

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE BIOCÊNCIAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

LISIANI SAUR

**EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO E DA ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA SOBRE AS
CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DO MÚSCULO ESQUELÉTICO NA
INSUFICIÊNCIA CARDÍACA EXPERIMENTAL**

Porto Alegre

2010

LISIANI SAUR

**EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO E DA ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA SOBRE AS
CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DO MÚSCULO ESQUELÉTICO NA
INSUFICIÊNCIA CARDÍACA EXPERIMENTAL**

Trabalho de conclusão de curso de graduação
apresentado à Faculdade de Biociências da
Pontifícia Universidade Católica do Rio
Grande do Sul, como requisito parcial para
obtenção do grau de Bacharel em Ciências
Biológicas.

Porto Alegre

2010

Dedico esse trabalho à minha família e ao meu namorado pelo incentivo, segurança, carinho e força à minha formação acadêmica.

AGRADECIMENTOS

Aos professores da Faculdade de Biociências pelo ensino recebido e auxílio na minha formação acadêmica.

Aos colegas do Laboratório de Biologia Celular e Tecidual da PUCRS pelo apoio em todos os momentos da minha graduação.

A técnica de laboratório Raquel Mattos pela ajuda imprescindível sempre.

E, em especial, ao Prof. Dr. Léder Leal Xavier pela amizade, confiança e referência profissional.

RESUMO

A insuficiência cardíaca crônica (ICC) é caracterizada pela disfunção ventricular esquerda que resulta em uma função hemodinâmica anormal e em uma redução da capacidade funcional tanto do miocárdio quanto da musculatura esquelética. A ICC deriva de uma lesão no coração que resulta na diminuição da função ventricular e diminuição progressiva do débito cardíaco. O débito cardíaco, gerado pela ICC, é insuficiente para satisfazer as demandas metabólicas, causando dano muscular periférico. Entre as consequências clínicas dessa patologia, destacam-se a redução da capacidade funcional e a má qualidade de vida. Essas implicações parecem não estar totalmente relacionadas à função cardíaca, mas muito dos sintomas são hoje atribuídos a anomalias do músculo esquelético e da função vascular. Nesse sentido, a aplicação de um protocolo de exercício físico e de estimulação elétrica do músculo esquelético são procedimentos, não farmacológicos, importantes no tratamento da ICC, pois contribuem para a melhoria clínica e demonstram reduzir a mortalidade e morbidade de pacientes que sofrem dessa patologia. Ademais, há uma escassez de estudos relativos à compreensão das bases morfológicas que comparem esses dois tipos de abordagens terapêuticas. Dessa forma, o presente projeto tem por finalidade a análise dos efeitos da eletroestimulação e do exercício físico sobre os parâmetros histoquímicos que refletem o metabolismo da musculatura esquelética em um modelo experimental de ICC.

Palavras-chave: Insuficiência cardíaca. Músculo esquelético. Exercício físico. Eletroestimulação.

ABSTRACT

Chronic heart failure (CHF) is characterized by left ventricular dysfunction that results in abnormal hemodynamic function and in reduction of the functional capacity of both the myocardium and the striated skeletal muscle. CHF is generated by a heart lesion that leads to reduced ventricular function and progressive reduction in cardiac output. The cardiac output generated by CHF is unable to meet metabolic demands, so causing muscular damage. Of particular note among the clinical consequences of this pathology are the reduction in the functional capacity and poor quality of life. These implications are not necessarily directly related to cardiac function and today many symptoms are attributed to anomalies of the striated skeletal muscle and vascular function. Therefore, a physical exercise and electrical stimulation of striated skeletal muscle are important non pharmacological procedures in the treatment of CHF, since they contribute to patient clinical improvement and have been showed to reduce mortality and morbidity in patients suffering from this pathology. Furthermore, there is a scarcity of studies related to the comprehension of the morphological bases that compare these two therapeutic approaches. Thus, the purpose of the present project is to analyze the effects of electrical stimulation and physical exercise on the histochemical parameters that reflect the metabolism of striated skeletal muscle in a experimental model of CHF.

Key words: Heart failure. Striated skeletal muscle. Physical exercise. Electrical stimulation.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	7
1.1	INSUFICIÊNCIA CARDÍACA.....	7
1.2	EFEITOS DA ICC NA MUSCULATURA ESQUELÉTICA.....	7
1.3	ALTERNATIVAS TERAPÊUTICAS NA ICC	8
1.3.1	Exercício físico (EF)	8
1.3.2	Eletroestimulação (EE)	9
1.4	IMPORTÂNCIA E JUSTIFICATIVA DA REALIZAÇÃO DO PROJETO	10
2	OBJETIVOS	10
3	MATERIAIS E MÉTODOS	11
3.1	LOCAL E PERÍODO DE EXECUÇÃO DO PROJETO.....	11
3.2	ASPECTOS ÉTICOS.....	11
3.3	ANIMAIS.....	11
3.4	INDUÇÃO DO INFARTO AGUDO DO MIOCÁRDIO	12
3.5	IMPLANTAÇÃO DO ELETRODO	13
3.6	PROTOCOLO DE ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA	13
3.7	PROTOCOLO DE EXERCÍCIO FÍSICO	14
3.8	COLETA DOS MÚSCULOS	14
3.9	PROCEDIMENTOS HISTOLÓGICOS	14
3.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA	15
4	RESULTADOS ESPERADOS E PERSPECTIVAS	15
	BIBLIOGRAFIA	17
	APÊNDICES	20
	APÊNDICE A – Orçamento	20
	APÊNDICE B – Cronograma	21

1 INTRODUÇÃO

1.1 Insuficiência cardíaca

A insuficiência cardíaca crônica (ICC) é uma síndrome incapacitante causada por uma série de anormalidades cardíacas, sendo comumente relacionada à cardiopatia isquêmica ou hipertensão (MCKELVIE, 2008). A ICC é um dos distúrbios cardiovasculares mais comuns na sociedade ocidental. Devido ao tratamento mais eficaz desse tipo de patologia, o número de pacientes que vivem com infarto é crescente (JONSDOTTIR et al., 2006).

Fisiopatologicamente, a ICC acarreta prejuízo inicial para o coração resultando na diminuição da musculatura do ventrículo esquerdo (VE) e gradual redução no débito cardíaco. Eventualmente, a quantidade de sangue, que é bombeada pelo coração, é insuficiente para o fornecimento de perfusão sanguínea para suprir as necessidades metabólicas (KITZMAN et al., 2008; DUSCHA et al., 2008). As consequências clínicas dessa patologia podem incluir dispnéia, fadiga, intolerância ao exercício, anomalias no fluxo sanguíneo periférico, disfunção endotelial, anomalias na musculatura esquelética e anormalidades respiratórias (MCKELVIE, 2008; JONSDOTTIR et al., 2006; KITZMAN et al., 2008; DUSCHA et al., 2008).

1.2 Efeitos da ICC na musculatura esquelética

Mais de duas décadas de pesquisas demonstram que os danos gerados pela ICC são muito complexos e suas anormalidades se estendem a outros sistemas além do coração. Entre seus efeitos sistêmicos, a ICC tem impacto negativo sobre o fluxo sanguíneo periférico e sobre o metabolismo oxidativo do músculo esquelético (MCKELVIE, 2008; DUSCHA et al., 2008). Estudos recentes comprovam que pacientes com insuficiência cardíaca frequentemente exibem respostas metabólicas anormais no músculo esquelético, em resposta ao exercício físico, incluindo o uso deficiente de oxigênio (O₂) e um início precoce do metabolismo anaeróbio (FANG; MARWICK, 2003). Entretanto, alguns estudos demonstram que essa intolerância ao exercício não está correlacionada somente com a função cardíaca dos

pacientes com ICC, muitos dos sintomas são atribuíveis a anomalias no músculo esquelético e na função vascular (JONSDOTTIR et al., 2006; FANG et al., 2003).

A disfunção endotelial, observada em pacientes com ICC, causa contração dos vasos e aumenta a resistência vascular, o que reduz o suprimento de sangue para a musculatura esquelética, contribuindo para a má função muscular e seus sintomas (JONSDOTTIR et al., 2006). A disfunção hemodinâmica, induz ao desenvolvimento de alterações musculares estruturais e funcionais que, por sua vez, estão relacionados com a diminuição da capacidade funcional, o estresse oxidativo muscular (DOBSAK et al., 2006a), o aumento de citocinas inflamatórias, bem como a redução da atividade de citocinas antiinflamatórias (NUNES et al., 2008). Desse modo o aumento da função endotelial e da vascularização da musculatura esquelética e cardíaca pode resultar em melhorias do ventrículo esquerdo e do músculo esquelético (FANG; MARWICK, 2003).

Importantes alterações histológicas e bioquímicas do músculo esquelético foram identificadas em pacientes com insuficiência cardíaca de longa duração (SULLIVAN et al., 1990; KINDIG et al., 1999). Estudos confirmam que pacientes com ICC apresentam uma diminuição da massa muscular e da área transversal muscular, quando comparados com indivíduos saudáveis (DUSCHA et al., 2008).

Assim, a redução da capacidade funcional do músculo esquelético é a principal característica dos pacientes com ICC e está comumente associada com a redução da qualidade de vida e ao mau prognóstico (JONSDOTTIR et al., 2006; KITZMAN et al., 2008).

1.3 Alternativas terapêuticas na ICC

1.3.1 Exercício físico (EF)

Estudos clínicos demonstram que o aumento da perfusão sanguínea sistêmica (periférica), em pacientes com ICC, está associado ao aumento da sobrevida. No entanto, as terapias farmacológicas, que aumentam a função ventricular esquerda, estão associadas com um aumento na mortalidade. Por outro lado, dados comprovam que a atividade física monitorada é um importante fator de melhora da função periférica na ICC, tanto em modelos animais como em humanos, sem aumento na mortalidade (NUNES et al., 2008). O

treinamento físico induz adaptações que provaram ser benéficas para o aumento na capacidade funcional e melhorias no músculo esquelético em humanos (JONSDOTTIR et al., 2006; DUSCHA et al., 2008). A melhoria da função muscular, através de exercícios físicos, pode favorecer a nutrição do músculo esquelético. O treinamento físico reverte a vasoconstrição periférica, melhora o fluxo sanguíneo para o músculo em exercício e retarda o aparecimento do metabolismo anaeróbico no músculo esquelético (FANG; MARWICK, 2003).

Estudos recentes evidenciam que o treinamento físico pode reverter as alterações patológicas em pacientes com ICC. Relatos feitos durante a última década demonstram os benefícios do exercício na capacidade funcional, ventilação, estado metabólico, controle autônomo da frequência cardíaca (FC) e outros parâmetros, incluindo o desempenho do músculo esquelético e função endotelial deficiente (DOBSAK et al., 2006a). Dados atuais mostraram inclusive que o treinamento físico reverte a intolerância ao exercício, melhora a qualidade de vida (KITZMAN; GROBAN, 2008), o débito cardíaco e aumenta o fornecimento de sangue necessário para a demanda metabólica do músculo esquelético (DUSCHA et al., 2008).

1.3.2 Eletroestimulação (EE)

Um grande número de novas estratégias de treinamento vem sendo descritas, como a estimulação elétrica funcional (DOBSAK et al., 2006a; DOBSAK et al., 2006b; HARRIS et al., 2003) e o treinamento da musculatura inspiratória (DALLAGO et al., 2006). Exercitar um pequeno grupo muscular pode otimizar a perfusão muscular durante a estimulação e estabelecer uma baixa demanda do coração em relação ao trabalho do corpo inteiro (QUITTAN et al., 1999). A estimulação elétrica é um método de exercício que requer menos capacidade funcional para fazê-lo e pode ser executado por pacientes incapazes de realizar um treinamento convencional devido aos seus sintomas de ICC e/ou a outras comorbidades como, por exemplo, pacientes com escoliose, distrofia muscular e paraplegia (HARRIS et al., 2003).

Numerosos estudos enfocam os efeitos da estimulação elétrica de baixa frequência (EEBF) no músculo esquelético de mamíferos. Durante a atividade física, as unidades motoras são ativadas hierarquicamente, mas a atividade do músculo induzida pela estimulação elétrica não é natural porque ignora o recrutamento fisiológico e ativa todas as unidades

motoras simultaneamente. Em outras palavras, a estimulação elétrica pode atingir um nível de trabalho mais intensivo do que qualquer tipo de exercício (DOBSAK et al., 2006a).

Deste modo, a EEBF pode ser considerada um método seguro de treinamento físico, sem efeitos colaterais. A EEBF dos membros inferiores pode melhorar a força muscular e, provavelmente, o suporte sanguíneo para o músculo estimulado. Um programa de reabilitação baseado nesse método pode ser uma alternativa ao exercício convencional para a melhoria da qualidade de vida de pacientes com ICC (DOBSAK et al., 2006a).

1.4 Importância e justificativa da realização do projeto

A implementação deste estudo fundamenta-se no fato de que a insuficiência cardíaca de baixo débito, gerada por infarto agudo do miocárdio (IAM), tem grande incidência e prevalência na população ocidental; só no Brasil, 1.112.054 internações ocorreram no ano de 2008 devido a doenças do aparelho circulatório (BRASIL a) e 72.174 óbitos foram registrados por infarto do miocárdio nesse mesmo ano (BRASIL b). Apesar dos avanços nos tratamentos farmacológicos, o prognóstico na insuficiência cardíaca continua escasso e as taxas de morbidade e mortalidade em pacientes com insuficiência cardíaca grave permanecem relativamente elevadas (JONSDOTTIR et al., 2006). Devido ao dano cardíaco gerado, as conseqüências clínicas dessa patologia são quase que invariavelmente acompanhadas de uma redução e incapacidade da musculatura esquelética. Neste sentido, a aplicação de um protocolo de exercício físico e de estimulação elétrica pode ser uma importante alternativa na reabilitação muscular destes pacientes, melhorando o prognóstico dos mesmos.

Contudo, são escassos os estudos relativos à compreensão das bases morfológicas que comparem esses dois tipos de abordagens terapêuticas. Portanto, esse estudo apresenta extrema relevância e caráter inovador.

2 OBJETIVOS

Objetivo geral

Analisar os efeitos do exercício físico e da eletroestimulação sobre parâmetros histoquímicos que refletem o metabolismo da musculatura esquelética de ratos com insuficiência cardíaca induzida por infarto do miocárdio.

Objetivos específicos

Avaliar, quantitativamente, os músculos sóleo e extensor longo dos dedos, quanto a:

- A) área transversal muscular;
- B) densidade de fibras musculares;
- C) área das fibras musculares;
- D) densidade de vasos sanguíneos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Local e período de execução do projeto

A parte experimental do presente projeto será executada no Laboratório de Biologia Celular e Tecidual da Faculdade de Biociências da PUCRS no período de julho de 2010 a julho de 2012.

3.2 Aspectos éticos

A manutenção dos animais e a execução dos experimentos seguirão normas e condições experimentais estabelecidas pela Lei Arouca que regulamenta o uso de animais em experimentos científicos, a fim de propiciar um ambiente adequado para o bem-estar dos mesmos.

O projeto será encaminhado à comissão científica da FaBio e, quando aprovado, será submetido ao Comitê de Ética para o Uso de Animais da PUCRS (CEUA-PUCRS).

3.3 Animais

Para este estudo serão utilizados 80 ratos machos Wistar provenientes da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS). Os animais serão alojados no vivário da

Faculdade de Biociências da PUCRS (um animal por caixa, afim de evitar que os mesmos retirem os eletrodos implantados), a uma temperatura de $21 \pm 1^\circ\text{C}$, em um ciclo de claro/escuro de 12h/12h e recebendo água e comida *ad libitum*.

Experimentos similares realizados em nosso grupo de pesquisa (DE LEON et al., 2010), demonstraram que com um n experimental de 6 animais por grupo, é possível a obtenção de um poder de teste estatístico acima de 80%. Considerando-se que a perda de animais, relacionado aos procedimentos experimentais, é de cerca de 20%, será utilizado um n amostral de 10 animais por grupo no intuito de obtermos um poder estatístico adequado, evitando replicações desnecessárias.

Os animais serão divididos em grupos com $n=10$, da seguinte maneira:

Legenda: IAM (Infarto agudo do miocárdio); EE (Eletroestimulação); EF (Exercício físico)

Grupos sem IAM $n=40$	Controle	Total $n=80$
	EE	
	EF	
EE+EF		
Grupos com IAM $n=40$	SHAM	
	IAM + EE	
	IAM + EF	
	IAM + EE+EF	

3.4 Indução do Infarto agudo do miocárdio

Os ratos serão anestesiados por injeção intra-peritoneal de xilazina ($8\text{mg}/\text{kg}^{-1}$) e ketamina ($62\text{mg}/\text{kg}^{-1}$) (DESAULNIERS; LAVOIE; GARDINER, 2004), entubados e ventilados artificialmente com uma frequência respiratória de 60 respirações por minuto. O IAM será induzido conforme previamente descrito (PFEFFER et al., 1979). O coração será exposto através de uma toracotomia esquerda entre as costelas quatro e cinco. Para os animais em que o IAM será induzido, uma sutura de mono nylon será passada na principal artéria coronária descendente, em um ponto entre 1 e 2 mm distantes à borda do átrio esquerdo e então a artéria coronária esquerda será ligada. Os animais não submetidos ao infarto serão

operados e submetidos ao mesmo procedimento, porém sem a ligação da artéria coronária. Somente o grupo controle não será operado. O tórax será fechado e a pele suturada. Após a cirurgia de infarto do miocárdio, os ratos terão um mínimo de 3 semanas de recuperação.

A eficácia do protocolo de indução do IAM será verificada por branqueamento do tecido e mudanças no eletrocardiograma (THOMAS; HUDLICKA, 1999).

3.5 Implantação do eletrodo

Após 3 semanas, um segundo procedimento cirúrgico sob anestesia (como descrito na seção anterior) será realizado em todos os ratos (exceto no grupo controle), em que eletrodos de aço inoxidável serão implantados na perna esquerda, nas proximidades do nervo peroneal (fibular). Os fios formarão túneis sob a pele até a região interescapular, onde serão exteriorizados e fixados a pele com um pedaço de velcro. Os fios serão ligados a um estimulador externo (Neurotech Shannon, Irlanda), através de “leds” e serão cobertos com outro pedaço de velcro quando os animais não estiverem sendo estimulados (THOMAS; HUDLICKA, 1999). Os animais dos grupos IAM+EF e EF serão submetidos a cirurgia, mas não serão submetidos ao protocolo de estimulação elétrica.

Após as duas intervenções cirúrgicas, todos os animais receberão um antibiótico de amplo espectro (enroflaxin, 2,5 mg/1mL) por 4 dias; e para minimizar o desconforto, será administrado buprenorfina, 2,5µg/0,1 mL, duas vezes ao dia, durante igual período (THOMAS; HUDLICKA, 1999).

3.6 Protocolo de estimulação elétrica

A estimulação elétrica será iniciada no dia seguinte ao implante do eletrodo. Os animais dos grupos IAM+EE e EE serão submetidos a um protocolo de adaptação de 3, 6 e 9 segundos de contração, com 30 segundos de descanso após cada período de contração. Após este período de adaptação, os animais serão submetidos a um protocolo de 30 minutos de estimulação por dia, constituído por 15 segundos de contração e 30 segundos de intervalo, que serão realizados 5 dias por semana, durante 4 semanas. Neste protocolo, os animais serão

estimulados sem anestesia, e com tensão suficiente para produzir contração máxima na palpação do animal, sem causar qualquer desconforto aparente (THOMAS; HUDLICKA, 1999). Os estímulos terão uma frequência de 30 Hz, a uma corrente de 4 mA com um pulso de duração de 0,3ms (BOONYARON et al., 2009).

3.7 Protocolo de exercício físico

O protocolo de exercício físico também será iniciado no dia seguinte ao implante dos eletrodos. Os animais dos grupos IAM+EF e EF serão forçados a andar em uma esteira horizontal – Treadmill LE 8706 LETICA, Espanha – (ASENSIO-PINILLA et al., 2009) a uma velocidade de 5m/min, durante dois períodos de 30 min com um intervalo de 10 min de descanso entre eles. Os exercícios serão realizados durante 2 horas por dia, 5 dias por semana, durante 4 semanas.

Os animais dos grupos IAM+EE+EF e EE+EF serão submetidos ao protocolo de EE durante as duas primeiras semanas e ao protocolo de EF nas duas semanas seguintes.

3.8 Coleta dos músculos

Após as 4 semanas de aplicação dos protocolos de eletroestimulação e/ou exercício físico, os animais serão eutanasiados por overdose de anestésicos (xilazina e ketamina) (WILLEMS; STAUBER, 2009). Os músculos sóleo e extensor longo dos dedos da perna dianteira esquerda será cuidadosamente dissecado. As amostras dos músculos serão fixadas em formol 10% tamponado, por um mínimo de 3 dias. Após, as amostras serão emblocadas em parafina, orientadas para a secção transversal.

3.9 Procedimentos histológicos

Usando um micrótomo (Leica RM-2255 - Alemanha), os músculos serão transversalmente seccionados (3 µm), as lâminas serão montadas, e então coradas com hematoxilina-eosina (HE).

Imagens digitalizadas das secções musculares serão obtidas utilizando um microscópio Olympus BX 50 (4x e 20x), acoplado a uma câmara de vídeo (Leica DC 300F) através do software Leica Image 50 (IM50). As imagens obtidas serão analisadas usando o software Image Pro Plus (Image Pro-Plus 6.1, Media Cybernetics, Silver Spring, EUA). Pelo menos 10 imagens serão analisadas de cada músculo por animal. A área transversal do músculo e a área das fibras musculares serão estimadas usando a técnica de contagem de pontos (GUNDERSEN et al., 2009). A densidade das fibras musculares (número de fibras musculares/mm²) e a densidade de vasos sanguíneos (número de vasos sanguíneos que podem ser claramente distinguidos em secções coradas com HE/mm²) serão estimadas utilizando um protocolo previamente descrito (XAVIER et al., 2005). Resumidamente, um quadrado, denominado área de interesse (AOI) será criado e sua área será medida. Essa AOI será sobreposta em cada imagem a ser analisada. As fibras musculares e vasos sanguíneos localizados no interior de cada quadrado ou interceptados pela parte superior e/ou borda esquerda da AOI serão contados, as fibras musculares e os vasos sanguíneos que cruzarem a parte inferior e/ou borda direita da AOI não serão contados. A densidade de fibras musculares e de vasos sanguíneos será obtida utilizando a seguinte equação: densidade de fibras ou vasos sanguíneos = número total de fibras ou vasos sanguíneos contados na AOI / área da AOI.

3.10 Análise estatística

Os dados serão analisados usando uma análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida de *post-hoc* adequado à distribuição dos dados encontrados, sendo que o nível de significância será estabelecido em $P < 0,05$. A análise dos dados será feita pelo programa SPSS 11.0 (SPSS 11.0 for Mac OS X).

4 RESULTADOS ESPERADOS E PERSPECTIVAS

De maneira geral, pacientes com ICC convivem com profundas limitações na atividade motora, inclusive diária, e uma má qualidade de vida (FANG; MARWICK, 2003). As limitações funcionais causadas pela ICC são determinadas por uma combinação de fatores

que incluem mau desempenho cardiovascular, deficiências do músculo esquelético e resposta ventilatória anormal (NUNES et al., 2008).

Em relação a esses aspectos, estudos recentes demonstram importantes melhorias na capacidade funcional e na qualidade de vida de pacientes com ICC submetidos tanto a protocolos de exercício físico, quanto à estimulação elétrica. Dessa forma, a realização do presente projeto busca elucidar as alterações morfológicas, se presentes, sofridas no músculo esquelético do grupo de animais com ICC submetidos aos protocolos de exercício físico e de estimulação elétrica, comparado ao grupo sem tratamento. Compreendendo as bases morfológicas da musculatura esquelética e de suas alterações nessa patologia, será possível aperfeiçoar o prognóstico e o tratamento de pacientes acometidos por essa doença.

BIBLIOGRAFIA

1. ASENSIO-PINILLA, Elena; UDINA, Esther; JARAMILLO, Jessica; NAVARRO, Xavier. Electrical stimulation combined with exercise increase axonal regeneration after peripheral nerve injury. **Exp Neurol**, v. 219, p. 258-265, 2009.
2. BOONYAROM, Onuma; KOZUKA, Naoki; MATSUYAMA, Kiyoji; MURAKAMI, Shinji. Effect of Electrical Stimulation to Prevent Muscle Atrophy on Morphologic and Histologic Properties of Hindlimb Suspended Rat Hindlimb Muscles. **Am. J. Phys. Med. Rehabil**, v. 88, p. 719-726, 2009.
3. BRASIL a. Ministério da Saúde. DATASUS. Indicadores de Internação do SUS – Grupo de causas. Disponível em: <http://189.28.128.178/sage/>. Acesso em 31 março 2010.
4. BRASIL b. Ministério da Saúde. DATASUS. Indicadores de Mortalidade do SUS – Doenças do aparelho circulatório. Disponível em: <http://189.28.128.178/sage/>. Acesso em 31 março 2010.
5. DALLAGO, Pedro; CHIAPPA, Gaspar R.; GUTHS, Henrique; STEIN, Ricardo; RIBEIRO, Jorge P. Inspiratory muscle training in patients with heart failure and inspiratory muscle weakness: a randomized trial. **J Am Coll Cardiol**, v. 47, p. 757-763, 2006.
6. DE LEON, Elisa B.; BORTOLUZZI, Andressa; RUCATTI, Ananda; NUNES, Ramiro B.; SAUR, Lisiani; RODRIGUES, Mariana; OLIVEIRA, Ubirajara; ALVES-WAGNER, Ana Barbara; XAVIER Leder L; MACHADO, Ubiratan F; SCHAAN, Beatriz D.; DALLAGO, Pedro. Neuromuscular electrical stimulation improves GLUT-4 and morphological characteristics of skeletal muscle in rats with heart failure. **Acta Physiologica**, 2010. (in press)
7. DESAULNIERS, Patrice; LAVOIE, Pierre-Andre; GARDINER, Phillip F. Effect of rat soleus muscle overload on neuromuscular transmission efficacy during continuous and intermittent activation. **Expphysiol**, v.90(3), p. 333-340, 2004.
8. a DOBSAK, Petr; NOVAKOVA, Marie; SIEGLOVA, Jarmila; FISER, Bohumil; VITOVEC, Jiri; NAGASAKA, Makoto; KOHZUKI, Masahiro; YAMBE, Tomoyuki; NITTA, Shin-ichi; EICHER, Jean-Christophe; WOLF, Jean-Eric; IMACHI, Kou. Low-frequency electrical stimulation increases muscle strength and improves blood supply in patients with chronic heart failure. **Circ J**, v. 70, p 75-82, 2006.

9. DOBSAK, Petr; NOVAKOVA, Marie; FISER, Bohumil; SIEGLOVA, Jarmila; BALCARKOVA, Pavla; SPINAROVA, Lenka; VITOVEC, Jiri; MINAMI, Naoyoshi; NAGASAKA, Makoto; KOHZUKI, Masahiro; YAMBE, Tomoyuki; IMACHI, Kou; NITTA, Shin-ichi; EICHER, Jean-Christophe; WOLF, Jean-Eric. Electrical stimulation of skeletal muscles. An alternative to aerobic exercise training in patients with chronic heart failure? **Int Heart J**, v. 47, p. 441-453, 2006.
10. DUSCHA, Brian D.; SCHULZE, P. Christian; ROBBINS, Jennifer L.; FORMAN, Daniel E. Implications of chronic heart failure on peripheral vasculature and skeletal muscle before and after exercise training. **Heart Fail Rev**, v. 13, p. 21-37, 2008.
11. FANG, Zhi You; MARWICK, Thomas H. Mechanisms of exercise training in patients with heart failure. **American Heart Journal**, v. 145, p. 904-911, 2003.
12. GUNDERSEN, H.J.; JENSEN, E.B.; KIEU, K.; NIELSEN, J. The efficiency of systematic sampling in stereology-reconsidered. **J Microsc**, v. 193, p. 199-211, 1999.
13. HARRIS, Stuart; LEMAITRE, John P.; MACKENZIE, Graham; FOX, Keith A. A.; DENVER, Martin A. A randomised study of home-based electrical stimulation of the legs and conventional bicycle exercise training for patients with chronic heart failure. **Eur Heart J**, v. 24, p. 871-878, 2003.
14. JONSDOTTIR, Solrun; ANDERSEN, Karl K.; SIGUROSSON, Axel F.; SIGUROSSON, Stefan B. The effect of physical training in chronic heart failure. **Eur J Heart Fail**, v. 8, p. 97-101, 2006.
15. KINDIG, Casey A.; MUSCH, Timothy I.; BASARABA, Randall J.; POOLE, David C. Impaired capillary hemodynamics in skeletal muscle of rats in chronic heart failure. **J Appl Physiol**, v. 87, p. 652-660, 1999.
16. KITZMAN, Dalane W.; GROBAN, Leanne. Exercise Intolerance. **Heart Failure Clin**, v. 4, p. 99-115, 2008.
17. MCKELVIE, Robert S. Exercise training in patients with heart failure: clinical outcomes, safety, and indications. **Heart Fail Rev**, v. 13, p. 3-13, 2008.
18. NUNES, R.B.; TONETTO, M.S.; MACHADO, N.G.; CHAZAN, M.; HECK, T.G.; VEIGA, A.B.; DALLAGO, P. Physical Exercise Improves Plasmatic Levels of IL-10, Left Ventricular End-Diastolic Pressure and Muscle Lipid Peroxidation in Chronic Heart Failure Rats. **J Appl Physiol**, v. 104, p. 1641-1647, 2008.

19. PFEFFER, Marc A.; PFEFFER, Janice M.; FISHBEIN, Michael C.; FLETCHER, Peter J.; SPADARO, Joel; KLONER, Robert A.; BRAUNWALD, Eugene. Myocardial infarct size and ventricular function in rats. **Circ. Res**, v. 44, p. 503-512, 1979.
20. QUITTAN, Michael; SOCHOR, Andrea; WIESINGER, Gunther F.; KOLLMITZER, Josef; STURM, Barbara; PACHER, Richard; MAYR, Winfried. Strength improvement of knee extensor muscles in patients with chronic heart failure by neuromuscular electrical stimulation. **Artif Organs**, v. 23, p. 432-435, 1999.
21. SULLIVAN, Martin J.; GREEN, Howard J.; COBB, Frederick R. Skeletal muscle biochemistry and histology in ambulatory patients with long-term heart failure. **Circulation**, v. 81, p. 518-527, 1990.
22. THOMAS, D. Paul; HUDLICKA, Olga. Arteriolar reactivity and capillarization in chronically stimulated rat limb skeletal muscle post-MI. **J Appl Physiol**, v. 87, p. 2259-2265, 1999.
23. WILLEMS, M.E.T.; STAUBER, W.T. The effect of number of lengthening contractions on rat isometric force production at different frequencies of nerve stimulation. **Acta Physiol**, v. 196, p. 351–356, 2009.
24. XAVIER, Léder Leal; VIOLA, Giordano Gubert; FERRAZ, Anete Curte; CUNHA, Claudio da; DEONIZIO Janyana Marcela Doro; NETTO, Carlos Alexandre; ACHAVAL, Matilde. A simple and fast densitometric method for the analysis of tyrosine hydroxylase immunoreactivity in the substantia nigra pars compacta and in the ventral tegmental area. **Brain Res Protoc**, v. 16, p. 58-64, 2005.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Orçamento

Material de consumo

Material	Quant.	Valor unitário	Valor total
Ratos Wistar machos	80	12,00	960,00
Lâminas histológicas (24 X 75 X 150mm)	5 caixas	7,00	35,00
Lamínulas (24 X 32 mm)	5 caixas	8,00	40,00
Caixa porta lâminas	5	15,00	75,00
Xilazina	3 frascos	23,00	69,00
Cetamina	1 frasco	47,00	47,00
Material Cirúrgico (agulha, linha de sutura)	-	-	85,00
Luva cirúrgica	8 caixas	12,00	96,00
Etanol	10 litros	6,50	65,00
Velcro	1 metro	17,00	17,00
Enroflaxin	150mg	-	37,80
Buprenorfina	8mg	-	53,00
Reagentes	-	-	135,00
Paraformaldeído	3 litros	12,00	36,00
Entellan	100 ml	185,00	185,00
Xilol	3 litros	15,00	45,00
Parafina	1 kg	12,00	12,00
Hematoxilina	1 litro	140,00	140,00
Eosina	1 litro	53,00	53,00
Material bibliográfico	-	-	40,00
Total			2.225,80

Além dos materiais mencionados, outros recursos necessários para a execução do presente projeto serão utilizados, tais como: estufa (0 a 100°C), micrótomo, esteira, estimulador, eletrodos, microscópio com câmera de vídeo acoplada e softwares. Esses equipamentos encontram-se disponíveis no Laboratório de Biologia Celular e Tecidual da Faculdade de Biociências da PUCRS.

