

# Efeito da estimulação elétrica neuromuscular nas reservas de glicogênio muscular em razão da ingestão de etanol: estudo em ratos

Effect of neuromuscular electrical stimulation in glycogen muscle reserves because of ingestion of ethanol: a study in rats

Ederson Luís Limoni<sup>1</sup>, Eder João de Arruda<sup>1</sup>

## RESUMO

**Objetivo:** Avaliar as ações da ingestão alcoólica e da neuroestimulação sobre a reserva de glicogênio muscular, o peso corporal, a glicemia sanguínea e o peso do músculo sóleo. **Métodos:** Vinte ratos machos foram distribuídos em quatro grupos experimentais (n=5), a saber, Controle, Etanol, Eletroestimulado e Etanol+Eletroestimulado. A pesquisa durou 22 dias. Os grupos submetidos ao uso do etanol receberam a substância diluída em água, que foi consumida durante todo o período experimental. Os grupos que receberam a eletroestimulação, sob sedação para o procedimento, tiveram o membro posterior esquerdo tricotomizado, de forma que a aplicação da corrente foi realizada diariamente, por 7 dias, em sessões de 20 minutos. Na sequência, após a indução ao alcoolismo e a aplicação da estimulação elétrica nos correspondentes grupos, os animais foram eutanasiados, para que os músculos fossem encaminhados para análise do glicogênio. **Resultados:** O Grupo Etanol apresentou menor peso corporal quando comparado ao Controle e ao Eletroestimulado; o Grupo Etanol+Eletroestimulado apresentou peso menor quando comparado aos Grupos Controle e Eletroestimulado, mas esteve em melhor situação ao se comparar ao Grupo Etanol. Quanto à captação glicogênica, notou-se que o Grupo Etanol demonstrou quadro de resistência à captação da glicose sanguínea, sendo que o etanol eletroestimulado demonstrou melhor captação que os demais grupos. Em relação ao peso da musculatura, pode-se observar que o Grupo Etanol apresentou menor peso que o Controle e que o Grupo Eletroestimulado apresentou aumento da pesagem ao comparar-se aos grupos Controle e Etanol, respectivamente. Já o Grupo Etanol+Eletroestimulado não apresentou diferença significativa em relação ao Controle, mas teve melhores resultados ao contrapesar com o Grupo Etanol. **Conclusão:** A exposição crônica ao álcool apresentou relação direta com a redução do peso do muscular e corpóreo, e da captação de glicogênio e de suas reservas musculares,

além de favorecer inúmeras desordens orgânicas, podendo, assim, interferir em processos de reabilitação.

**Descritores:** Ratos; Glicogênio/metabolismo; Estimulação elétrica; Etanol/efeitos adversos

## ABSTRACT

**Objective:** To evaluate the effects of alcoholic ingestion and neurostimulation on the muscle glycogen reserve, body weight, blood sugar, and weight of the soleus muscle. **Methods:** Twenty male rats were distributed into four experimental groups (n=5), namely, Control, Ethanol, Electrostimulated, and Ethanol+Electrostimulated. The study lasted for 22 days. The groups submitted to the use of ethanol received the substance diluted in water, which was consumed during the entire experimental period. The groups that received electrostimulation, under sedation for the procedure, had their left hind leg shaved, and the current was applied daily for 7 days, in 20-minute sessions. Next, after induced alcoholism and electrical stimulation in the corresponding groups, the animals were euthanized so that their muscles could be sent for glycogen analysis. **Results:** The Ethanol group displayed a lower body weight when compared to the Control and Electrostimulated groups; the Ethanol+Electrostimulated groups had a lower body weight compared to the Control and Electrostimulated groups, but were in a better situation when compared to the Ethanol group. As to glycogen capture, it was noted that the Ethanol group demonstrated resistance to blood glucose capture, whereas the Ethanol Electrostimulated group showed better capture than the other groups. As to muscle weight, it was observed that the Ethanol group had a lower weight than did the Controls, and that the Electrostimulated group weight greater when compared to the Control and Ethanol groups, respectively. On the other hand, the

Trabalho realizado na Anhanguera Educacional, Santa Bárbara d'Oeste, SP, Brasil.

<sup>1</sup> Anhanguera Educacional, Santa Bárbara do Oeste, SP, Brasil.

Autor correspondente: Ederson Luís Limoni – Avenida Armando Salles de Oliveira, 260, Sala 2, CEP: 13468-570 – Santa Bárbara d'Oeste, SP, Brasil – Tel.: (19) 3458-2676 – E-mail: ederlimoni@hotmail.com

Data de submissão: 30/6/2012 – Data de aceite: 4/12/2012

Conflito de interesse: não há.

Ethanol+Electrostimulated groups showed no significant difference relative to the Controls, but had better results when compared to the Ethanol group. **Conclusion:** Chronic exposure to alcohol showed a direct relationship with reduced muscle and body weight, and in glycogen capture and muscle reserves, besides favoring innumerable organic disorders, thus interfering in rehabilitation processes.

**Keywords:** Rats; Glycogen/metabolism; Electric stimulation; Ethanol/adverse effects

## INTRODUÇÃO

A ingestão de álcool etílico (etanol) pode desencadear alterações metabólicas de caráter patológico nos diferentes sistemas do organismo humano. Nesse sentido, são alteradas as funções do sistema nervoso, o metabolismo da glicose, dos lipídios e das proteínas e, particularmente, alteram-se os aspectos nutricionais de órgãos como fígado, pâncreas, estômago e intestino<sup>(1)</sup>.

Com base em exames clínico e histológico da musculatura, estudos demonstram, que alcoólatras crônicos apresentam graus variáveis de fraqueza muscular, os quais podem evoluir a quadro agudo de miopatia alcoólica. Atrofia muscular, formação de *type-grouping*, proliferação e, paralelamente, acúmulo mitocondrial são alterações graves como que merecem atenção<sup>(2,3)</sup>.

No intuito de minimizar os eventos desencadeados por condições deletérias que agem sobre o tecido muscular, diversas técnicas têm sido propostas pela fisioterapia, sendo que a estimulação elétrica neuromuscular (EENM) tem apresentado bons resultados na manutenção de condições do músculo ou no retardamento do catabolismo<sup>(3)</sup>.

A minimização da utilidade nervosa periférica por eventos patológicos, resultando em um déficit de contratilidade, culmina em atrofia grave, podendo ser irreversível em razão da proliferação intensa de tecido conjuntivo, em decorrência do processo inflamatório. Dessa forma, a EENM também se mostra eficaz em promover elevação na atividade contrátil das fibras musculares e na melhora da dinâmica de captação e de metabolismo da glicose, sendo atestado um aumento nas vias metabólicas celulares<sup>(4)</sup>.

Com destaque para o metabolismo dos carboidratos, o consumo exagerado de etanol demonstra ter relação direta com o aumento de fatores de risco para doenças cardiovasculares e o desenvolvimento do *diabetes mellitus* tipo 2<sup>(5)</sup>.

Nessa linha de investigação, a literatura é escassa e não se detém em aspectos de reabilitação, fato este que merece destaque, por parte da fisioterapia, em razão da gama de recursos disponíveis para intervir nos sistemas

orgânicos, que se encontram em condições deletérias por uso crônico do etanol em grandes quantidades<sup>(4)</sup>.

Nesse íterim, presume-se que, no âmbito da reabilitação por meio da eletroestimulação, pode haver resultados positivos, uma vez que a literatura apresenta resultados assertivos frente à aplicação do recurso<sup>(3)</sup>. No entanto, a ingestão de etanol pode interferir diretamente nas respostas dos tecidos muscular e hepático, frente aos recursos terapêuticos. Assim, o presente projeto pretendeu investigar a efetividade da EE mediante a condição de ingestão de etanol.

## OBJETIVO

Avaliar as ações da ingestão alcoólica e da neuroestimulação sobre a reserva de glicogênio muscular, o peso corporal, a glicemia sanguínea e o peso do músculo sóleo.

## MÉTODOS

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Anhanguera Educacional Ltda. (CEUA/AESA), #1.025. Sua realização se deu no período de janeiro a outubro de 2011.

Foram utilizados 20 ratos Wistar, machos, com 3 a 4 meses de idade e peso de 200 a 300g. Eles foram mantidos sob condições controladas de biotério (temperatura de  $23 \pm 2^\circ\text{C}$  e ciclo fotoperiódico claro/escuro de 12 horas). O período prático com animais na pesquisa durou 22 dias, a somar indução à miopatia sob disposição de solução de etanol a 4%, com livre acesso aos grupos tratados com etanol, assim como a intervenção da FES com eletrodos aplicados um na origem e outro na inserção do músculo tríceps sural nos grupos tratados com EE. Antecedendo o período experimental, os animais permaneceram por 48 horas em adaptação às condições do biotério de pesquisa.

## Grupos experimentais

Os animais foram divididos em quatro grupos experimentais (n=5; grupo controle – C, grupo tratado com etanol – Et, grupo eletroestimulado – EE e grupo tratado com etanol e eletroestimulado – EtEE).

## Tratamento com etanol

Os grupos tratados com etanol receberam solução de etanol a 4%, com livre acesso durante 14 dias. A solução de etanol foi preparada com pelo menos 20 horas de antecedência da disponibilidade aos animais<sup>(4)</sup>.

## Exposição à EENM

Após o período de ingestão alcoólica, os animais submetidos à EE foram sedados, e o membro posterior esquerdo foi tricotomizado para maior efetividade da EE. A EE foi realizada diariamente por 7 dias, em sessões de 20 minutos. Os eletrodos foram colocados um na origem e outro na inserção do músculo tríceps sural, conforme protocolo estabelecido.

O equipamento utilizado para EE foi o Dualpex 961 (Quark®), além de quatro eletrodos de silicone-carbono, com 1cm<sup>2</sup> cada, e gel transdutor.

Como parâmetros da corrente, foram estabelecidas frequência de 10Hz e largura de fase de 0,4ms. A intensidade da corrente foi padronizada em 5,0mA, sendo que, a cada 5 minutos, foi acrescentado 1.0mA, para evitar acomodação.

## Análise da glicemia sanguínea

A glicose sanguínea foi avaliada por meio do teste de tolerância à glicose (TTG), com extração de amostra sanguínea para análise nos tempos de 0, 10, 20, 30 e 60 minutos após eletroestimulação, em ambos os grupos.

## Pesagem da musculatura

O músculo sóleo (S) foi extraído por inteiro, desde o tendão de origem até sua inserção. Na sequência, foi submetido à pesagem (peso úmido) em balança analítica.

## Procedimentos de anestesia e eutanásia

Ao 15º dia, após a indução ao alcolismo, o procedimento de eletroestimulação foi iniciado. Os animais foram sedados por via intraperitoneal (ip), visto o desconforto do procedimento por via endovenosa, com a utilização de cetamina (70mg/kg) e xilazina (10mg/kg), que oferece ação hipnótica e relaxante muscular por até 40 minutos. Por outro lado, a eutanásia foi realizada após o 22º dia, após tratamento com EE nos grupos que desta fizeram uso, por meio de anestésico pentobarbital sódico (100mg/kg) por via endovenosa (veia caudal), conforme princípios éticos e práticos do uso de animais de experimentação

## Determinação do glicogênio muscular

Ao final da pesquisa, após eutanásia, amostras da musculatura sóleo, gastrocnêmio branco e vermelho foram retiradas e digeridas em KOH 30% quente. O glicogênio foi precipitado a partir da passagem por etanol. Entre as fases da precipitação, a amostra foi centrifugada a 3.000rpm, durante 15 minutos<sup>(6)</sup>. Os valores foram expressos em mg/100mg de peso úmido.

## Análise estatística

Foi utilizado o programa BioEstat 5.0®, tendo os dados sido submetidos ao teste de normalidade (Kolmogorov-Smirnov), com fixação de nível crítico à 5% ( $p < 0,05$ ).

## RESULTADOS

Inicialmente, foi avaliado o peso corporal dos animais dos grupos. Os pesos corporais apresentados foram: 321g para o Grupo C; 237g para o Grupo Et; 333g para o Grupo EE; e 278g para o Grupo Et+EE. Assim, constatou-se que o Grupo Et apresentou peso 27 e 31% menor quando comparado aos Grupo C e EE, respectivamente. Por outro lado, o Grupo EtEE apresentou peso 16 e 17% menor quando comparado aos Grupos C e EE, respectivamente, de modo que este esteve 11% maior quando comparado ao Et, conforme a figura 1 ( $p < 0,05$ ).

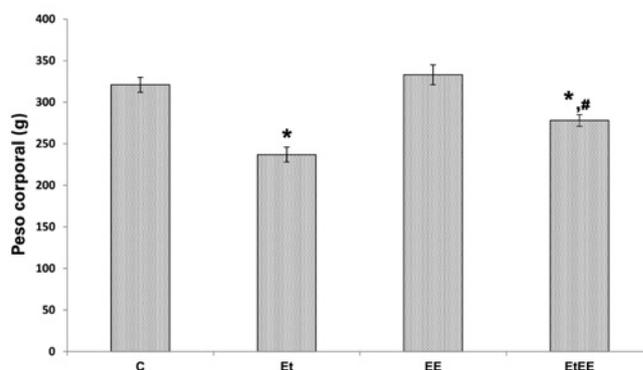
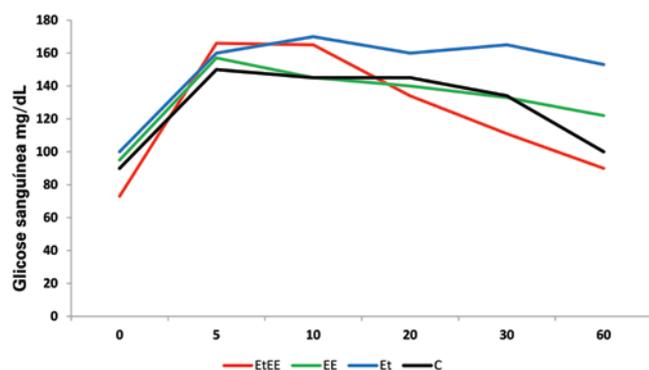


Figura 1. Representação gráfica do peso corporal dos Grupos Controle (C), Etanol (Et), Eletroestimulado (EE) e Etanol + Eletroestimulado (EtEE). Os valores se referem a média ± epm, tendo p como significância

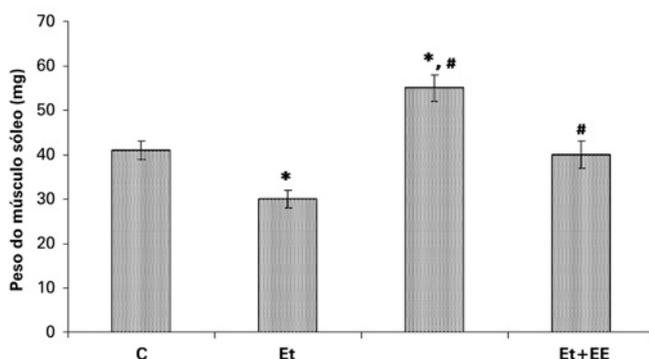
Sobre a glicemia, o Grupo C apresentou uma concentração sanguínea de 100mg/dL; Et de 153mg/dL; EE de 122mg/dL; e EtEE de 90mg/dL. Assim, o Grupo Et apresentou 53% de elevação aos primeiros 60 minutos de eletroestimulação comparado ao Grupo C. O nível de glicemia do Grupo EE se mostrou 22% maior que do Grupo C nos primeiros 60 minutos. Em relação ao Grupo EtEE, observou-se diminuição da concentração da glicose em 10% comparado com o Grupo C, conforme figura 2.

Sobre o peso do músculo S, ficou evidente que, no Grupo C, o peso chegou a 41mg, no grupo Et a 30mg, no EE a 54mg e no EtEE a 40mg. Assim, o Grupo Et apresentou peso 25% menor que o C; o Grupo EE apresentou valores de 34 e 83% maiores se comparado aos Grupos C e Et respectivamente. O Grupo EtEE



**Figura 2.** Representação da constante de decaimento da glicose sanguínea dos grupos: Controle (C), Etanol (Et), Eletroestimulado (EE) e Etanol + Eletroestimulação (EtEE)

não apresentou diferença significativa em relação ao C, mas apresentou-se com peso 24% maior que o Et, conforme figura 3.



**Figura 3.** Peso do músculo sóleo dos grupos controle (C), etanol (Et), eletroestimulado (EE) e etanol seguido de eletroestimulação (EtEE). Os valores correspondem a média  $\pm$  epm  $p < 0,05$  comparado ao controle (\*) e ao etanol (#)

Por fim, avaliaram-se as reservas glicogênicas de S e gastrocnêmio misto (GM), conforme a tabela 1. Como resultante, foram observados os dados no Grupo C, que demonstrou 0,38mL de S e 0,41mL de GM. Já o Grupo Et apresentou 0,26mL de S e 0,25mL de GM; o EE 0,57mL de S e 0,53mL de GM; e o EtEE 0,32mL de S e 0,30mL de GM. Desse modo, o Grupo Et apresentou reservas em 32 e 40% menores no músculo S e GM, respectivamente comparado ao Grupo C. O Grupo EE demonstrou reservas mais elevadas de S e GM comparadas ao C\* (44 e 33%, respectivamente) e ao Et (55 e 49%, respectivamente). Dessa forma, o Grupo EtEE apresentou reservas glicogênicas 16 e 25% menores nos músculos S e GM, em comparação ao C. O mesmo grupo, comparado ao Et, demonstrou resultados de 19 e 17% maiores nos músculos S e GM, respectivamente.

**Tabela 1.** Reservas glicogênicas dos músculos sóleo e gastrocnêmio misto, dos Grupos Controle, Etanol, Eletroestimulado, Etanol + Eletroestimulação

Grupos	S	GM
C	0,38 $\pm$ 0,03	0,41 $\pm$ 0,01
Et	0,26 $\pm$ 0,02*	0,25 $\pm$ 0,03*
EE	0,57 $\pm$ 0,03*,#	0,53 $\pm$ 0,03*,#
Et+EE	0,32 $\pm$ 0,02*,#	0,30 $\pm$ 0,01*,#

Os valores correspondem a média  $\pm$  epm comparados ao Controle (\*) e ao Etanol (#)  
S: músculo sóleo; GM: gastrocnêmio misto; C: Grupo Controle; Et: Grupo Etanol; EE: Grupo Eletroestimulado; Et+EE: Grupo Etanol+Eletroestimulado.

## DISCUSSÃO

No que diz respeito aos malefícios causados pelo etanol nos diversos sistemas orgânicos, o presente estudo evidenciou a intolerância à absorção de glicose pelo organismo e a redução de reserva glicogênica muscular, assim como a consequente diminuição do peso muscular observado no músculo S, com o uso do etanol, o que corrobora os achados da literatura citados ao longo deste estudo.

Em relação aos maiores índices de glicose sanguínea encontrados neste estudo, sabe-se que, nos grupos que fizeram associação ao etanol (Et e EtEE), o consumo em excesso dessa substância demonstrou ter relação direta com alterações no metabolismo da glicose, favorecendo o aumento dos fatores de risco de doenças cardiovasculares e do desenvolvimento do *diabetes mellitus* tipo 2. Isso diminuiu a captação periférica de glicose por degradação dos receptores, resultando em uma queda na transdução do sinal de mobilização do carreador de glicose em direção à membrana celular<sup>(7)</sup>.

Tal fato justificou os achados expostos neste estudo, sendo observada a elevação da glicose no sangue nos Grupos Et e EtEE (associados ao etanol), pois a absorção da glicose pelas células tende a ser realizada de maneira ineficaz, além de haver inibição da gliconeogênese nesses indivíduos<sup>(7)</sup>.

Por outro lado, confrontou-se a visão de que o etanol, quando administrado em baixa dosagem, associa-se ao aumento na sensibilidade à insulina, sendo, assim, favorável à absorção glicogênica e proporcionando um efeito benéfico na diminuição nos fatores de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares<sup>(7)</sup>.

Sobre as alterações musculares observadas neste estudo, a literatura demonstrou que o tecido muscular, frente ao uso crônico do álcool, encontra-se em condição catabólica, já que gera hipotrofia, que culmina em atrofia precoce, favorecendo, assim, a degeneração de fibras musculares, o excesso de infiltrado inflamatório e a atrofia grave das fibras musculares do tipo IIA, assim como déficit motor das fibras musculares, favorecendo a atrofia muscular<sup>(8)</sup>.

Isso, somado ao estado nutricional do etilista (em geral, a intolerância à insulina reduz a matriz energética da musculatura e, conseqüentemente, há menor ação muscular)<sup>(7)</sup>, corrobora os resultados deste estudo no quesito peso muscular, pois os grupos associados ao etanol (Et e EtEE) apresentaram peso reduzido se comparados aos demais grupos. Em relação às reservas glicogênicas musculares, sabe-se que a intolerância à insulina ou que uma ação prejudicada desse hormônio reduz a captação periférica de glicose, atingindo o músculo esquelético, que é o principal sítio responsável pela disposição de glicose por meio da insulina, fato que favorece a redução das reservas glicogênicas musculares e a menor ação muscular<sup>(4)</sup>. Isso está de acordo com os achados deste estudo, segundo os quais o etanol desfavoreceu a ação insulínica e expôs redução das reservas de glicogênio muscular, além de ter favorecido, indiretamente, o menor peso da musculatura em grupos que fizeram alguma associação com o etanol<sup>(4)</sup>.

Desse modo, este estudo, ao evidenciar menores reservas glicogênicas no ventre muscular nos grupos, associado ao tratamento com etanol, pela menor disposição energética gerada, expõe as condições deletérias do músculo, na condição de ingestão de etanol.

Em relação à EENM, estudos apontam que, quando em período de recuperação, sua aplicação pode minimizar os efeitos deletérios ocorridos na musculatura esquelética, mantendo os níveis de glicogênio muscular parelhos aos de grupos saudáveis. Isso porque o impulso gerado pela EENM orienta linhas de campo elétrico, de forma que há súbito influxo de íon sódio para o interior da membrana do nervo motor, gerando um potencial de ação. Esse estímulo é conduzido pelo axônio até a fenda sináptica, mediando, então, a contração muscular<sup>(9,10)</sup>.

Assim, esse achado impulsiona os resultados deste estudo, ao encontrar melhores resultados dos grupos EtEE e EE em relação ao grupo Et, no que diz respeito a reservas de glicogênio muscular.

Conclui-se também que, embora na literatura o etanol em baixas doses tenha efeito benéfico no organismo, em altas doses observa-se efeito nocivo, como foi estudado nesse trabalho.

Quanto à eletroestimulação e o peso muscular, sabe-se que o presente recurso é conhecido como uma técnica importante para manter a condição basal da musculatura ou retardar o decréscimo do comprometimento muscular em situações deletérias<sup>(10)</sup>.

Portanto, os grupos eletroestimulados, associados ou não ao etanol, apresentaram-se com maior peso muscular, corroborando os achados literais descritos.

Levando-se em conta as alterações causadas pelo etanol, o recurso eletroterapêutico empregado neste estudo justifica os eventos presenciados, ao observar melhora nos índices de glicogênio muscular, concomitantemente ao aumento e à manutenção do peso da musculatura dos grupos que fizeram uso de eletroestimulação, comparados aos grupos que fizeram alguma associação ao etanol.

## CONCLUSÃO

Conclui-se que a exposição ao etanol, nos variados sistemas em estudo neste trabalho, foi capaz de diminuir os níveis de glicogênio do músculo S, em grupos que fizeram associação ao etanol, de modo que a EENM favoreceu para conter as desordens orgânicas causadas pelo mesmo em todos os grupos em que esteve associada. É possível concluir, paralelamente a esses achados, a influência da dieta alcoólica, associada à redução do peso muscular e corporal, o aumento dos níveis de glicemia sanguínea, de modo que a EENM minimizou a nocividade causada pelo etanol.

## REFERÊNCIAS

1. Monteiro MG. Alcohol and public health in Americas: a case for action. Washington, D.C: PAHO; 2007.
2. Ferraz ML, Gabbai AA, Oliveira AS, Ferrari AP, Miszputen SJ, Ferreira Neto A, et al. [Histochemical study of the skeletal muscle in chronic alcoholism]. *Arq Neuropsiquiatr*. 1989;47(2):139-49. Portuguese.
3. Silva CA, Guirro RR, Polacow ML, Silva HC, Tanno AP, Rodrigues D. Efeito da metformina e estimulação elétrica sobre as reservas de glicogênio do músculo sóleo normal e desnervado. *Rev Bras Fisioter*. 1999;3(1):55-60.
4. Guirro RR, Silva CA, Forti F, Cancelliero KM. Análise do musculoesquelético desnervado tratado com metformina e/ou estimulação elétrica de baixa frequência. *Rev Bras Fisioter*. 2004;8(1):21-7.
5. Ting JW, Lutt WW. The effect of acute, chronic, and prenatal ethanol exposure on insulin sensitivity. *Pharmacol Ther*. 2006;111(2):346-73.
6. Lo Sil, Russell JC, Taylor AW. Determination of glycogen in small tissue samples. *J Appl Physiol*. 1970;28(2):234-6.
7. Souza J, Molena-Fernandes CA, Batista MR, Silva FP, Bersani-Amado CA, et al. Efeito do tratamento com etanol sobre a gliconeogênese em ratos intolerantes à glicose. *Acta Sci Health Sci*. 2009;31(2):125-32.
8. Adachi J, Asano M, Ueno Y, Niemelä O, Ohlendieck K, Peters TJ, et al. Alcoholic muscle disease and biomembrane perturbations (review). *J Nutr Biochem*. 2003;14(11):616-25.
9. Durigan JL, Cancelliero KM, Guirro RR, Silva CA, Polacow ML. Efeitos da estimulação elétrica neuromuscular no músculo sóleo de ratos: análise morfológica e metabólica. *Acta Ortop Bras*. 2008;16(4):238-41.
10. Matheus JP, Gomide LB, Oliveira JG, Volpon JB, Shimano AC. Efeitos da estimulação elétrica neuromuscular durante a imobilização nas propriedades mecânicas do músculo esquelético. *Rev Bras Med Esporte*. 2007;13(1):55-9.