treatment. *Can J Physiol Pharmacol* 81: 28-39, 2003.
22. DIAS, C.N.; da SILVA, C.A.; CHINGUI, L.; CANCELLIERO, K.M. *Anais da XIX Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental*, Águas de Lindóia, SP, 2004.
23. DIAZ-HERRERA, P.; GARCIA-CASTELLANO, J.M.; TORRES, A.; MORCUENDE, J.A.; CALBET, J.A.L.; SARRAT, R. Effect of high-intensity running in rectus femoris muscle fiber in rats. *J Orth Res* 19: 229-232, 2001.
24. DOCHERTY, J.R. Subtypes of functional α_1 e α_2 adrenoceptors. *Eur J Pharmacol* 361(1): 1-15, 1998.
25. DUNCAN, N.D.; WILLIAM, D.A.; LYNCH, G.S. Deleterious effects of chronic clenbuterol treatment on endurance and sprint exercise performance in rats. *Clin Sci* 98: 339-347, 2000.
26. ELDER, G.C.B. & McCOMAS, A.J. Development of rat muscle during short and long term hindlimb suspension. *J Appl Physiol* 53(4): 1401-1408, 1987.
27. FERRANDO, A.A.; LANE, H.W.; STUART, C.A.; DAVIS-STREET, J.; WOLFE, R.R. Prolonged bed rest decreases skeletal muscle and whole body protein synthesis, *Am J Physiol Endocrinol Metab* 270: 627-633, 1996.
28. FERRY, B.; ROOZENDAAL, B.; McGAUGH, J.L. Basolateral amygdala noradrenergic influences on memory storage and mediated by interaction between beta and alpha 1-adrenoceptors *J Neurosci* 19: 5119-5123, 1999.
29. FITTON, A.R.; BERRY, M.S.; MCGREGOR, A.D. Preservation of denervated muscle form and function by clenbuterol in a rat model of peripheral nerve injury. *Journal of Hand Surgery* 26B(4): 335-346, 2001.
30. 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* 344: 231-235, 1999.

31. GAO, J.; GULVE, E.A.; HOLLOSZY, J.O. Contraction-induced increase in muscle insulin sensitivity: requirement for a serum factor. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 266: 186-192, 1994.
32. GARRET, W.E. Injuries to the muscle-tendon unit. *Instructional Course Lectures* 37: 275-282, 1988.
33. GOODYEAR, L.J.; HIRSHMAN, M.F.; SMITH, R.J.; HORTON, E.S. Glucose transporter number, activity, and isoform content in plasma membrane of red and white skeletal muscle. *Am J Physiol* 261: 556-561, 1991.
34. GOODYEAR, L.J.; HIRSHMAN, M.F.; VALYOU, P.M.; HORTON, E.S.; Glucose transporter number, function, and subcellular distribution in rat skeletal muscle after exercise training. *Diabetes* 41: 1091-1099, 1992.
35. GOODYEAR, L.J. & KAHN, B.B. Exercise, glucose transport, and insulin sensitivity. *Annu Rev Med* 49: 235-261, 1998.
36. GUARNER, V. & ALVAREZ-BUYLLA, R. Erythrocyte and glucose homeostasis in rats. *Diabetes* 38: 410-415, 1989.
37. GUARNER, V. & ALVAREZ-BUYLLA, R. Compensation by fetal erythrocyte of plasma glucose changes in rats. *Diabetes* 39: 1197-1199, 1990.
38. GUIRRO, R.R.J.; SILVA, C.A.; FORTI, F., CANCELLIERO, K.M. Análise do músculo esquelético desnervado tratado com metformina e/ou estimulação elétrica de baixa frequência. *Revista Brasileira de Fisioterapia* 8(1): 21-27, 2004.
39. GULDNER, N.W.; KLAPPROTH, P.; GROBHERR, M.; STEPHAN, M.; RUMPEL, E.; NOEL, R.; SIEVERS, H. Clenbuterol-supported dynamic training of skeletal muscle ventricles against systemic load. A key for powerful circulatory assist? *Circulation* 101: 2213-2219, 2000.
40. HAMADA, T.; SASAKI, H.; HAYASHI, T.; MORITANI, T.; NAKAO, K. Enhancement of whole body glucose uptake during and after human skeletal muscle low-frequency electrical stimulation. *J Appl Physiol* 94: 2107-2112, 2003.

41. HANSEN, P.A.; NOLTE, L.A.; CHEN, M.M.; HOLLOSZY, J.O. Increased GLUT-4 translocation mediates enhanced insulin sensitivity of muscle glucose transport after exercise. *J Appl Physiol* 85: 1218-1222, 1998.
42. 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* 259: 593-598, 1990.
43. HENRIKSEN, E.J.; RODNICK, K.J.; MONDON, C.E.; JAMES, D.E.; HOLLOSZY, J.O. Effect of denervation or unweighting on GLUT 4 protein in rat soleus muscle. *J Appl Physiol* 70: 2322-2327, 1991.
44. HERRERA, N.M.Jr.; 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* 82: 930-934, 2001.
45. HIROSE, M.; KANEKI, M.; SUGITA, H.; YASUHARA, S.; MARTYN, J. Immobilization depresses insulin signaling in skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 279: 1235-1241, 2000.
46. HERRING, S.W.; GRIMM, A.F.; GRIMM, B.R. Regulation of sarcomere number in skeletal muscle: A comparison of hypotheses. *Muscle & Nerve* 7: 161-173, 1984.
47. HUNT, D.G.; DING, Z.; IVY, J.L. Clenbuterol prevents epinephrine from antagonizing insulin-stimulated muscle glucose uptake. *J Appl Physiol* 92: 1285-1292, 2002.
48. KABLE, J.H.; MURRIN, C.; BYLUND, D.B. In vivo gene modification elucidates subtype-specific functions of α_2 -adrenergic receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 293(1): 1-7, 2000.
49. 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* 84(4): 1418-1424, 1998a.

50. KANNUS, P.; JOZSA, L.; KVIST, M.; JÄRVINEN, M. Effects of immobilization and subsequent low- to high-intensity exercise on morphology of rat calf muscles. *Scand J Med Sci Sports* 8: 160-171, 1998b.
51. 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* 270: 397-400, 1990.
52. KONDO, H.; MIURA, M.; NAKAGAKI, I.; SASAKI, S.; ITOKAWA, Y. Trace element movement and oxidative stress in skeletal muscle atrophied by immobilization. *Am J Physiol* 262(5): 583-590, 1992.
53. KONDO, H.; NISHINO, K.; ITOKAWA, Y. Hydroxyl radical generation in skeletal muscle atrophied by immobilization. *Federation of European Biochemical Societies* 349: 169-172, 1994.
54. LAVRADOR, C.; ALMEIDA, A.J.; CARDOSO, L.A. Avaliação *in vitro* de um injetável subcutâneo para liberação prolongada de um fármaco β -agonista. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias* 97(541): 29-34, 2002.
55. LAWLER, J.M.; SONG, W.; DEMAREE, S.R. Hindlimb unloading increases oxidative stress and disrupts antioxidant capacity in skeletal muscle. *Free Radical Biology & Medicine* 35(1): 9-16, 2003.
56. LIMA, A.O.; SOARES, J.B.; GRECO, J.B.; GALIZZI, J.; CANÇADO, J.R. *Métodos de Laboratório aplicados à Clínica*. Guanabara Koogan, 5ª edição, Rio de Janeiro, 1977.
57. LOWE, M.D.; GRACE, A.A.; KAUMANN, A.J. Blockade of putative beta 4 and beta 1 adrenoceptors by carvedilol in ferret myocardium. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 359(5): 400-403, 1999.
58. LUND, S.; HOLMAN, G.D.; SCHMITZ, O.; PEDERSEN, O. contraction stimulates translocation of glucose transporter GLUT4 in skeletal muscle through a mechanism distinct from that of insulin. *Proc Natl Acad Sci* 92: 5817-5821, 1995.

59. LUPIEN, J.R.; HIRSHMAN, M.F.; HORTON, E.S. Effects of norepinephrine infusion on in vivo insulin sensitivity and responsiveness. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 259: 210-215, 1990.
60. MALTIN, C.A.; DELDAY, M.I.; BAILIE, A.G.S. Denervation increases clenbuterol sensitivity in muscle from young rats. *Muscle & Nerve* 14: 188-192, 1992a.
61. MALTIN, C.A.; HAY, S.M.; McMILLAN, D.N.; DELDAY, M.I. Tissue specific responses to clenbuterol; temporal changes in protein metabolism of striad muscle and visceral tissues from rats. *Growth Regul* 2: 161-166, 1992b.
62. MALTIN, C.A.; DELDAY, M.I.; WATSON, J.S. Clenbuterol, a β -adrenoceptor agonist, increases relative muscle strength in orthopedic patients. *Clin Sci* 84: 651-654, 1993.
63. MANCINI, M.C. & HALPERN, A. Aspectos fisiológicos do balanço energético. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 46 (3): 230-248, 2002.
64. MATTHEWS, P. & St. PIERRE, D.M. Recovery of muscle strength following arthroscopic meniscectomy. *J Orthop Sports Phys Ther* 23: 18-26, 1996.
65. McDOUGALL, 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* 43: 25-34, 1980.
66. McNULTY, A.L.; OTTO, A.J.; KASPER, C.E.; THOMAS, D.P. Effect of recovery mode following hind-limb suspension on soleus muscle composition in the rat. *Int J Sports Med* 13(1): 6-14, 1992.
67. MEGENEY, L.A.; ELDER, G.C.B.; TAN, M.H.; BONEN, A. Increased glucose transport in non-exercising muscle. *American Journal of Physiology* 262: 20-26, 1992.
68. MERCIER, C.; JOBIN, J.; LÉPINE, C.; SIMARD, C. Effects of hindlimb suspension on contractile properties of young and old rat muscles and the impact of electrical stimulation on the recovery process. *Mechanisms of Ageing and Development* 106: 305-320, 1999.

69. MIKINES, K.J.; RICHTER, E.A.; DELA, F.; GALHO, H. Seven days of bed rest decrease insulin action on glucose uptake in leg and whole body. *J Appl Physiol* 70: 1245-1254, 1991.
70. MINDKLIN, R.L. & BUTLER, R.H. The determination of ascorbic acid. A micromethod. *J Biol Chem* 122: 673-686, 1938.
71. MONDON, C.E.; RODNICK, K.J.; DOLKAS, C.B.; AZHAR, S.; REAVEN, G.M. Alterations in glucose and protein metabolism in animals subjected to stimulated microgravity. *Adv Space Res* 12(2-3): 169-177, 1992.
72. NAVEGANTES, L.C.C.; RESANO, N.M.Z.; MIGLIORINI, R.H.; KETTELHUT, I.C. Role of adrenoceptors and cAMP on the catecholamine-induced inhibition of proteolysis in rat skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 280: 663-668, 2001.
73. NICHOLSON, W.F. & WATSON, P.A. Glucose uptake and glycogen synthesis in muscles from immobilized limbs. *J Appl Physiol* 56: 431-435, 1984.
74. OHIRA, M.; HANADA, H.; KAWANO, F.; ISHIHARA, A.; NONAKA, I.; OHIRA, Y. Regulation of the properties of rat hind limb muscles following gravitational unloading. *Japanese Journal of Physiology* 52: 235-245, 2002.
75. PACK, R.J.; ALLEY, M.R.; DALLIMORE, J.A.; LAPWOOD, K.R.; BURGESS, C.; CRANE, J. The myocardial effects of fenoterol, isoprenaline and salbutamol in normoxic and hypoxic sheep. *Int J Exp Pathol* 75: 357-362, 1994.
76. PAGE, K.A.; HARTZELL, D.L.; LI, C.; WESTBY, A.L.; DELLA-FERA, M.A.; AZAIN, M.J.; PRINGLE, T.D.; BAILE, C.A. β -Adrenergic receptor agonists increase apoptosis of adipose tissue in mice. *Domestic Animal Endocrinology* 26: 23-31, 2004.
77. PAN, S.J.; HANCOCK, J.; DING, Z.; FOGT, D.; LEE, M.; IVY, J.L. Effect of clenbuterol on insulin resistance in conscious obese Zucker rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 280: 554-561, 2001.
78. PICQUET, F. & FALEMPIN, M. Compared effects of hindlimb unloading versus terrestrial deafferentation on muscular properties of the rat soleus. *Experimental Neurology* 182:186-164, 2003.

79. 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* 268: 980-986, 1995.
80. POLACOW, M.L.O.; SILVA, C.A.; GUIRRO, R.R.J.; CAMPOS, M.R.; BORGES, J.P. Estudo morfológico do músculo sóleo desnervado de ratos tratados pela associação de metformina e estimulação elétrica. *Revista Brasileira de Fisioterapia* 7(1): 77-84, 2003.
81. QIN, L.; APPELL, H.J.; CHAN, K.M.; MAFFULLI, N. Electrical stimulation prevents immobilization atrophy in skeletal muscle of rabbits. *Arch Phys Med Rehabil* 78(5): 512-517, 1997.
82. 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 are upregulated in chronic human disuse muscle atrophy. *Muscle & Nerve* 24: 893-899, 2001.
83. REGOUW, B.J.M. Specific determination of fatty acid in plasma. *Clin Chem Acta* 31(1): 187-195, 1971.
84. RICHARDSON, J.M.; BALON, T.W.; TREADWAY, J.L.; PESSIN, J.E. Differential regulation of glucose transport activity and expression in red and white skeletal muscle. *Journal Biology Chem* 266: 12690-12694, 1991.
85. RYDER, J.W.; KAWANO, Y.; GALUSKA, D.; FAHLMAN, R.; HENRIKSSON, H.W.; CHARRON, M.J.; ZIERATH, J.R. Postexercise glucose uptake and glycogen synthesis in skeletal muscle from GLUT4 – deficient mice. *FASEB Journal* 13: 2246-2256, 1999.
86. SAKAKIMA, H.; YOSHIDA, Y.; SAKAE, K.; MORIMOTO, N. Different frequency treadmill running in immobilization-induced muscle atrophy and ankle joint contracture of rats. *Scand J Med Sci Sports* 14: 186-192, 2004.
87. SALVINI, T.F. In: MARQUES, AP. *Cadeias Musculares – Um programa para ensinar avaliação fisioterapêutica global*. Editora Manole, 1ª edição, São Paulo, SP, p. 3-14, 2000.

88. SEKI, K.; TANIGUCHI, Y.; NARUSAWA, M. Effects of joint immobilization on firing rate modulation on human motor units. *Journal of Physiology* 530: 507-519, 2001.
89. SHULMAN, R.G. & ROTHMAN, D.L. The "glycogen shunt" in exercise muscle: A role for glycogen in muscle energetics and fatigue. *PNAS* 98(2): 457-461, 2000.
90. SILVA, C.A., GUIRRO, R.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* 3(2): 55-60, 1999.
91. SIRVIÖ, J. & MacDONALD, E. Central α_1 -adrenoceptors: Their role in the modulation of attention and memory formation. *Pharmacol Ther* 83(1): 49-65, 1999.
92. SIU, L.O.; RUSSEAU, J.C.; TAYLOR, A.W. Determination of glycogen in small tissue samples. *J Appl Physiol* 28(2): 234-236, 1970.
93. SMUROVA, E.A. Functional characterization of beta-2-adrenoceptors of membrane preparations and intact erythrocytes of rats. *Ontogenez* 25(6): 42-46, 1994.
94. SNEDDON, A.A.; DELDAY, M.I.; STEVEN, J.; MALTIN, C.A. Elevated IGF-II and phosphorylation of 4E-BP1 and p70^{S6k} in muscle showing clenbuterol-induced anabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 281: 676-682, 2001.
95. STEIN, T.P.; SCHULTER, M.D.; BODEN, G. Development of insulin resistance by astronauts during spaceflight. *Aviat Space Environ Med* 65: 1091-1096, 1994.
96. 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* 9: 76-85, 2004.
97. THOMASON, D.B. & BOOTH, F.W. Atrophy of the soleus muscle by hindlimb unweighting. *J Appl Physiol* 68(1): 1-12, 1990.

98. TORGAN, C.E.; ETGEN, G.J.; KANG, H.Y.; IVY, J.L. Fiber type-specific effects of clenbuterol and exercise training on insulin-resistant muscle. *J Appl Physiol* 79(1): 163-167, 1995.
99. VANDERTHOMMEN, M. & CRIELAARD, J.M. Électromyostimulation en médecine du sport. *Rev Med Liege* 56(5): 391-395, 2001.
100. Von DEUTSH, D.A.; ABUKHALAF, I.K.; WINESKI, L.E.; OSTER, R.A.; ABOUL-ENEIN, H.Y. β agonist-induced alterations in organ weights and protein content: comparison of racemic clenbuterol and its enantiomers. *Chirality* 12: 137-148, 2000.
101. Von DEUTSH, D.A.; ABUKHALAF, I.K.; WINESKI, L.E.; OSTER, R.A.; ABOUL-ENEIN, H.Y.; POTTER, D.E. Distribution and muscle-sparing effects of clenbuterol in hindlimb suspended rats. *Pharmacology* 65: 38-48, 2002.
102. WALTERS, T.J.; SWEENEY, H.L.; FARRAR, R.P. Influence of electrical stimulation on fast-twitch muscle in aging rats. *J Appl Physiol* 71: 1921-1928, 1991.
103. WILKES, J.J. & BONEN, A. Reduced insulin-stimulated glucose transport in denervated muscle is associated with impaired Akt- α activation. *Endoc & Metab* 279(4): 912-919, 2000.
104. WILLIAMS, P.E. & GOLDSPINK, G. Changes in sarcomere length and physiological properties of immobilized muscle. *J Anat* 127: 459-468, 1978.
105. WILLIAMS, P.E. Effect of intermittent stretch on immobilized muscle. *Ann Rheu Dis* 47: 1014-1016, 1988.
106. ZANESCO, A.; SPADARI-BRATFISCH, R.C.; BARKER, L.A. Sino-aortic denervation causes right atrial beta adrenoceptor down-regulation. *J Pharmacol Exp Ther* 280(2): 677-685, 1997.
107. ZANQUETA, M.M. O sistema nervoso autônomo regula a expressão do gene do GLUT4 no jejum. Participação do controle glicêmico. *Anais do VI Congresso Paulista de Diabetes e Metabolismo*, v. 48 (2), p. S115, abril de 2004.