

ESTUDO MORFOMÉTRICO DO MÚSCULO SÓLEO DE RATOS SUBMETIDOS À IMOBILIZAÇÃO AGUDA ASSOCIADO À ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA NEUROMUSCULAR

Morphometrical Study of Rats Soleus Muscle Submitted to Acute Immobilization Associated to Neuromuscular Electrical Stimulation

*João Luiz Quagliotti Durigan¹
Karina Maria Cancelliero²
Carolina Náglio Kalil Dias³
Carlos Alberto da Silva⁴
Rinaldo Roberto de Jesus Guirro⁴
Maria Luíza Ozores Polacow⁴*

Resumo

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da estimulação elétrica (EE) na área das fibras e densidade do tecido conjuntivo do músculo sóleo de ratos submetidos à imobilização de tornozelo durante 3 dias. Ratos *Wistar* foram divididos em 3 grupos (n=5): controle, imobilizado por 3 dias e imobilizado associado à EE por 3 dias. Após o período experimental, as análises realizadas foram: peso do sóleo, área das fibras e tecido conjuntivo intramuscular do sóleo. A análise estatística foi feita pelos testes Anova seguido pelo Tukey e pelo Kruskal-Wallis ($p < 0,05$). A imobilização não promoveu alterações significativas ($p > 0,05$) no peso muscular do sóleo, porém, foi observada redução ($p < 0,05$) na área das fibras do músculo sóleo em 31%, bem como aumento ($p < 0,05$) na densidade do tecido conjuntivo intramuscular em 279% em relação ao grupo controle. O grupo submetido à EE não mostrou alterações significativas ($p > 0,05$) no peso muscular se comparado ao grupo imobilizado, porém promoveu aumento ($p < 0,05$) de 9,19% na área das fibras e redução ($p < 0,05$) de 47,36% na densidade do tecido conjuntivo. Desse modo, conclui-se que as alterações morfométricas já são evidenciadas na fase aguda da imobilização, antecedendo as alterações do peso do músculo sóleo.

Palavras-chave: estimulação elétrica neuromuscular, imobilização aguda, morfometria, fisioterapia.

¹ Mestre em Fisioterapia - UNIMEP e Doutorando em Ciências Fisiológicas – UFSCar.

² Mestra em Fisioterapia - UNIMEP e Doutoranda em Fisioterapia - UFSCar Karina Maria Cancelliero, Rua Gomes Carneiro, 875 – Centro. CEP: 13400-530 Piracicaba – SP E-mail: karca@terra.com.br.

³ Mestranda em Fisioterapia – UFSCar

⁴ Prof. Dr. PPG – Mestrado em Fisioterapia – UNIMEP

Abstract

The aim of this work was to evaluate the effect of the electric stimulation (EE) in hindlimb immobilization during 3 days in rats on the aspects of the soleus muscle fibers areas and connective tissue density. *Wistar* rats were divided in 3 groups (n=5): control, immobilized per 3 days and immobilized associated to the EE per 3 days. After the experimental period, the analyses were: soleus weight, fibers areas and connective tissue of the soleus muscle. The analysis statistics were realized by tests by Anova followed by Tukey and by Kruskal-Wallis ($p < 0,05$). The immobilization did not promote significant alterations ($p > 0,05$) in the muscular soleus weight. On the other hand, significant reduction ($p < 0,05$) of the soleus fibers areas of the in 31% was observed, as well as significant increase ($p < 0,05$) of the connective tissue density in 279% in relation to the control group. The group submitted to the EE did not show significant alterations ($p > 0,05$) in the soleus weight if compared with the immobilized group, however the soleus fibers area analysis showed that it promoted significant increase of 9,19 % ($p < 0,05$), if compared with the immobilized group. The resource also reduced significantly (47.36% $p < 0,05$) the connective tissue density if compared with immobilized group. In this way, one concludes that the morphometrical alterations already are evidenced in the acute phase of immobilization, preceding the alterations of the soleus weight.

Keywords: neuromuscular electrical stimulation, acute immobilization, morphometry, physiotherapy.

Introdução

A plasticidade das fibras musculares esqueléticas permite que estas sejam capazes de se adaptar deflagrando mudanças no seu tamanho ou na tipagem. Múltiplos estímulos podem promover estas mudanças, merecendo destaque a denervação, imobilização, inatividade prolongada, alterações hormonais, nutrição, estimulação elétrica neuromuscular (EE) entre outros (1, 2).

Neste ínterim, diversos estudos têm demonstrado que a imobilização articular promove redução da área das fibras musculares e da densidade dos capilares, proliferação do tecido conjuntivo intramuscular, além de aumento do "turnover" do colágeno no tecido conjuntivo (3, 4, 5, 6, 7).

Alguns autores sugerem que essas alterações no sistema musculoesquelético ocorrem nos primeiros sete dias frente ao desuso muscular (4, 8, 9). Outros trabalhos apontam evidências de que anteriormente ao período de 4 dias de desuso já existem alterações no peso e na área das fibras musculares (2, 6, 10, 11, 12).

Além disso, muitos trabalhos mostram alterações morfológicas provocadas pela imobilização, demonstrando aumento da densidade de conjuntivo no endomísio e no perimísio (13), e do colágeno tipo I, III indicando que a atrofia por imobilização é acompanhada de alterações fibróticas (14). Segundo Amiel et al. (3), a falta de forças fisiológicas atuando sobre o colágeno impede a formação de ligações cruzadas, dando origem a fibras imaturas que são responsáveis pela fibrose.

Na mesma linha de pesquisa, Williams e Goldspink (4) também demonstraram aumento na quantidade de tecido conjuntivo no músculo sóleo em apenas 2 dias de imobilização. Outros autores relataram redução da concentração do colágeno tipo I, III e IV no músculo sóleo de ratos após 3 dias de imobilização em posição encurtada e alongada em ratos (6, 12).

A EE por meio de eletrodos de superfície é um procedimento terapêutico não invasivo e de grande utilidade clínica, que tem sido usado freqüentemente na reabilitação de diversas patologias. Clinicamente, a EE é usada para o fortalecimento e hipertrofia muscular em casos envolvendo imobilização ou onde haja contra-indicação para o exercício dinâmico, não somente em patologias, mas também no ambiente espacial. Desse modo, esse recurso vem sendo utilizado para recuperar a força muscular, reduzir o tempo de reabilitação e prevenir a atrofia muscular decorrente da imobilização (15).

Nos últimos anos, diversas técnicas têm sido utilizadas, no intuito de minimizar os eventos desencadeados pelo desuso, com destaque para a EE (16). Neste contexto, observou-se que a EE preveniu a atrofia muscular minimizando a redução da área de secção transversal, fibrose intersticial e deficiência de suplemento sanguíneo no músculo tibial anterior de coelhos imobilizado por 3 semanas (9). Resultados semelhantes foram descritos por Polacow et al. (17), que relataram redução da densidade de área do tecido conjuntivo em músculos denervados após 15 dias de EE, apontando para possível redução da fibrose.

Vários estudos abordam a histologia de músculos imobilizados (4, 6, 7, 9, 13), mas há uma escassez de trabalhos sobre os efeitos da EE na condição de imobilização aguda. Desse modo, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da EE imobilização durante 3 dias por órtese de resina acrílica em membro posterior de ratos sobre os aspectos da área das fibras musculares e densidade do tecido conjuntivo do músculo sóleo.

Material e Métodos

Grupo Experimental

Ratos *Wistar* (3 a 4 meses, 250-300g) foram mantidos em condições controladas de biotério, recebendo água e ração *ad libitum* e tratados segundo recomendações do *Guide for Care Use of Laboratory Animals* (18). A caixa, contendo 3 animais, tinha a dimensão de 1200 cm² e foi forrada com jornal, já que a serragem poderia entrar no compartimento interno da órtese, podendo provocar lesões cutâneas. Os animais foram divididos em 3 grupos (n=5): controle (C), imobilizado durante 3 dias (I) e imobilizado associado à EE durante 3 dias (IEE).

Procedimento para imobilização

Para a imobilização, os ratos foram anestesiados com pentobarbital sódico (40mg/kg peso) e o membro posterior esquerdo imobilizado com o modelo de resina acrílica, o qual foi adaptado no membro posterior dos ratos, associado a uma cinta de PVC (diâmetro 40mm) revestida com látex, a dois rotadores laterais (15mm de extensão), os quais permitiram a sua movimentação (19) (Figura 1).

O conjunto, com aproximadamente 22,72±2,25 (média±dpm) gramas, não interferiu na deambulação do animal, havendo descarga de peso no membro imobilizado durante a deambulação (Figura 2).

Procedimento para EE

Para a execução da EE, os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico (40mg/kg peso) e o membro posterior esquerdo foi tricomizado para garantir uma maior efetividade da EE e do

posicionamento dos eletrodos (silicone-carbono - área de 1cm²). A EE foi realizada em sessão diária de 20 minutos, por um período de 15 dias, iniciado 24 horas após a imobilização. Um eletrodo foi colocado na região inguinal e o outro no músculo tríceps sural, sendo que no membro imobilizado este segundo eletrodo foi acoplado dentro da órtese (Figura 3). Os parâmetros da EE foram: frequência de 10Hz, t=0,4 ms, pulso quadrático bifásico. A intensidade da corrente foi padronizada em 5.0mA, a partir da visualização da contração muscular, sendo acrescida de 1.0mA a cada 5 minutos, com intuito de manter o nível de contração durante todo o período de estimulação.

Figura 1. Órtese em posição neutra do tornozelo constituída do modelo de resina acrílica (1), rotadores laterais (2) e cinta abdominal (3).

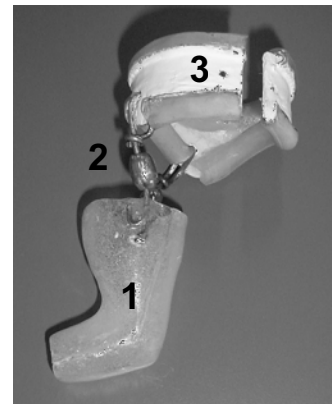


Figura 2. Adaptação da órtese no membro posterior esquerdo do animal, mantendo a articulação do tornozelo em posição neutra. (1) Modelo de resina, (2) Rotadores laterais e (3) Cinta abdominal

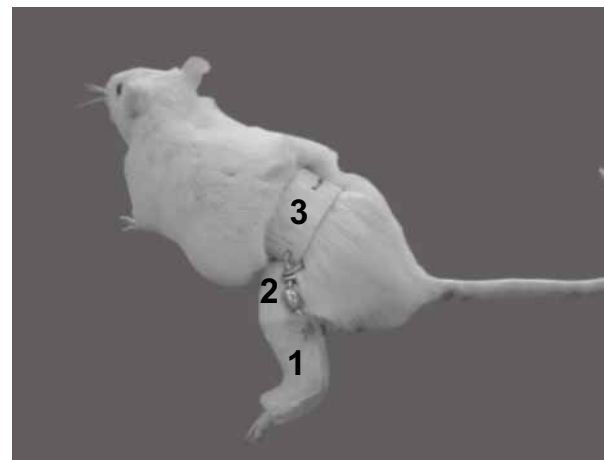


Figura 3. Posicionamento dos eletrodos para a aplicação da EE no membro posterior esquerdo imobilizado, sendo um eletrodo na região inguinal (eletrodo 1) e outro na porção posterior da perna, acoplado dentro da órtese (eletrodo 2).



Histologia

Após o período experimental, as análises realizadas foram: peso do sóleo, área das fibras e tecido conjuntivo intramuscular do sóleo. Para a análise morfométrica do sóleo, o segmento ventral foi fixado e tamponado em solução de formol a 10%. O material foi processado em parafina obtendo-se vários cortes transversais não seriados de 7 μ m de espessura, que foram corados pela Hematoxilina-Eosina (HE).

Foi utilizado um sistema de análise de imagens constituído de um software Image Pró-plus 4.0 (Media Cybernects), câmera digital (JVC) acoplada a um microscópio (Zeiss) com integração a um microcomputador. Todas as imagens foram obtidas com objetiva de 10x.

Foram analisadas as áreas de 375 fibras do músculo sóleo por animal, assim escolhidos: 15 fibras por área, sendo 5 áreas por corte, num total de 5 cortes por animal. Utilizou-se de um retículo quadrado para a escolha de 15 fibras por corte, aleatoriamente, que coincidiam com as interseções de retas.

Para a análise da densidade do tecido conjuntivo intramuscular, foi utilizado o sistema de planimetria por contagem de pontos (20) e a

quantificação foi realizada por meio de um retículo com quadrados de 2500 μ m² contendo 56 intersecções de reta. Foram contados os pontos coincidentes no endomísio e perimísio, em 5 áreas por corte, sendo 5 cortes por animal, perfazendo um total de 1400 pontos por animal. Desse modo, a área relativa do tecido conjuntivo (densidade de área) foi calculada dividindo-se a soma do número de pontos coincidentes nas intersecções de reta sobre o tecido conjuntivo (endomísio e perimísio) pelo número total de pontos.

Análise Estatística

A análise estatística foi realizada inicialmente pelo teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov. Para a variável peso muscular, que apresentou distribuição normal, foi utilizado Anova seguido do teste de Tukey. Para as variáveis área das fibras musculares e densidade do tecido conjuntivo foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis, já que elas não apresentaram distribuição normal. Em todos os cálculos foi fixado um nível crítico de 5% ($p < 0,05$).

Resultados

A imobilização do membro posterior durante 3 dias não promoveu alterações significativas ($p > 0,05$) no peso muscular do sóleo, conforme mostra a tabela 1. Com relação à análise morfométrica, a imobilização promoveu redução significativa ($p < 0,05$) da área das fibras do músculo sóleo em 31% (tabela 2), bem como aumento significativo ($p < 0,05$) da densidade do tecido conjuntivo intramuscular em 279% em relação ao grupo controle, conforme mostra a tabela 3 e a figura 5.

O grupo submetido à EE não mostrou alterações significativas ($p > 0,05$) no peso muscular se comparado ao grupo imobilizado. Por outro lado, a análise das fibras do músculo sóleo mostrou que o recurso promoveu aumento significativo de 9,19% ($p < 0,05$), se comparado ao grupo imobilizado (Tabela 2, Figura 6).

Um ponto merecedor de destaque foi que a EE minimizou a proliferação do tecido conjuntivo no músculo sóleo frente à imobilização, já que o recurso promoveu redução significativa na ordem de 47,36% ($p < 0,05$) da densidade do tecido conjuntivo se comparado com o grupo imobilizado (Tabela 3, Figura 6).

*Tabela 1. Valor da média±dpm do peso (mg) do músculo sóleo (S) do grupo controle (C), imobilizado por 3 dias (I) e imobilizado associado à estimulação elétrica neuromuscular por 3 dias (IEE), n=5. * comparado ao C, # comparado ao grupo I, p<0,05.*

Grupos	Sóleo
C	123,5±5,28
I	127,2 ± 13,59
IEE	120,4 ± 18,63

*Tabela 2. Valor da mediana da área das fibras (µm²) do músculo sóleo nos grupos controle (C), imobilizado por 3 dias (I) e imobilizado associado à estimulação elétrica neuromuscular por 3 dias (IEE), n=5. * comparado ao C, # comparado ao grupo I, p<0,05.*

Grupos	1.º Quartil	Mediana	3.º Quartil
C	2180,23	2496,13	2878,66
I	1382,704	1733,59 *	2099,445
IEE	1666,563	1892,86 *#	2147,684

*Tabela 3. Valor da mediana da densidade de área (%) do tecido conjuntivo dos grupos controle (C), imobilizado por 3 dias (I), e imobilizado associado à estimulação elétrica neuromuscular por 3 dias (IEE), n=5. * comparado ao C, # comparado ao grupo I, p<0,05.*

Grupos	1.º Quartil	Mediana	3.º Quartil
C	7,14	8,93	10,71
I	26,79	33,93 *	41,07
IEE	14,29	17,86 *#	23,21

Figura 4. Imagem das fibras do músculo sóleo do grupo controle.

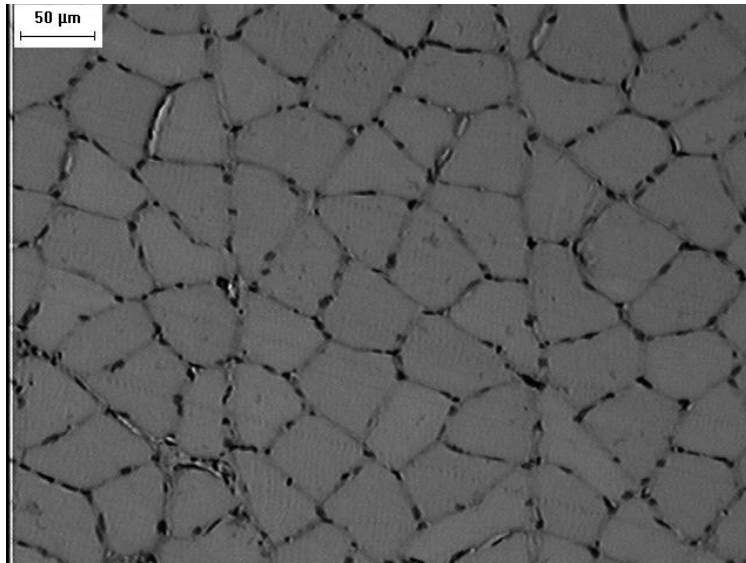


Figura 5. Imagem do músculo sóleo imobilizado em posição neutra do tornozelo 3 dias. Observar a redução da área das fibras musculares (asterisco) e aumento do tecido conjuntivo (seta) em relação ao grupo controle.

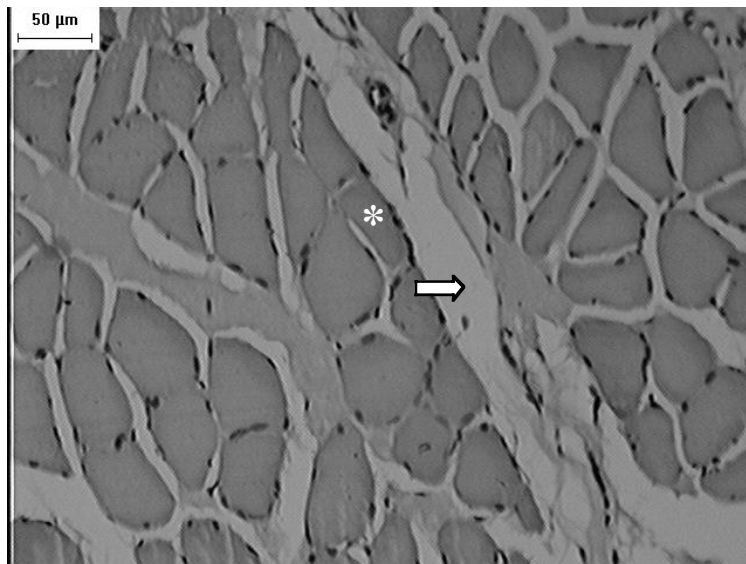
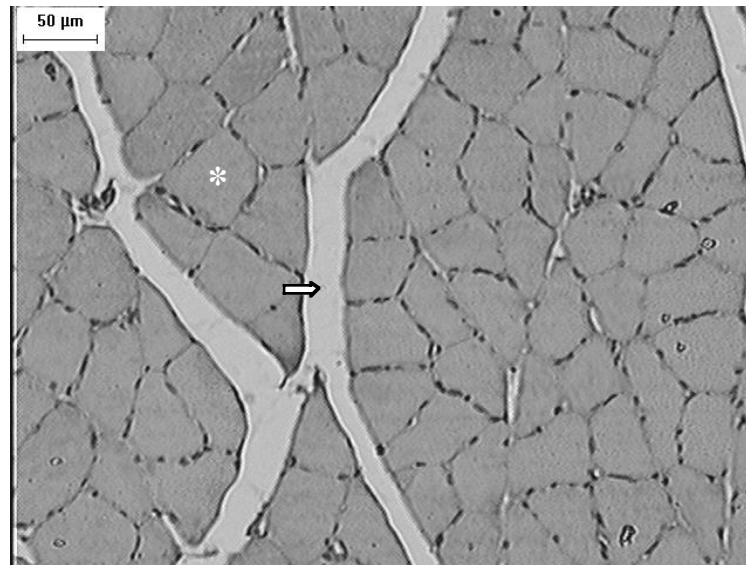


Figura 6. Imagem do músculo sóleo imobilizado e tratado com EE por 3 dias. Observar o aumento da área das fibras musculares (asterisco) e redução do tecido conjuntivo (seta) em relação ao grupo imobilizado durante 3 dias.



Discussão

Tem sido observado que as fibras musculares lentas (tipo I) possuem maior vulnerabilidade à atrofia do que as fibras musculares rápidas (tipo II), devido a diferenças no seu metabolismo, sendo que a imobilização parece ter efeitos diferentes na síntese protéica dos diferentes tipos de fibras musculares (21). Nesse contexto, foi observado que as enzimas oxidativas respondem por meio da diminuição da sua atividade durante a imobilização, sugerindo que as fibras musculares que possuem metabolismo predominantemente oxidativo (tipo I) foram as mais susceptíveis à atrofia muscular (22).

Além da susceptibilidade à atrofia inerente ao metabolismo das fibras tipo I, outro fator que determina essa condição são as características de fibras posturais. Nesse sentido, Ploug et al. (23) 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.

Esses estudos corroboram a afirmação de Lieber (24), reforçando o que a literatura relata, de que os músculos considerados antigravitacionários, os uni-articulares e os que possuem maior propor-

ção de fibras lentas são os mais vulneráveis à atrofia induzida pelo desuso muscular. Sendo assim, o músculo sóleo, predominantemente composto por fibras do tipo I, foi o escolhido para a análise morfométrica devido à sua maior susceptibilidade à atrofia inerente ao desuso.

A imobilização durante 3 dias em posição neutra não promoveu alterações no peso do músculo sóleo, por outro lado ocorreu redução significativa de 31% da área das fibras musculares, apontando para o quadro de hipotrofia muscular inerente ao desuso.

De maneira geral, a imobilização por diferentes períodos resulta em atrofia variando de 15% a 70%, dependendo dos animais utilizados e das fibras avaliadas (QIN et al., 1997). Gomes et al. (2004) observaram redução de 43% da área da fibra do músculo sóleo imobilizado durante 3 semanas. Kannus et al. (5) relataram redução de 69% da área da fibra do músculo sóleo imobilizado por meio de aparelho gessado durante 3 semanas.

Outros trabalhos foram direcionados para a avaliação dos efeitos da imobilização aguda no comprometimento do sistema musculoesquelético. Smith et al. (11) avaliaram o músculo sóleo de coelhos no segundo e sexto dia após imobilização em posição encurtada e observaram redução do

peso muscular (15%), bem como da área de secção transversa (16%) em apenas dois dias de imobilização. Outros autores também relataram redução (19%) do peso muscular do sóleo de ratos após 4 dias de imobilização (10).

Resultados semelhantes foram descritos por Ahtikoski et al. (6), que estudaram a imobilização articular durante 3 dias em ratos e relataram redução de 20% do peso do músculo sóleo em posição encurtada e 17% em posição alongada. Bodine et al. (2) compararam o peso do gastrocnêmio de ratos em três modelos de desuso, a imobilização, suspensão e denervação. Concluíram que já nos primeiros 3 dias de desuso ocorreu redução de aproximadamente 10% do peso muscular nos três modelos estudados.

Com relação à densidade do tecido conjuntivo, a imobilização promoveu aumento significativo de 279%. Esses resultados estão de acordo com a literatura, já que para Józsa et al. (13), independente do modelo de desuso muscular estudado (imobilização, tenotomia ou denervação), a quantidade de tecido conjuntivo intramuscular aumenta de maneira relevante, variando de 50% a até 700%.

Nesse contexto, Williams e Goldspink (4) observaram que em apenas 2 dias de imobilização em posição encurtada, o músculo sóleo apresentou aumento na quantidade de tecido conjuntivo no perímio. Ainda foi constatado que as fibras de colágeno do perímio apresentavam um ângulo de fixação mais agudo do que o observado nos músculos normais, com conseqüente diminuição da elasticidade muscular e aumento da tensão passiva. Outros autores relataram redução da concentração do colágeno tipo I e III no músculo sóleo de ratos após 3 dias de imobilização em posição encurtada e alongada (12).

Amiel et al. (3) observaram que os tecidos conjuntivos densos imobilizados sofrem alterações no metabolismo de colágeno, em razão da falta de forças fisiológicas atuando sobre ele, o que impede a formação de ligações cruzadas, dando origem a fibras imaturas, os quais são responsáveis pela fibrose. Essa fibrose pode estar associada à mudança no metabolismo do colágeno devido ao desuso muscular, pois se sabe que ocorre aumento do seu *turnover* após a imobilização (4).

Neste estudo, com relação à utilização da EE, o recurso mostrou ser eficaz na prevenção de proliferação do tecido conjuntivo, bem como em

minimizar a redução da área das fibras musculares do sóleo submetido à imobilização durante 3 dias.

Esses resultados estão de acordo com os apresentados por Qin et al. (9), que utilizaram a EE com frequência de 50Hz, diariamente por 30 minutos, 5 vezes na semana durante 3 semanas no músculo tibial anterior de coelhos submetidos à imobilização em posição de encurtamento. Os autores observaram que o recurso foi efetivo na prevenção da atrofia muscular minimizando a redução da área de secção transversal, fibrose intersticial e deficiência de suprimento sanguíneo.

A EE (f:10Hz, 8h/dia) também mostrou-se eficaz em prevenir atrofia no músculo sóleo inerte a suspensão em ratos durante 21 dias. Os músculos submetidos ao desuso reduziram o seu peso em 56%, já os submetidos à EE, a redução foi de 29%. Paralelamente, também ocorreu prevenção da redução da área de secção transversal e da fração de proteínas miofibrilares (25).

Outros autores demonstraram benefícios da EE sob o tecido conjuntivo submetido ao desuso. Nesse contexto, Williams et al. (4) observaram que a EE associada à imobilização do tornozelo em posição encurtada de coelhos durante 7 dias preveniu a deposição do tecido conjuntivo intramuscular. Polacow et al. (17) também demonstram que a EE (f:10Hz, T:3ms, pulsos quadráticos bifásicos, On/Off de 2:2s, 20 min) promoveu redução da densidade de área do tecido conjuntivo nos músculos sóleo denervados por 15 dias, apontando para possível redução da fibrose, e aumento na quantidade de grânulos de glicogênio.

Esses resultados corroboram a afirmação de Avramidis et al. (15), que descreveram a importância da EE com objetivos de recuperar a força muscular, reduzir a proliferação do tecido conjuntivo intramuscular, reduzir o tempo de reabilitação e prevenir a atrofia muscular decorrente da imobilização.

Devido ao interesse de se verificar os efeitos da EE na condição de imobilização articular, diversos estudos foram realizados, utilizando-se de diferentes técnicas e parâmetros de aplicação. Porém, considerações devem ser feitas à escassez de trabalhos que utilizem a EE em períodos agudos de imobilização. Nesse sentido, há necessidade de um maior número de estudos, com análises diversificadas que contemplem o período agudo de imobilização.

Considerações Finais

As alterações morfométricas já são evidenciadas na fase aguda da imobilização, antecedendo as alterações do peso do músculo sóleo. Além disso, vale ressaltar a importância da intervenção por meio da EE durante esse período, com objetivo de minimizar as alterações musculoesqueléticas observadas a longo prazo.

Referências

1. Salvini TF In: Marques AP. Cadeias Musculares – Um programa para ensinar avaliação fisioterapêutica global. São Paulo: Manole; 2000.
2. Bodine SC et al. Identification of Ubiquitin Ligases Required for Skeletal Muscle Atrophy. *Science* 2001; 23:1704-1708.
3. Amiel D et al. The effect of immobilization on collagen turnover in connective tissue: a biochemical-biomechanical correlation. *Acta orthop scan* 1982; 53:325-332.
4. Williams PE, Goldspink G. Connective tissue changes in immobilized muscle. *J Anat* 1984; 138:343-50.
5. Kannus P et al. Free mobilization and low-to high-intensity exercise in immobilization-induced muscle atrophy. *J Appl Physiol* 1998; 84: 1418-24.
6. Ahtikoski AM et al. Synthesis and degradation of type IV collagen in rat skeletal muscle during immobilization in shortened and lengthened positions. *Acta Physiol Scand* 2003; 177:473-81.
7. Gomes ARS et al. Effect of one stretch a week applied to the immobilized soleus muscle on rat muscle fiber morphology. *Braz J Med Biol Res* 2004; 37:1473-1480.
8. Józsa L et al. Quantitative alterations in intramuscular connective tissue following immobilization: An experimental study in the rat calf muscles. *Exp Mol Pathol* 1988;49: 267-278.
9. Qin L et al. Electrical stimulation prevents immobilization atrophy in skeletal muscle of rabbits. *Arch Phys Med Rehabil* 1997;78: 512-7.
10. Kondo H et al. Mechanism of oxidative stress in skeletal muscle atrophied by immobilization. *Am J Physiol* 1993;265: 839-844.
11. Smith HK et al. Nuclear DNA fragmentation and morphological alteration in adult rabbit skeletal muscle after short-term immobilization. *Cell Tissue Res* 2000; 302: 235-241.
12. Ahtikoski AM et al. Regulation of synthesis of fibrillar collagens in rat skeletal muscle during immobilization in shortened and lengthened positions. *Acta Physiol Scand* 2001; 172: 131-140.
13. Józsa L et al. The effect of tenotomy and immobilization on intramuscular connective tissue. *J Bone Joint Surg* 1990;72:293-7.
14. Salonen V et al. Changes in intramuscular collagen and fibronectin in denervation atrophy. *Muscle Nerve* 1985;8: 125-135.
15. Avramidis K et al. Effectiveness of electric stimulation of the vastus medialis muscle in the rehabilitation of patients after total knee arthroplasty. *Arch Phys Med Rehabil* 2003; 84: 1850-53.
16. Silva CA et al. Efeito da metformina e estimulação elétrica sobre as reservas de glicogênio do músculo sóleo normal e denervado. *Rev Bras Fisiot* 1999; 3:55-60.
17. Polacow MLO et al. Estudo morfométrico do músculo sóleo denervado de ratos tratados pela associação de metformina e estimulação elétrica. *Rev bras fisioter* 2003;7:77-84.
18. National Research Council. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Washington: National Academy Press, 1996.
19. Silva CA, Guirro RRJ, Polacow MLO, Cancelliero KM, Durigan JLQ. Rat hindlimb joint immobilization with acrylic resin orthoses. *Braz J Med Biol Res* 2006; 39: 979-985

20. Mathieu O et al. Measuring error and sampling variation in stereology: comparison of the efficiency of various methods for planar image analysis. *J Microsc* 1981; 121:75-88.
21. Heslinga HJ, Kronnie G, Huijing PA. Growth and immobilization effects on sarcomeres: a comparison between gastrocnemius and soleus muscles of the adult rat. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 1995; 70: 49-57.
22. Appell HJ. Muscular atrophy following immobilization. *Sports Med* 1990; 7:42-58.
23. 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* 1995; 268:980-986.
24. Lieber RL. Skeletal muscle structure, function, and plasticity, the physiological basis of rehabilitation. 3. ed. Philadelphia: Lippincott, 2002.
25. Canton F et al. Effects of chronic low frequency stimulation on structural and metabolic properties of hindlimb suspended rat soleus muscle. *Eur J Physiol Occup Physiol* 1995; 70:528-35.

Recebido em: 04/08/2005

Received in: 08/04/2005

Aprovado em: 17/04/2006

Approved in: 04/17/2006