



A UTILIZAÇÃO DA TÉCNICA DE MIOGRAFIA POR IMPEDÂNCIA ELÉTRICA
PARA AVALIAÇÃO DE FORÇA E DO METABOLISMO MUSCULAR EM
ATIVIDADES SEM INDUÇÃO DE FADIGA

André Brand Bezerra Coutinho

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Biomédica, COPPE, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências em Engenharia Biomédica.

Orientador(es): Marcio Nogueira de Souza
Alexandre Visintainer Pino

Rio de Janeiro
Março de 2020

A UTILIZAÇÃO DA TÉCNICA DE MIOGRAFIA POR IMPEDÂNCIA ELÉTRICA
PARA AVALIAÇÃO DE FORÇA E DO METABOLISMO MUSCULAR EM
ATIVIDADES SEM INDUÇÃO DE FADIGA

André Brand Bezerra Coutinho

TESE SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DO INSTITUTO ALBERTO LUIZ COIMBRA
DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA DE ENGENHARIA (COPPE) DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA
A OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM CIÊNCIAS EM ENGENHARIA BIOMÉDICA.

Orientadores: Prof. Marcio Nogueira de Souza, D.Sc.
Prof. Alexandre Visintainer Pino, D.Sc.

Aprovada por: Prof. Marcio Nogueira de Souza, D.Sc.
Prof. Alexandre Visintainer Pino, D.Sc.
Prof. Carlos Julio Tierra Criolo, D.Sc.
Prof. Paulo José Abatti, D.Sc.
Prof. Verônica Salerno Pinto, D.Sc.
Prof. Olavo Luppi Silva, D.Sc.

RIO DE JANEIRO, RJ - BRASIL
MARÇO DE 2020

Coutinho, André Brand Bezerra

A utilização da técnica de miografia por impedância elétrica durante para avaliação de força e do metabolismo muscular em atividades sem indução de fadiga/ André Brand Bezerra Coutinho – Rio de Janeiro: UFRJ/COPPE, 2020.

XIV, 95 p.: il.; 29,7 cm.

Orientador: Marcio Nogueira de Souza

Alexandre Visintainer Pino

Tese (doutorado) – UFRJ/ COPPE/ Programa de Engenharia Biomédica, 2020.

Referências Bibliográficas: p. 81-85.

1. Bioimpedância. 2. Sistemas Energéticos. 3. Miografia por Impedância Elétrica. I. Souza, Marcio Nogueira *et. al.*. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE, Programa de Engenharia Biomédica. III. Título.

Dedicatória

Dedico esta obra aos meus pais pelo incondicional apoio nesta jornada.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Bruno Jotta da Costa pessoa que me apresentou o mundo acadêmico que acompanhou meu crescimento neste meio e foi o parceiro/braço direito de toda essa caminhada (desde o mestrado). Meu eterno agradecimento pelas resenhas científicas e esportivas sentados no escritório. A Educação Física agradece a sua existência e eu, os seus ensinamentos. Muito obrigado por tudo!

Ao Prof. Marcio Nogueira de Souza, exímio mestre na arte de orientar, um ser humano diferenciado, respeitado por todos ao seu redor e uma referência para seus alunos. Prof. Marcio sempre foi além de um orientador acadêmico, é um orientador de vida. Como seu último aluno a defender um doutorado, deixo aqui um obrigado em nome de todos que ele orientou.

Ao Prof. Alexndre Visintainer Pino orientador de longas conversas e muitas discussões. A pessoa que sempre exige a perfeição, mas nunca nega uma paciente e longa orientação. Se fui capaz de escrever as rotinas desse trabalho, com certeza, as expressões do Prof. Pino estavam em cada linha.

À minha esposa Danielle Lúcia Fernandes Ferreira, minha companheira, parceira da vida e incentivadora incondicional desse estudo. O seu apoio foi e sempre será fundamental para qualquer conquista minha e esse doutorado tem muito de você. Te amo!

Aos engenheiros Mario Pastrana Chalco e Anderson Souza, que fizeram nascer o principal hardware desse estudo. Sem vocês chegar à defesa seria inviável. Eternamente grato!

Ao Prof. Marcelo Baldanza, responsável pela minha iniciação no tratamento com os animais, à sua grande ajuda na coleta dos primeiros sinais, e pela parceria durante boa parte do estudo.

Às inúmeras gerações de alunos do LIB nesses 9 anos de laboratório. Todos foram de grande importância com ótimas contribuições nas inúmeras reuniões que tivemos nesses anos. Muito obrigado a todos!

A minha família que sempre aguardou por esse momento.

Aos amigos queridos que sempre torceram para que este momento chegasse.

Resumo da Tese apresentada à COPPE/UFRJ como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de Doutor em Ciências (D.Sc.)

A UTILIZAÇÃO DA TÉCNICA DE MIOGRAFIA POR IMPEDÂNCIA ELÉTRICA PARA AVALIAÇÃO DE FORÇA E DO METABOLISMO MUSCULAR EM ATIVIDADES SEM INDUÇÃO DE FADIGA.

André Brand Bezerra Coutinho

Março/2020

Orientadores: Marcio Nogueira de Souza

Alexandre Visintainer Pino

Programa: Engenharia Biomédica

A miografia por impedância elétrica (*Electrical Impedance Myography* - EIM) é uma técnica que avalia as propriedades elétricas passivas do tecido muscular. Apesar de já ser utilizada no âmbito clínico e em avaliações de músculos não saudáveis, esta técnica surge como uma potencial instrumentação também para avaliação da contração muscular. A literatura pouco se aprofunda nas questões fisiológicas e bioquímicas do músculo que podem ser fontes de alterações da impedância do tecido muscular. Quando ocorre uma contração muscular, o músculo necessita de moléculas energéticas, conhecidas como ATP, e estas moléculas são sintetizadas por meio de diferentes sistemas energéticos. Estes sistemas possuem diferentes processos bioquímicos e o predomínio de cada sistema para a síntese de ATP pode gerar alterações nas características elétricas do tecido muscular. A fim de avaliar a influência de cada um desses sistemas energéticos e da intensidade da contração no sinal de EIM foi proposta uma instrumentação capaz de adquirir, sincronizadamente e em tempo real, a impedância elétrica e a força no músculo gastrocnêmio de ratos Wistar submetidos a contrações musculares evocadas por eletroestimulação. Os animais foram submetidos a dois protocolos: o primeiro buscou avaliar as variações de EIM durante dez contrações de curta duração com diferentes intensidades; o segundo avaliou as características do sinal de EIM durante contração submáxima (30% da força máxima) de 100 s de duração, buscando associação entre a EIM e os sistemas energéticos. Os resultados apontam que existe correlação significativa ($r = 0,76$) entre as variações de EIM e força exercida pelo músculo e ainda indicam que as variações de EIM no segundo protocolo podem estar associadas às taxas de fornecimento de ATP dos sistemas energéticos. Com isso, o sistema de EIM projetado neste estudo se apresenta como uma ferramenta potencial para estudo do metabolismo muscular durante um exercício.

Abstract of thesis presented to COPPE/UFRJ as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Science (D.Sc.)

THE USE OF ELECTRICAL IMPEDANCE MYOGRAPHY FOR MUSCULAR FORCE AND MUSCULAR METABOLISM ASSESSMENT DURING MUSCLE ACTIVITY WITHOUT FATIGUE

André Brand Bezerra Coutinho

March/2020

Orientadores: Marcio Nogueira de Souza

Alexandre Visintainer Pino

Programa: Engenharia Biomédica

The electrical impedance myography is a technique able to assess the passive electrical features of the muscle tissue. The major use of this technique is in the clinic field and in the assessment of unhealthy muscle, although it emerges also as a potential instrumentation to assess the muscle contraction. The literature does not present a deep discussion about physiological and biochemical mechanism of the muscle that could be pointed as the source of muscle impedance changes. When a muscle contraction occurs, the muscle needs some energetic molecules to allow this contraction. These molecules are called ATP and are synthesized through energetic systems. Each system has different biochemical processes and its predominance in ATP synthesis may come up changes in electrical features of muscle tissue. In order to assess each energetic system influence on bioimpedance signal a specific instrumentation was developed to acquire, synchronously and online, the impedance and force data on gastrocnemius of Wistar rats submitted to muscle contractions evoked by electrical stimulation. The animals were submitted to two protocols: the first tried to assess EIM changes during ten short-term muscle contractions with different intensities; the second assessed EIM features during submaximal contraction (30% of maximal force) lasting 100 s and tried to associate EIM and the energetic systems. The results show a significant correlation ($r = 0.76$) between EIM and exerted force. Moreover, suggest that EIM variations in the second protocol may be associated to ATP supply rates from energetic systems. Then, the EIM system designed at present study, introduce itself as a potential tool for muscular metabolism during exercise.

Sumário

1	Introdução	1
1.1	Objetivo do projeto de doutorado	3
2	Fundamentação teórica	4
2.1	O Músculo	4
2.1.1	Fisiologia da Contração Muscular Esquelética	8
2.1.2	Tipos de contração	10
2.2	Bioenergética	11
2.3	Impedância elétrica	16
2.3.1	Características de um volume condutor	17
2.3.2	Bioimpedância	19
2.3.3	Medição de bioimpedância e miografia por impedância elétrica	25
2.4	Eletroestimulação Neuromuscular	31
2.4.1	Parâmetros de Estimulação	31
3	Revisão de literatura	35
3.1	Bioimpedância e atividade física	35
3.2	EIM	37
3.3	EIM Dinâmica	37
3.4	Fatores de variação do sinal de EIM	39
3.4.1	Fatores biológicos	39
3.4.2	Instrumentação	41
3.5	Utilização de Modelo Animal	44
3.6	Modelos FEM (Método de Elementos Finitos)	45
4	Materiais e Métodos	47
4.1	Amostra	47
4.2	Instrumentação	47
4.2.1	Eletrodos	49
4.2.2	Dispositivos	51

4.3	Protocolo experimental	53
4.3.1	Fase I – Variação de força em função da frequência com estímulos curtos.	53
4.3.2	Fase II – Estimulação de 100s com frequência fixa correspondente a 30% da Fmax.	54
4.4	Análise e processamento dos dados	55
4.4.1	Fase I - Variação de força em função da frequência com estímulos curtos	55
4.4.2	Fase II - Estimulação de 100s com frequência fixa correspondente a 30% da Fmax.	57
5	Resultados	60
5.1	Fase I - Variação de força em função da frequência com estímulos curtos.	60
5.2	Fase II - Estimulação de 100s com frequência fixa correspondente a 30% da Fmax.	65
6	Discussão	72
6.1	Fase I - Variação de força em função da frequência com estímulos curtos.	72
6.2	Fase II - Estimulação de 100s com frequência fixa correspondente a 30% da Fmax.	75
6.2.1	Parâmetros de impedância e metabolismo	76
6.2.2	Reprodutibilidade dos resultados	81
6.2.3	EIM dinâmica como avaliador metabólico	82
7	Conclusão	84
8	Referências Bibliográficas	86
	Anexo I – Figuras de Calibração	91
	Anexo II – Esquemático do hardware de análise de EIM e aquisição de sinais.	94
	Anexo III – Rotina do programa de aquisição de sinais e análise de EIM e, painel frontal do programa.	95
	Anexo IV – Esquemático elétrico do condicionador de sinal conectado à célula de carga.	97
	Anexo V – Esquemático do <i>buffer</i> do sistema de eletroestimulação	98
	Anexo VI – Rotina do programa de controle do sinal D/A da placa NI 6252 (Programa de eletroestimulação) e painel frontal do programa.	99
	Anexo VII – Resultados individuais da Fase I	101

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ilustração de uma unidade motora (MCARDLE et al., 2010).....	4
Figura 2. Exemplos de músculos, tendões e aponeuroses. Lado esquerdo: Ventre muscular e tendão do músculo bíceps braquial; Lado direito: Ventre muscular e aponeurose do músculo grande dorsal.(NETTER, 2014).....	5
Figura 3. Classificações de dois músculos: (a) Flexor longo dos dedos; peniforme, uma origem, policaudado e flexor do metatarso; (b) Bíceps Braquial; fusiforme, bíceps, uma inserção e flexor do cotovelo. (NETTER, 2014).....	7
Figura 4. Fibra muscular e suas estruturas.(ADAPTADO DE https://commons.wikimedia.org/).....	8
Figura 5. Sarcômero e seus componentes. (ADAPTADO DE https://commons.wikimedia.org/)	8
Figura 6. Ilustração do sarcômero relaxado e contraído (Elaborada pelo autor).	9
Figura 7. Percentual de contribuição de cada sistema energético supondo uma atividade de intensidade constante (MCARDLE et al., 2010).....	11
Figura 8. Reações químicas que ocorrem no sarcoplasma para a formação de ATP através do sistema ATP-CP e a reação de liberação de energia no sarcômero quando o ATP está fixado na cabeça da miosina. PCr - creatina-fosfato; PCr - Creatina; Pi - fosfato inorgânico; ADP - Adenosina difosfato. (Elaborada pelo autor)	12
Figura 9. Ilustração do ciclo da glicólise. (Elaborado pelo autor, adaptado de NELSON e COX, 2004). 14	14
Figura 10. Ilustração do ciclo de Krebs. (Elaborada pelo autor, adaptada de MCARDLE et al., 2010) . 15	15
Figura 11. Esquemático resumido do sistema oxidativo. (Elaborada pelo autor)	15
Figura 12. Representação da impedância no plano complexo.	17
Figura 13. Volume condutor homogêneo. As setas representam os vetores de densidade de corrente, r - raio do cilindro e L - comprimento do Cilindro (Adaptado de GRIMNES e MARTINSEN, 2008).....	18
Figura 14 Volume condutor não homogêneo. (a) Área retangular e uma área circular, sendo a área circular com maior condutividade. (b) Área retangular, uma área circular e duas áreas retangulares no interior do círculo, sendo a área circular com menor condutividade e as áreas retangulares com a mesma condutividade. (GRIMNES; MARTINSEN, 2008).....	19
Figura 15. Modelo elétrico que mimetiza as características elétricas de um tecido biológico. Re – Resistência extracelular, Ri – Resistência intracelular e Cm – Capacitância de Membrana.	20
Figura 16. Caminhos preferenciais da corrente elétrica em função da frequência. (Elaborada pelo autor)	21
Figura 17. Representação gráfica da impedância (Z) de um sistema biológico em função do aumento da frequência. R _{inf} - resistência em frequências muito altas, R ₀ - resistência na frequência 0 Hz, Z - módulo da impedância, θ - fase.	22

Figura 18. Características de condutividade e permissividade de tecidos biológicos em função da frequência (IVORRA, 2002).....	22
Figura 19. Exemplo do comportamento da bioimpedância de um tecido biológico no plano complexo em função da frequência. (Elaborada pelo autor)	23
Figura 20. Módulo e fase da bioimpedância do músculo bíceps em função da frequência. (Elaborada pelo autor).....	23
Figura 21. Modelo elétrico de cinco elementos para bioimpedância que contabiliza contribuição de organelas. C_m - capacitância de membrana, C_o - capacitância das organelas, R_o - resistência das organelas, R_i – resistência intracelular, R_e - resistência extracelular.	24
Figura 22. Comportamento da bioimpedância (Z) de um tecido biológico no plano complexo para frequências entre 0 e 10 MHz. (Elaborada pelo autor).....	25
Figura 23. Módulo e fase da bioimpedância de um tecido biológico em função de frequências entre 0 e 10 MHz. (Elaborada pelo autor)	25
Figura 24. Exemplo de medição de bioimpedância. Aplica-se a corrente entre os pontos A e B e mede-se a tensão entre os pontos C e D. (Elaborada pelo autor).....	26
Figura 25. Modelo de elementos finitos de um volume condutor com 15 cm de altura e 80 cm de comprimento, dividido em três camadas puramente resistivas com condutância diferentes, σ_1 , σ_2 e σ_3 de cima para baixo, submetido a uma avaliação de impedância tetrapolar. As setas indicam a direção, sentido, distribuição e magnitude da densidade de corrente.	28
Figura 26. Modelo de elementos finitos de um volume condutor com 15 cm de altura e 80 cm de comprimento, dividido em três camadas puramente resistivas com condutância diferentes, σ_1 , σ_2 e σ_3 de cima para baixo, submetido a uma avaliação de impedância bipolar. As setas indicam a direção, sentido, distribuição e magnitude da densidade de corrente.	29
Figura 27. Modelo de elementos finitos de um volume condutor com 15 cm de altura e 80 cm de comprimento, dividido em três camadas puramente resistivas com condutância diferentes, σ_1 , σ_2 e σ_3 de cima para baixo. As setas indicam a direção, sentido, distribuição e magnitude da densidade de corrente.....	30
Figura 28 Modelo de elementos finitos de um volume condutor com 15 cm de altura e 80 cm de comprimento, dividido em três camadas puramente resistivas com condutância diferentes, σ_1 , σ_2 e σ_3 de cima para baixo. As setas indicam a direção, sentido, distribuição e magnitude da densidade de corrente.....	30
Figura 29. Pulsos e formas de onda usados na estimulação neuromuscular. A) Pulsos quadrado e triangular. B) Formas de onda simétricas. C) Formas de onda assimétricas.	32
Figura 30 Onda senoidal (acima) e Pulsos (abaixo). T - período da onda, dp - duração do pulso de estimulação.	32

Figura 31. Exemplo de eletroestimulação contínua e com intervalos. T_t - Período do trem de pulsos, d_t - duração do trem de pulsos, dp - duração do pulso, f_t - frequência do trem de pulsos e f - frequência dos pulsos.....	33
Figura 32. Tabela de Lac para cada potência do cicloergômetro e o comportamento das Resistências (intracelular, extracelular e infinita) em cada uma das potências (ALVARENGA, 2008).....	36
Figura 33 Variações de força, resistência e reatância, da parte dorsal do antebraço, em função do tempo em ambos os testes. (SHIFFMAN; AARON; RUTKOVE, 2003).	38
Figura 34. Variação de resistência (acima) e reatância (abaixo) do bíceps conforme contração muscular. Delta R: variação de resistência; Delta X: variação de reatância.(RUTKOVE, 2009)	38
Figura 35. Dados de impedância variando de acordo com a força muscular. Estudo realizado no músculo gastrocnêmio de camundongos (SANCHEZ et al., 2014).	39
Figura 36. Valores do módulo da impedância do bíceps braquial, com frequências variando de 300 Hz a 75 kHz (ZAGAR; KRIZAJ, 2008).	40
Figura 37. Arranjo de eletrodos (cinza) posicionados longitudinalmente as fibras musculares (esquerda) e transversalmente as fibras musculares (direita) (Rutkove 2009).	41
Figura 38. Valores de impedância em função da distância dos eletrodos de corrente para os eletrodos de tensão (GRIMNES; MARTINSEN; JOHNSEN, 2010).	42
Figura 39. Distribuição dos vetores de densidade de corrente conforme a distância entre os eletrodos de injeção de corrente aumenta (JAFARPOOR et al., 2013).	45
Figura 40. Imagem aproximada do posicionamento da peça com material isolante que contém os eletrodos de EIM e eletroestimulação.	48
Figura 41. Aparato experimental onde vê-se o animal com o tendão do gastrocnêmio fixado a célula de carga e a peça isolante contendo os eletrodos (bioimpedância e eletroestimulação) posicionada sobre o ventre muscular.	48
Figura 42. Desenho esquemático do aparato experimental.	49
Figura 43. Esquemático simples do posicionamento dos eletrodos no músculo gastrocnêmio dos ratos.	50
Figura 44. Diagrama de blocos do sistema de medição de impedância.	52
Figura 45. Sinal do sinal de resistência utilizado para analisar a resposta ao degrau.	53
Figura 46. Ajuste da curva Frequência x Força por spline cúbica (valores representados pelo x) e a identificação da frequência correspondente à 30% da força máxima do animal.....	55
Figura 47. Sinal de força momentos antes da contração e durante a contração. Entre as linhas tracejadas, o intervalo de tempo onde calculou-se o valor médio da força e dos outros sinais para o cálculo de S_b	56

Figura 48. Sinais de resistência e reatância de um animal com a identificação dos valores de pico (vermelho) e de base (amarelo) para cada ciclo de contração.	57
Figura 49. Sinais de dois ciclos de estimulação de resistência (esq) e reatância (dir) com as indicações dos valores de picos (vermelho) e bases (amarelo).	58
Figura 50 Sinais de dois ciclos de estimulação de resistência (esq) e reatância (dir) com as indicações dos valores de picos (vermelho) e bases (amarelo) além do período pré contração utilizado para calcular Z_{rep}	58
Figura 51. Exemplo de um sinal típico adquirido durante o protocolo experimental. ES- eletroestimulação; F – força; R – resistência e; X- reatância.	60
Figura 52. Exemplo do processo de filtragem do sinal. Acima: sinal original de resistência. Meio: sinal após filtragem passa baixas (frequência de corte de 30 Hz). Abaixo: sinal após filtragem pelo filtro passa- altas (frequência de corte de 0,01 Hz).	61
Figura 53. Exemplo dos dados processados de um animal. (a): curva frequência x força. Parâmetros de bioimpedância ΔR (b), ΔX (c), $\Delta \theta$ (d) em função de ΔF_{rel}	62
Figura 54. Boxplots dos dados processados em função das frequências de NMES, incluindo todos os animais. (a): ΔF , (b): ΔR , (c): ΔX e (d): $\Delta \theta$	63
Figura 55. Gráficos de dispersão entre as variações percentuais dos parâmetros de bioimpedância em função das variações percentuais de força (ΔF_{rel}). ((a): ΔR rel; (b): ΔX rel and (c): $\Delta \theta$ rel.	64
Figura 56. Sinais de Força (topo), resistência (meio) e reatância (abaixo) de um animal após filtragem digital em 30 Hz.	65
Figura 57. Sinais de resistência (esquerda) e reatância (direita), antes (acima) e após (abaixo) a filtragem.	66
Figura 58. Sinais pós processamento no eixo y (esquerda) com os sinais de força no eixo y (direita).	69
Figura 59. Comportamento médio dos parâmetros ΔR inst, ΔX inst, ΔR rep, ΔX rep.	70
Figura 60. Comportamento médio dos parâmetros ΔR inst, ΔX inst, ΔR basal, ΔX basal com suas respectivas derivadas no eixo Y da direita de cada gráfico.	70
Figura 61. Sinal de força após 10 minuto de estimulação. Este sinal é do mesmo animal da Figura 56 e mostra como a amplitude do sinal de força é praticamente constante após aproximadamente 250 s de estimulação	71
Figura 62. Fornecimento de ATP por cada um dos sistemas energéticos, durante uma atividade submáxima de 300s de duração e durante 400s de recuperação, pós atividade(FIEDLER et al., 2016).	76
Figura 63. Identificação dos momentos t_{0+} , t_1 , t_2 e t_3 para os valores médios de ΔZ inst dos animais.	78
Figura 64. Identificação dos momentos de predomínio do sistema glicolítico (circulo preto) e do sistema oxidativo (círculo verde)	79

Figura 65. Reta de calibração do sinal S_R . Onde o eixo y é a resistência real e o eixo x o valor de tensão medido na saída do hardware de EIM.	91
Figura 66. Reta de regressão entre os valores de resistência estimados (eixo y) e os valores reais (eixo x). Acima a esquerda o valor do coeficiente de correlação de Pearson (r), entre os valores estimados e os valores reais.....	91
Figura 67. Reta de calibração do sinal S_X . Onde o eixo y é a reatância real e o eixo x o valor de tensão medido na saída do hardware de EIM.	92
Figura 68. Reta de regressão entre os valores de reatância estimados (eixo y) e os valores reais (eixo x). Acima a esquerda o valor do coeficiente de correlação de Pearson (r), entre os valores estimados e os valores reais.....	92
Figura 69. Reta de calibração do sinal S_F . Onde o eixo y é a força real e o eixo x o valor de tensão medido na célula de carga.....	93
Figura 70. Reta de regressão entre os valores de força estimados (eixo y) e os valores reais (eixo x). Acima a esquerda o valor do coeficiente de correlação de Pearson (r), entre os valores estimados e os valores reais.....	93
Figura 71. Esquemático elétrico contendo: sistema de análise de EIM e o sistema de aquisição de sinais.	94
Figura 72. Diagrama de Blocos do programa de aquisição de sinais e análise de EIM.....	95
Figura 73. Painel Frontal do Programa de aquisição de sinais.....	96
Figura 74. Esquemático elétrico do condicionador de sinal conectado à célula carga.....	97
Figura 75. Esquemático elétrico do buffer do sistema de eletroestimulação.	98
Figura 76. Diagrama de Blocos do programa de controle do sinal D/A da placa NI 6252 (Programa de eletroestimulação)	99
Figura 77. Painel frontal com os parâmetros de controle do sinal de eletroestimulação.....	100

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características fisiológicas do músculo de acordo com os tipos de fibras	7
Tabela 2. Valores de resistividade (ρ) em diferentes tecidos de porco	20
Tabela 3. Parâmetros de NMES utilizados no protocolo experimental da fase I	54
Tabela 4. Parâmetros de NMES utilizados no protocolo experimental da fase II	54
Tabela 5. Parâmetros estatísticos entre as variações percentuais de bioimpedância e as variações percentuais de força. r - Coeficiente de correlação de Pearson; R^2 – coeficiente de determinação da análise de regressão linear; coeficientes da reta de regressão: a – coeficiente angular e b – coeficiente linear	64

LISTA DE ABREVIATURAS

EIM – *Electrical Impedance Myography* ou Miografia por Impedância Elétrica

FEM – *Finite Element Method* ou Método de Elementos Finitos

ATP – Adenosina Trifosfato

ATP-CP – Sistema Creatina-Fosfato

CL – Fibras de contração lenta

CR – Fibras de contração rápida

K⁺ - Potássio

Na⁺ - Sódio

Ca⁺⁺ - Cálcio

ADP – Adenosina Difosfato

P_i – Fosfato Inorgânico

PCr – Fosfocreatina

Cr – Creatina

LDH – Lactato Desidrogenase

H⁺ - Hidrogênio

[Lac⁻] – Concentração de Lactato

[Piruvato] – Concentração de Piruvato

PDH – Piruvato Desidrogenase

Acetil-CoA – Acetil Coenzima A

Z – Impedância

R – Resistência

X – Reatância

|Z| - Módulo da Impedância

θ – Fase

ε – Permissividade

σ – Condutividade

Re – Resistência Extracelular

Ri – Resistência Intracelular

Cm – Capacitância de Membrana

Co – Capacitância de membrana das organelas

Ro – Resistência das organelas

ω – frequência angular

f - Frequência

Δf – Resolução Espectral

F_s – Frequência de Amostragem.

T – Período

ρ – Resistividade

L – Comprimento

NMES – *neuromuscular electrical stimulation* ou Eletroestimulação Neuromuscular

V – Tensão

i – Corrente

d_p – Duração do pulso

d_t – Duração do trem de pulsos

T_t – Período do trem de pulsos

f_t – Frequência do trem de pulsos

FRA – *Frequency Response Analyzer*

F – Força

ES – Eletroestimulação

S_R – Sinal de resistência

S_X – Sinal de Reatância

S_F – Sinal de Força

F_{max} – Força Máxima

S_b – Valor da base de um sinal

S_p – Valor de pico de um sinal

ΔS_{rel} – Variação de um sinal em relação ao valor máximo

ΔS_{max} – Valor de variação máxima de um sinal

ΔF_{rel} – Variação do sinal de força em relação ao seu valor máximo

ΔR_{rel} – Variação do sinal de resistência em relação ao seu valor máximo

ΔX_{rel} – Variação do sinal de reatância em relação ao seu valor máximo

$\Delta \theta_{rel}$ – Variação da fase do sinal de impedância em relação ao seu valor máximo

ΔZ_{inst} – Variação do sinal de impedância em relação ao seu valor mínimo antes de um ciclo de contração

ΔR_{inst} – Variação do sinal de resistência em relação ao seu valor mínimo antes de um ciclo de contração

ΔX_{inst} – Variação do sinal de reatância em relação ao seu valor mínimo antes de um ciclo de contração

ΔZ_{rep} – Variação do sinal de impedância em relação ao valor da impedância de repouso

ΔR_{rep} – Variação do sinal de resistência em relação ao valor da resistência de repouso

ΔX_{rep} – Variação do sinal de reatância em relação ao valor da reatância de repouso

1 Introdução

A miografia por impedância elétrica (*Electrical Impedance Myography* - EIM) pode ser definida como uma técnica experimental que associa a impedância elétrica do músculo com a atividade muscular (RUTKOVE, 2009). Uma grande parte dos trabalhos sobre EIM a utilizam como forma de avaliação de algumas miopatias, como, por exemplo, esclerose lateral amiotrófica (SHIFFMAN; RUTKOVE, 2013), dores na musculatura lombar (CHING et al., 2013), processos inflamatórios, efeitos da idade no músculo (TARULLI et al., 2005), entre outros. Como a maioria dos trabalhos estudam músculos não saudáveis, normalmente o comportamento dos sinais de EIM tem sido retratado comparando-se os resultados de um músculo saudável com de outro não saudável, principalmente quanto à progressão ou regressão das miopatias. Trabalhos que tratam da EIM apenas em músculo saudáveis, seja em repouso ou durante contração muscular (LIAO; NISHIKAWA, 1994; SANCHEZ et al., 2014; SHIFFMAN; AARON; RUTKOVE, 2003; ZAGAR; KRIZAJ, 2008a), são menos comuns, de forma que o estudo de EIM em associação com a contração muscular ainda precisa ser muito explorado.

Segundo a literatura, as variações de impedância elétrica do músculo durante uma contração ocorrem devidas às variações de morfologia e aspectos fisiológicos deste músculo (SHIFFMAN; AARON; RUTKOVE, 2003; RUTKOVE, 2009); os quais variam, na maioria das vezes, concomitantemente durante uma contração. As mudanças de morfologia dizem respeito a qualquer modificação estrutural do músculo avaliado, tais como: comprimento, área de secção transversa e volume. As variações fisiológicas se referem na impeditividade (ou admitividade) do músculo que ocorrem como consequência dos processos bioquímicos da contração muscular. Então, variações morfológicas e fisiológicas são mudanças que ocorrem durante a contração, sendo elas diferentes nesta condição quando comparadas a condição de repouso do músculo. Alguns trabalhos relatam que ambos os aspectos contribuem para alteração de impedância, porém discutem essas influências de maneira superficial. O que significa que os aspectos morfológicos e fisiológicos que alteram a EIM devem ser mais bem estudados, e melhor discutidos a fim de se conhecer melhor a origem das alterações da impedância muscular e quantificar a contribuição de ambos os aspectos nestas alterações.

As medições de EIM feitas em seres humanos normalmente utilizam arranjos de dois ou mais eletrodos posicionados na superfície da pele, sendo que alguns fatores podem influenciar diretamente essas medições, como, por exemplo, a anisotropia no músculo. Devido à anisotropia, os resultados de EIM podem variar em um mesmo músculo somente mudando o ângulo de posicionamento dos eletrodos. Alguns trabalhos (CHIN et al., 2008; SANCHEZ et al., 2014; RUTKOVE; SANCHEZ, 2019) discutem essas diferenças e mostram que uma medida

realizada com os eletrodos posicionados transversalmente às fibras do músculo medem uma impedância maior do que se os eletrodos fossem colocados longitudinalmente (HODGES et al., 2003). Além da anisotropia, os resultados de EIM são afetados por fatores como a interface eletrodo-pele, as camadas de pele e gordura, pelo tecido conjuntivo, fluxo sanguíneo, entre outros (TARULLI et al., 2007; JAFARPOOR et al., 2013). Então, pode-se dizer que uma medida de EIM é o resultado, além da impedância real do músculo, da associação elétrica de todos os fatores citados anteriormente. Por tudo isso, explicitar como cada um destes tecidos, interfaces, posicionamento de eletrodos, podem interferir na propagação da corrente elétrica dentro do músculo e, conseqüentemente, sobre os resultados da EIM, ainda é um desafio de pesquisa.

Alguns trabalhos (Jafapoor e colaboradores, 2013) já tentaram explorar algumas das mencionadas influências a partir de simulações pelo método de elementos finitos (*Finite Element Method* – FEM). Os autores do referido trabalho sugerem diferentes posicionamentos dos eletrodos para melhorar a sensibilidade da EIM. Estas simulações podem ser uma ferramenta valiosa para se compreender melhor como fatores externos (eletrodos, camada de pele de gordura, o fluxo sanguíneo) e internos (seção transversal, fluidos intracelulares) influenciam a bioimpedância do músculo. A utilização de modelos FEM ainda tem outras aplicações no estudo de bioimpedância, principalmente no que concerne aos arranjos de eletrodos (medidas com dois ou quatro eletrodos), como demonstrado nos trabalhos de Grimnes, Matinsen e Johnsen (2010) e Grimnes e Martinsen (2007). Embora esses dois estudos tenham sido realizados com dados simulados, esses trabalhos possuem grande relevância por avaliar técnicas de medidas que são utilizadas na EIM.

Algumas das influências anteriormente citadas podem ser evitadas se a medida de EIM for realizada diretamente no músculo. Nesse contexto, a utilização de modelo animal (ratos ou camundongos) surge como um desenho experimental promissor. Embora nos modelos animais o controle voluntários das contrações musculares possa representar um problema, alguns estudos mostraram que é possível, por exemplo, controlar a intensidade e o tempo de duração da contração muscular do gastrocnêmio em ratos por meio de eletroestimulação do nervo ciático (DELAVAR et al., 2014). Utilizando esta técnica, o estudo de Sanchez et al., (2014) mostrou que há relação entre dados de bioimpedância e contração muscular em camundongos; assim como, que é viável conduzir um estudo de impedância muscular invasiva com contrações controladas evocada por estímulos elétricos externos. Então, como as medidas são feitas diretamente no músculo, sendo menos influenciadas por alguns fatores externos, pesquisas sobre o comportamento da impedância durante a contração muscular (chamada por Shiffman, Aaron e Rutkove (2003) de EIM dinâmica), sob as condições experimentais parecidas às do

trabalho de Sanchez e colegas (2014), podem enriquecer o conhecimento sobre o comportamento da EIM em músculos saudáveis.

No entanto, mesmo em uma contração gerada por eletroestimulação externa é necessário a ação de uma molécula energética conhecida como ATP (Adenosina Trifosfato) para que haja contração muscular (BROOKS, 1998; MCARDLE et al., 2010). Esta molécula não é abundante no organismo humano (WILMORE; DREWS, 1999) e por isso é sintetizada rapidamente em uma situação de baixa energética do organismo. É sabido que existem três principais processos químicos (sistemas ou vias), capazes de fornecer as moléculas de ATP necessárias para a atividade muscular (MCARDLE et al., 2010) e estes sistemas são controlados por um fino equilíbrio entre intensidade e tempo de atividade muscular. Estes sistemas são: Sistema ATP-CP ou Creatina-Fosfato; Sistema Glicolítico ou Glicólise e; o Sistema Oxidativo. Cada sistema possui o seu próprio substrato energético (às vezes um mesmo substrato pode atuar em mais de uma via); fosfocreatina, glicose e glicose/triglicerídeos, respectivamente. Então, cada um desses substratos energéticos gera durante as cadeias de reações bioquímicas diferentes íons que podem influenciar a condutividade do músculo e conseqüentemente a impeditividade do mesmo. Outros fatores também podem alterar a impeditividade muscular, como por exemplo a taxa da quebra (ou hidrólise) da molécula de ATP, concentração de íons no tecido sanguíneo e fluxo sanguíneo no músculo durante contração.

Com tantas perguntas em aberto sobre contração muscular e EIM associada, este trabalho investigou a relação entre contração muscular dinâmica e bioimpedância, assim como o efeito na bioimpedância muscular dos diferentes processos bioquímicos que ocorrem durante uma contração.

1.1 Objetivo do projeto de doutorado

O objetivo geral do trabalho foi estudar em modelo animal o comportamento da impedância de um músculo saudável durante a contração muscular dinâmica, quando há a predominância de um determinado sistema energético fornecendo as moléculas de ATP para o músculo.

Para se atingir o objetivo geral podem ser elencados os seguintes objetivos específicos:

- Buscar uma instrumentação capaz de registrar, com sensibilidade e resposta temporal adequadas, as variações da bioimpedância do músculo associada à contração dinâmica.
- Elaborar protocolos de eletroestimulação *in vivo* em ratos (Wistar) saudáveis capazes de evocar contrações musculares e de enfatizar cada um dos sistemas energéticos e;
- Investigar nos sinais de bioimpedância evidências que possam ser associadas ao metabolismo do músculo durante o exercício;

2 Fundamentação teórica

2.1 O Músculo

Os músculos são definidos como um tecido composto por células contráteis capazes de converter energia química em mecânica e que apresentam propriedades de excitabilidade, condutibilidade, contratilidade e uma capacidade limitada de crescimento e regeneração (ENOKA, 2008). Os músculos são compostos por um grande número de células conhecidas como fibras musculares e podem ser divididos em liso, cardíaco e esquelético; sendo que cada grupo possui funções distintas (WILMORE; DREWS, 1999). Cerca de 40% do corpo humano é formado por músculos esqueléticos e outros 10% por musculatura lisa e cardíaca (GUYTON; HALL, 1996).

Grande parte do tecido muscular, mais especificamente a célula muscular, encontra-se sob o controle do sistema nervoso (DANGELO; FATTINI, 2010). Cada músculo possui um nervo motor (proveniente de um neurônio motor alfa) que se ramifica a níveis microscópicos a fim de controlar a contração de todas as células do músculo (DANGELO; FATTINI, 2010). O conjunto neurônio motor mais as suas ramificação e as fibras musculares que essas ramificações abrangem é denominado unidade motora (GUYTON; HALL, 1996). A Figura 1 ilustra de maneira simples uma unidade motora.

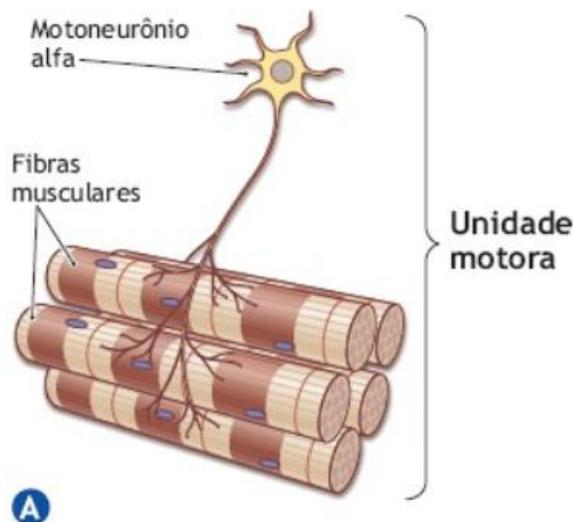


Figura 1. Ilustração de uma unidade motora (MCARDLE et al., 2010)

A contração pode ser voluntária (majoritariamente músculos esqueléticos) ou involuntária (músculos lisos e cardíaco). O sistema nervoso é responsável por informar ao músculo a necessidade de o mesmo realizar uma contração. Isto se dá por intermédio de um impulso

elétrico que percorre a membrana celular e é denominado potencial de ação. Esse potencial de ação se propaga inicialmente por meio dos ramos do neurônio motor que compõe a unidade motora alcançando as fibras musculares por ele inervadas.

A partir do momento que o potencial de ação percorre a membrana da fibra muscular processos fisiológicos e bioquímicos são desencadeados no interior do tecido (maiores detalhes na seção 2.1.1). No caso deste trabalho, apenas o tecido muscular esquelético será abordado e descrito com maiores detalhes.

O músculo esquelético possui dois componentes anatômicos principais. A porção média, que possui uma coloração avermelhada viva composta basicamente de tecido muscular, sendo assim a parte contrátil do músculo, é chamado de ventre muscular (DANGELO; FATTINI, 2010). As extremidades são de cor branca formada por tecido conjuntivo denso, rico em fibras colágenas, são inextensíveis e são responsáveis por fixar o músculo no tecido ósseo. Essas extremidades são denominadas tendões ou aponeuroses. A nomenclatura varia de acordo com o seu formato; tendão possui formato cilíndrico e a aponeurose possui um formato laminar (DANGELO; FATTINI, 2010). A Figura 2 ilustra dois músculos, bíceps braquial e grande dorsal, sendo que o bíceps possui um tendão fixo ao osso e o grande dorsal uma aponeurose.

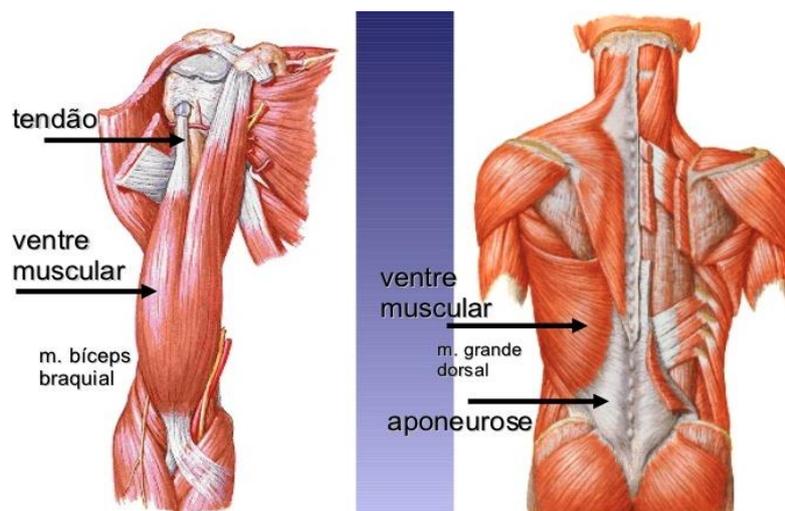


Figura 2. Exemplos de músculos, tendões e aponeuroses. Lado esquerdo: Ventre muscular e tendão do músculo bíceps braquial; Lado direito: Ventre muscular e aponeurose do músculo grande dorsal.(NETTER, 2014)

O músculo esquelético pode ser classificado de acordo com diversas características inerentes a ele. Algumas dessas classificações e também as mais comuns são as seguintes:

- a) Disposição das fibras: esta classificação depende da disposição anatômica das fibras em relação à direção da tração exercida pelo músculo (DANGELO; FATTINI, 2010). Se a disposição for na mesma direção da tração o músculo é denominado fusiforme, caso a direção não seja a mesma o músculo é classificado como peniforme;

- b) Origem e inserção: a origem do músculo é descrita como o ponto onde o tendão ou a aponeurose se insere na peça óssea que não se desloca quando o músculo se contrai. De maneira antagônica, o ponto no qual o tendão ou aponeurose se insere na peça óssea que se desloca durante a contração, se denomina inserção (DANGELO; FATTINI, 2010). Quando o músculo possui mais de uma origem ele é classificado como: bíceps (ex: bíceps braquial, bíceps femoral), tríceps (tríceps braquial, tríceps sural) ou quadríceps (ex.: quadríceps da coxa). Se o músculo apresenta mais de uma inserção ele é denominado bicaudado (se houver duas inserções) ou policaudado (mais de duas inserções). Um exemplo de músculo policaudado é o flexor longo do pé;
- c) Ação: esta classificação depende do movimento que a ação do músculo causa. O bíceps braquial, por exemplo, quando contrai gera um movimento de flexão do antebraço, logo é um músculo flexor. As outras classificações são: extensor, adutor, abductor, pronador, supinador, rotador medial, rotador lateral, flexor plantar e flexor dorsal.
- d) Tipo de fibra: esta classificação se refere a uma característica fisiológica. O tipo de fibra também se relaciona com a velocidade de contração da fibra muscular. Algumas fibras se contraem mais rápidas que outras, e essa característica também gera uma diferença no fenótipo do tecido. As fibras de contração lenta (CL) ou tipo I possuem mais mitocôndrias e maior aporte sanguíneo dando ao tecido uma cor mais avermelhada. As fibras de contração rápida (CR) ou tipo II são menos irrigadas pelo tecido sanguíneo e sua cor fica mais esbranquiçada. As fibras CR podem ser subdivididas em CRa ou tipo IIa e CRb ou tipo IIb. A CRa apesar de realizar uma contração rápida e possuir o aspecto esbranquiçado, possui algumas características da fibra CL como um maior número de mitocôndrias. Assim, esta pode ser considerada uma fibra intermediária, entre a CL e a CRb. A Tabela 1 resume as características desses três tipos de fibra.

A Figura 3 mostra dois músculos: (a) flexor longo dos dedos do pé (penado, policaudado e flexor); (b) bíceps braquial (bíceps, fusiforme e flexor).

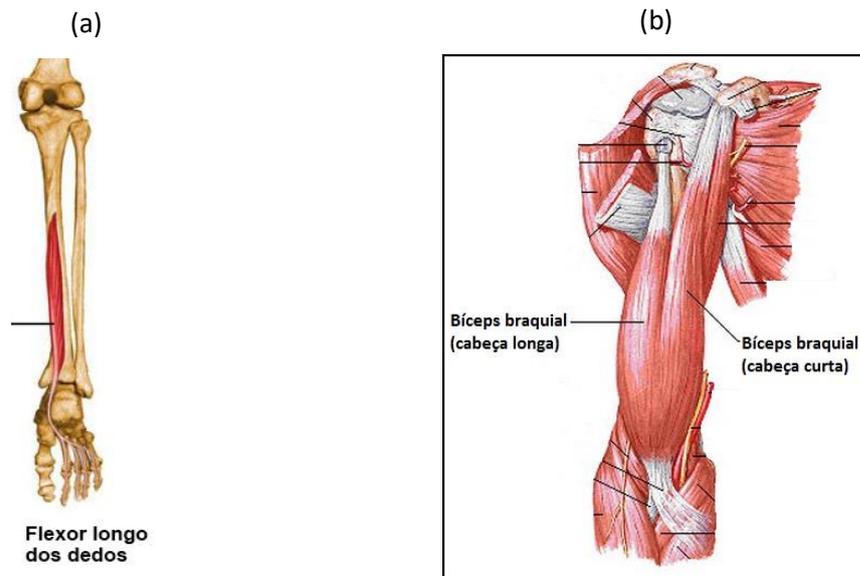


Figura 3. Classificações de dois músculos: (a) Flexor longo dos dedos; peniforme, uma origem, policaudado e flexor do metatarso; (b) Bíceps Braquial; fusiforme, bíceps, uma inserção e flexor do cotovelo. (NETTER, 2014)

Tabela 1. Características fisiológicas do músculo de acordo com os tipos de fibras

Características	TIPOS DE FIBRAS		
	CL ou Tipo I	CRa ou Tipo IIa	CRb ou Tipo IIb
Capacidade Oxidativa	Alta	Moderada/Alta	Baixa
Capacidade Glicolítica	Baixa	Alta	Muito Alta
Velocidade Contrátil	Lenta	Rápida	Rápida
Resistência à Fadiga	Alta	Moderada	Baixa
Força da Unidade Motora	Baixa	Alta	Alta

Fonte: WILMORE et al., 1999

As fibras musculares são formadas por estruturas como o sarcolema, sarcoplasma, retículo sarcoplasmático, túbulos T e as miofibrilas (Figura 4). O sarcoplasma é o fluido intracelular do tecido muscular e contém grande quantidade de potássio (K^+), magnésio (Mg^{++}), fosfato (H_2PO_3) e enzimas (GUYTON; HALL, 1996). O retículo sarcoplasmático (RS) e as miofibrilas estão localizados no sarcoplasma, assim como um enorme número de mitocôndrias que se encontram dispostas paralelamente às miofibrilas (GUYTON; HALL, 1996).

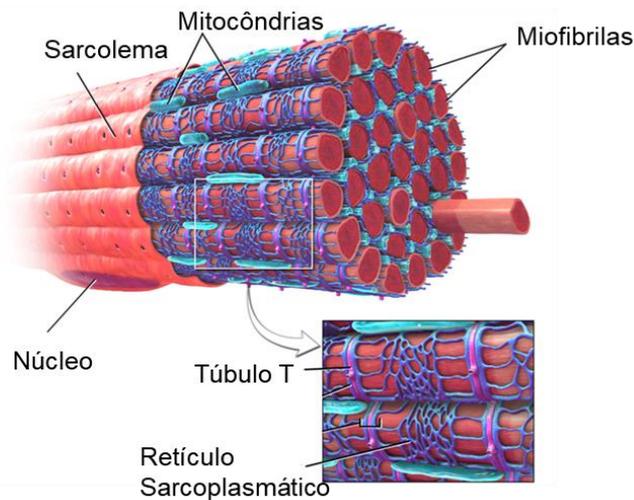


Figura 4. Fibra muscular e suas estruturas. (ADAPTADO DE <https://commons.wikimedia.org/>)

As miofibrilas são formadas por miofilamentos e nestes existem as unidades contráteis do tecido muscular denominadas de sarcômeros (Figura 5). A miofibrila é, então, uma associação em série de inúmeros sarcômeros. O sarcômero (delimitado pelas linhas Z) é composto por filamentos grossos (miosina) e finos (actina), além de outras proteínas como a troponina e tropomiosina. A interação dos filamentos com essas proteínas, desencadearão o processo de contração do sarcômero, que será explicado com mais detalhes da próxima seção.

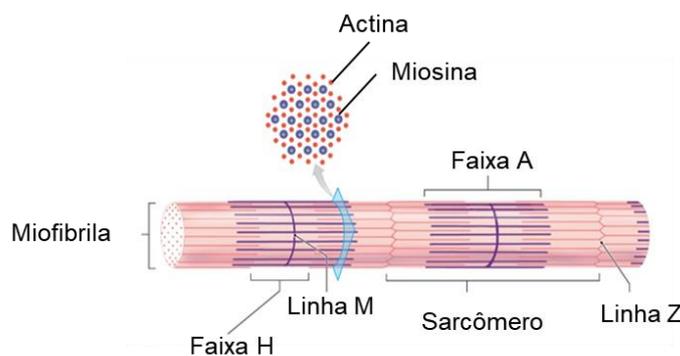


Figura 5. Sarcômero e seus componentes. (ADAPTADO DE <https://commons.wikimedia.org/>)

2.1.1 Fisiologia da Contração Muscular Esquelética

Quando um potencial de ação percorre um neurônio motor até suas terminações nas fibras musculares, há secreção de pequena quantidade da substância neurotransmissora chamada de acetilcolina. Esta atua sobre uma determinada área da membrana da fibra muscular, abrindo numerosos canais proteicos dependentes de acetilcolina. A abertura desses canais acetilcolina-dependentes permite a entrada de grande quantidade de íons sódio (Na^+) para o interior da

membrana da fibra muscular e promove a saída de íons K^+ e cloro (Cl^-), no ponto da terminação nervosa, produzindo um potencial de ação na fibra muscular (GUYTON; HALL, 1996).

O potencial de ação ao percorrer a membrana celular gera a despolarização da fibra muscular. Tal fato permite a liberação de íons cálcio (Ca^{++}) do retículo sarcoplasmático para o sarcoplasma através dos túbulos T (WILMORE; DREWS, 1999). O Ca^{++} possui papel fundamental no mecanismo de contração. Ao se ligar à molécula de troponina (no complexo troponina-tropomiosina) ocorre um reposicionamento do complexo troponina-tropomiosina e, dessa forma, a molécula de tropomiosina não se liga mais à actina permitindo que os sítios ativos da actina fiquem livres para interação com a miosina. A partir deste momento os sítios ativos da actina, antes ocultos pela tropomiosina, podem se ligar à cabeça da miosina (WILMORE; DREWS, 1999).

Uma vez que as moléculas de actina e miosina estão ligadas, ocorre o mecanismo de contração. Pela teoria do filamento deslizante, quando a cabeça da miosina se liga com a actina, as proteínas se tracionam em sentidos opostos. Em alguns casos este tracionamento gera uma sobreposição destas moléculas (Figura 6) e o encurtamento do sarcômero (MCARDLE et al., 2010), mas não é este encurtamento que se chama contração e sim a geração de tensão na célula muscular. Isto significa que é possível ocorrer contração sem encurtamento e até mesmo com distensão muscular.

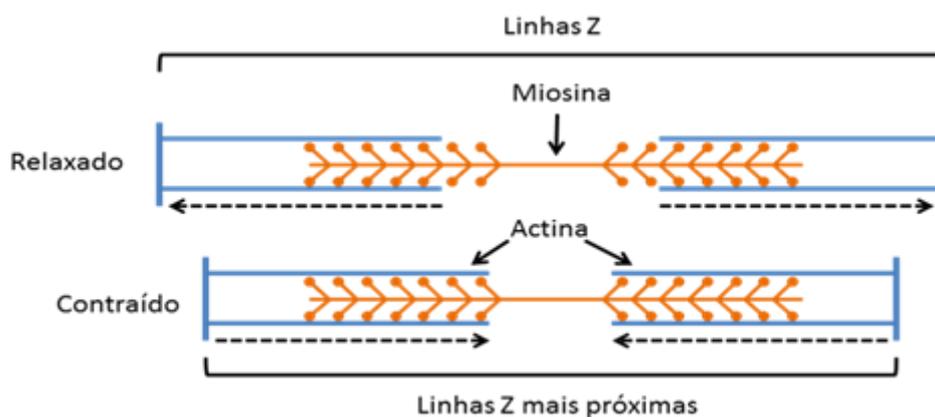


Figura 6. Ilustração do sarcômero relaxado e contraído (Elaborada pelo autor).

A tração entre os filamentos finos e grossos é um processo ativo que exige energia (WILMORE; DREWS, 1999). Neste caso, a cabeça da miosina possui outro sítio ativo (além do sítio que se liga à actina) de ligação com a molécula de ATP (adenosina trifosfato). A enzima ATPase quebra o ATP em ADP (adenosina difosfato) e fosfato inorgânico (P_i) e libera energia necessária para a que haja a ação muscular (WILMORE; DREWS, 1999).

Após uma fração de segundo, os íons Ca^{++} são bombeados de volta para o retículo sarcoplasmático, onde permanecem armazenados até que ocorra novo potencial de ação muscular (GUYTON; HALL, 1996).

2.1.2 Tipos de contração

A contração muscular de um determinado músculo pode gerar ou não um movimento articular. A partir deste efeito podem-se classificar as contrações musculares em três principais tipos; concêntrica, excêntrica e isométrica.

A contração concêntrica caracteriza-se pelo encurtamento do músculo devido ao deslizamento das proteínas actina e miosina, sendo que esta contração possui características de ações dinâmicas uma vez que ocorre juntamente com um movimento articular. Neste caso, a força produzida pelo músculo é maior que a força externa de oposição ao movimento que é aplicada a ele (sobrecarga imposta ao músculo). Por exemplo, realizar um movimento de flexão do cotovelo com um halter na mão na posição de pé. Neste caso, os músculos flexores do cotovelo (bíceps braquial, braquial e braquiorradial) estão sofrendo um encurtamento e como consequência o ângulo articular entre braço e antebraço está diminuindo.

A contração excêntrica também possui características dinâmicas, pois ocorre concomitantemente com alterações do ângulo articular. No entanto durante este tipo de contração o músculo está alongando ao invés de encurtando (WILMORE; DREWS, 1999). Neste caso, a força produzida pelo músculo é menor que a sobrecarga imposta a ele e o movimento articular é freado pelo músculo. Por exemplo, o bíceps quando contrai (contração concêntrica), gera um movimento de flexão do cotovelo, uma vez que a força produzida pelo músculo supera a sobrecarga imposta (um halter de 2k na mão de um indivíduo, por exemplo). Agora, se essa força, produzida pelo bíceps, não supera a sobrecarga imposta, mesmo com o músculo contraído e tentando gerar um movimento de flexão do cotovelo, o cotovelo realiza o movimento oposto, a extensão.

A contração isométrica se caracteriza principalmente por não haver movimento articular ou não alterar o ângulo articular durante a contração, o comprimento do músculo também não se altera e assim a ação do músculo denomina-se de ação estática (WILMORE; DREWS, 1999). Esta condição ocorre quando a sobrecarga imposta ao músculo é igual a força produzida pelo mesmo (WILMORE; DREWS, 1999). Por exemplo, sustentar o antebraço num ângulo de 90° da articulação do cotovelo com um halter de 2kg (na mão) é uma contração isométrica. Pois não existe movimento articular. No entanto se a partir de um determinado momento o bíceps aumentar a força e gerar um movimento de flexão do cotovelo, reduzindo o ângulo articular para 45° , por exemplo, a contração passa a ser concêntrica.

2.2 Bioenergética

A energia necessária durante a contração muscular é proveniente da hidrólise da molécula de ATP. Contudo, o armazenamento de ATP no corpo humano é considerado baixo para suprir as necessidades energéticas durante uma atividade (MCARDLE et al., 2010). Assim, o corpo dispõe de três principais fontes de ressíntese de ATP, o sistema ATP-CP, o sistema glicolítico e o sistema oxidativo (WILMORE; DREWS, 1999). Essas fontes são capazes de sintetizar moléculas de ATP conforme a necessidade do organismo e a utilização de cada uma delas é controlada principalmente pela intensidade e duração de uma atividade. A Figura 7 ilustra o percentual de contribuição de cada fonte de energia em função do tempo de atividade.

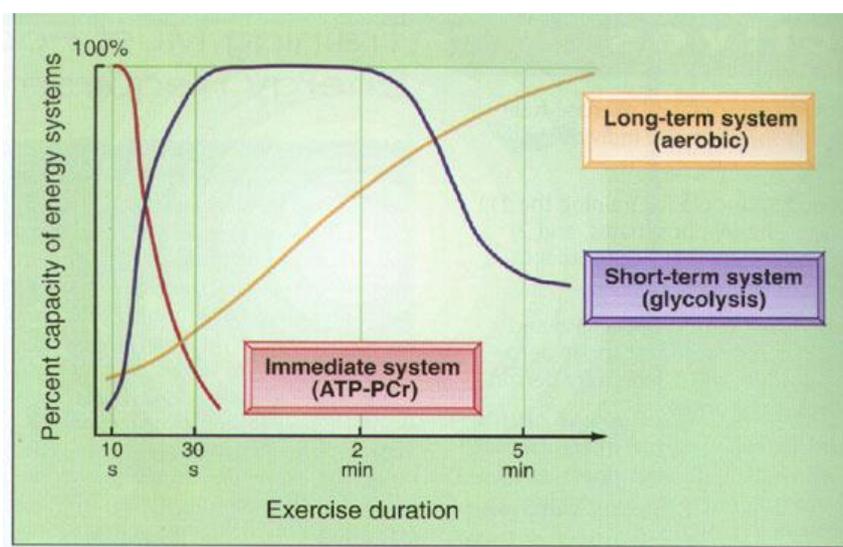


Figura 7. Percentual de contribuição de cada sistema energético supondo uma atividade de intensidade constante (MCARDLE et al., 2010).

Na contração muscular o sistema ATP-CP é a principal fonte de geração de ATP nos primeiros segundos de contração, geralmente até uns 15 segundos aproximadamente (WILMORE et al., 1999; PLATONOV e BULATOVA, 2003). A creatina fosfato ou fosfocreatina (PCr) ao ser clivada, através da enzima creatina quinase, em creatina (Cr) e Pi, libera energia. Esta energia é necessária para que haja a formação (ou fosforilação) do ATP (MCARDLE; KATCH; KATCH, 2010). A Figura 8 ilustra este processo. Este sistema é capaz de fornecer rapidamente grandes quantidades de ATP de maneira simples e rápida (WILMORE; DREWS, 1999), uma vez que todo o processo de formação de ATP depende apenas de duas reações químicas.

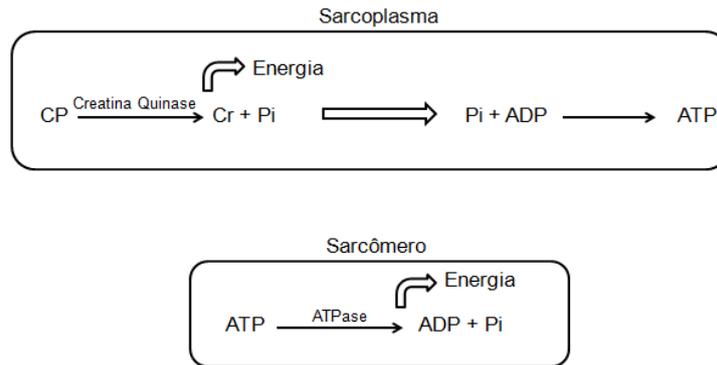


Figura 8. Reações químicas que ocorrem no sarcoplasma para a formação de ATP através do sistema ATP-CP e a reação de liberação de energia no sarcômero quando o ATP está fixado na cabeça da miosina. PCr - creatina-fosfato; PCr - Creatina; Pi - fosfato inorgânico; ADP - Adenosina difosfato. (Elaborada pelo autor)

O ATP será hidrolisado para fornecimento de energia e permitir o encurtamento do sarcômero. É importante ressaltar que a hidrólise do ATP em ADP + Pi, além de liberar energia, libera prótons de H⁺, que precisam ser tamponados para não haver uma redução do pH (acidificação) da célula.

Por fim, a molécula livre de creatina será ressintetizada em PCr no espaço intermembranas da mitocôndria. Esse processo de ressíntese da molécula de PCr não ocorre rapidamente, sendo uma das razões dos estoques de PCr durarem por um curto espaço tempo.

As outras duas fontes de ressíntese de ATP também atuam de acordo com o tempo da atividade ou contração muscular, vide Figura 7. O sistema glicolítico atua também como uma fonte de energia de alta velocidade. No entanto em relação ao sistema ATP-CP, este sistema possui uma ação mais lenta de geração de energia e menos potente, mas com duração significativamente maior, trinta segundos a seis minutos aproximadamente (PLATONOV; BULATOVA, 2003). O sistema glicolítico consiste na obtenção de moléculas de ATP através da degradação da molécula de glicose (MCARDLE et al., 2010).

A glicose é proveniente da alimentação (carboidratos), da quebra das moléculas de glicogênio (muscular ou hepático), ou até mesmo a partir do metabolismo de aminoácidos (MCARDLE, et al., 2010). O glicogênio consiste em uma molécula que armazena uma série de moléculas de glicose. Ao ser quebrada, esta fornece a glicose necessária para o início do processo de glicólise. O glicogênio é formado a partir da glicose sanguínea e armazenado no fígado e músculos até o momento em que é solicitado (WILMORE; DREWS, 1999). Este sistema também é responsável por produzir ao final do seu processo a molécula de lactato, que é de extrema importância no processo de tamponamento da célula.

Esta via consiste numa cadeia de 10 reações que formam 4 moléculas de ATP as custas de 2 moléculas, sendo assim gerando um saldo de 2 moléculas de ATP por molécula de glicose degradada. A Figura 9 ilustra a cadeia de reações da glicólise. É importante ressaltar que uma molécula de glicose possui seis carbonos e quando a frutose 1,6 bifosfato é quebrada, formam-se duas moléculas de três carbonos: dihidroxicetona fosfato e gliceraldeído 3-fosfato. A partir deste momento as reações apresentadas ocorrem duas vezes, conseqüentemente duas moléculas de piruvato e quatro de ATP serão formadas (MCARDLE et al., 2010; NELSON; COX, 2004).

O piruvato possui papel importante no controle das vias metabólicas, dependendo da condição energética do organismo ele pode ser convertido em Lactato ou em Acetil-CoA. Quando em situação de baixa energética, há uma “aceleração” da via glicolítica e acúmulo de prótons H^+ , devido à hidrólise de ATP (BERTUZZI et al., 2009). Com isso o piruvato sofre ação da enzima lactato desidrogenase (LDH), em nível citoplasmático, que converte o piruvato em lactato (WESTERBLAD; BRUTON; KATZ, 2010). Este lactato atua com agente tamponador dos prótons H^+ evitando redução do pH e mantendo o equilíbrio ácido-base no músculo, viabiliza que o sistema glicolítico continue ativo, uma vez que o lactato é responsável pela formação de novas moléculas de NAD, serve como precursor para a síntese de glicogênio muscular e hepático e, como substrato energético para outros órgãos, como o cérebro, por exemplo.

Brooks, (2020) em uma recente revisão, diz que no músculo em repouso a relação entre a concentração de Lactato ($[Lac^-]$) e a concentração de piruvato ($[Piruvato]$) é de aproximadamente 10 ($[Lac^-]/[Piruvato] \approx 10$). Contudo num músculo ativo essa relação aumenta mais de uma ordem de grandeza, podendo chegar a valores em torno de 500. Com isso, mesmo durante uma atividade de baixa intensidade ou com predomínio do sistema oxidativo, a relação $[Lac^-]/[Piruvato]$ será um valor alto. No entanto pode-se observar, nas condições de predomínio do sistema oxidativo, um aumento na taxa de atividade da enzima PDH (piruvato desidrogenase), responsável pela formação do Acetil Co-A a partir da molécula de Piruvato (PUTMAN et al., 1998), assim, esta enzima pode ser um marcador bioquímico importante para diferenciar as atividades dos sistemas energéticos.

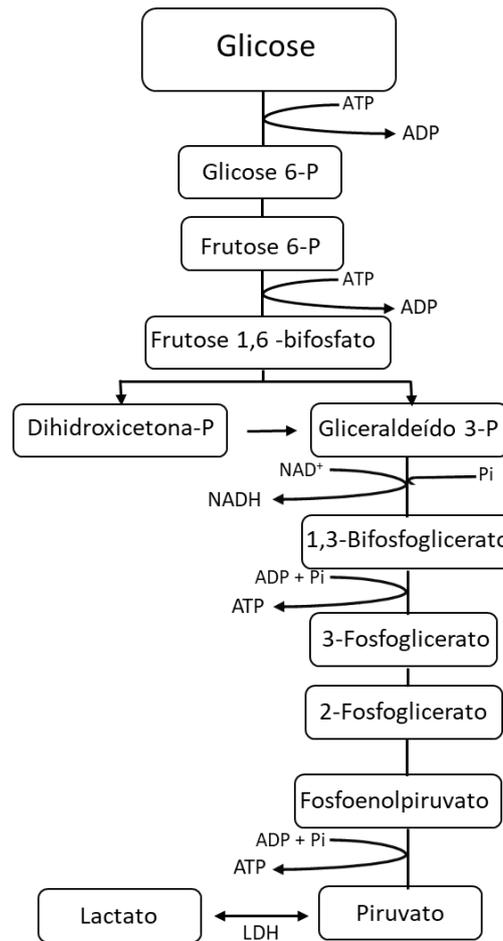


Figura 9. Ilustração do ciclo da glicólise. (Elaborado pelo autor, adaptado de NELSON e COX, 2004)

O sistema oxidativo é o único que atua sob a presença importante da molécula de oxigênio (O_2), por isso também é chamado de sistema aeróbio. Como o sistema glicolítico, forma relativamente pouco ATP, a partir de um determinado tempo de exercício intenso o sistema oxidativo passa a fornecer o ATP necessário para manutenção da atividade (MCARDLE et al., 2010). Este sistema (oxidativo) produz grandes quantidades de ATP e podem ser obtidos pela oxidação de carboidratos ou triglicerídeos.

De modo simplificado, o sistema oxidativo possui duas etapas. O ciclo de Krebs ou ciclo do ácido cítrico, responsável pela formação de potencial redutor, NADH e $FADH_2$ que ocorre na matriz mitocondrial. Posteriormente, as moléculas de NADH e $FADH_2$ atuam na cadeia de transporte de elétrons onde são geradas as moléculas de ATP (MCARDLE et al., 2010). Todas as reações existentes no ciclo de Krebs podem ser vistas na Figura 10.

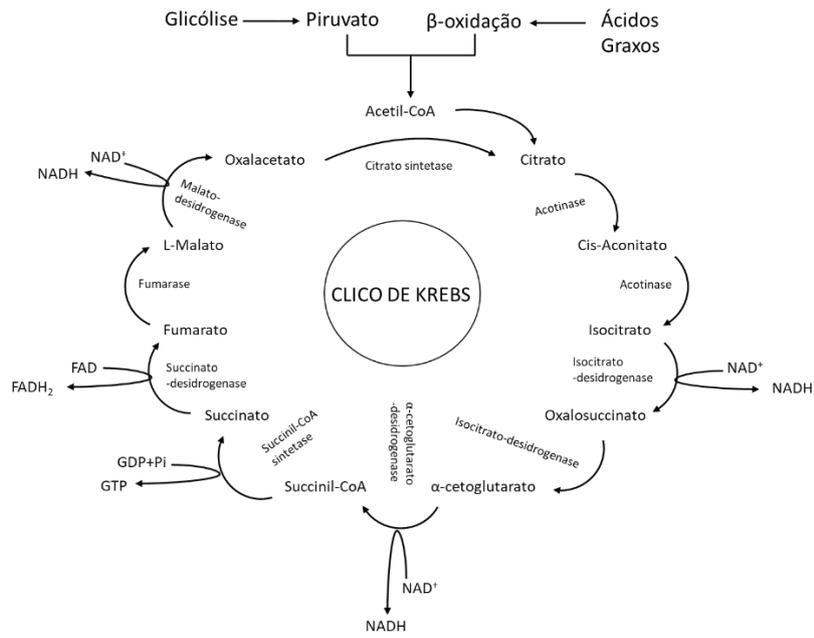


Figura 10. Ilustração do ciclo de Krebs. (Elaborada pelo autor, adaptada de MCARDLE et al., 2010)

Para dar-se início ao ciclo de Krebs, necessita-se de uma molécula proteica chamada de Acetil Coenzima A (acetil-CoA) (COX; NELSON, 2000). Esta molécula pode ser proveniente do metabolismo de carboidratos ou lipídeos (como dito anteriormente). A Figura 11 apresenta resumidamente essas etapas.

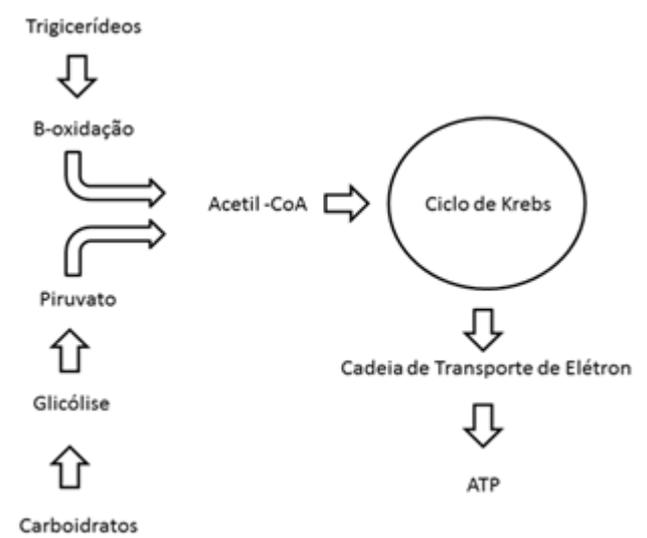


Figura 11. Esquemático resumido do sistema oxidativo. (Elaborada pelo autor)

Se for proveniente do carboidrato a enzima piruvato desidrogenase é a responsável em transformar o piruvato em acetil-CoA, no caso de acúmulo do próprio piruvato (NELSON; COX, 2004). Caso a fonte de acetil-CoA seja os lipídeos, a molécula é obtida por meio da quebra de molécula de triacilglicerol (três moléculas de ácidos graxos ligadas a uma molécula de glicerol)

em três moléculas de ácido graxo livre mais uma molécula de glicerol (NELSON; COX, 2004). As moléculas de ácido graxo passarão por um processo chamado β -oxidação, que resultará na formação do acetil-CoA. Nota-se que cada processo de β -oxidação gera 8 moléculas de acetil-CoA, logo, sendo capaz de rodar o ciclo de Krebs oito vezes (MCARDLE et al., 2010). Por esse motivo é fácil entender que uma molécula de lipídeo é capaz de gerar muito mais energia que uma única molécula de carboidrato. Em números, uma molécula de glicose totalmente catabolizada (glicólise e fosforilação oxidativa) é capaz de gerar um saldo positivo de até 36 moléculas de ATP enquanto uma molécula de triglicerídeo pode gerar até 460 moléculas de ATP (MCARDLE et al., 2010).

2.3 Impedância elétrica

A impedância elétrica pode ser definida como a oposição total que um meio oferece à passagem de uma corrente elétrica (EDMINSTER, 1974). Quando esta oposição gera um gasto de energia em forma de calor e ocorre o efeito Joule, esta oposição é denominada resistência (R). Por outro lado, se o meio não dissipa energia em forma de calor para se opor à passagem da corrente temos a reatância (X), que pode ser capacitiva (X_c) ou indutiva (X_L). Em circuitos de corrente alternada senoidal a reatância também se caracteriza por provocar uma defasagem de 90° entre os sinais de corrente e tensão. As características de resistência e de reatância de um meio ou sistema é então denominada de impedância (Z), que pode ser vista como a relação geral entre tensão aplicada (V) e corrente circulante (I) pelo meio, tal que $Z = V i^{-1}$

Admitindo que a tensão seja proveniente de uma fonte senoidal alternada e supondo o meio como um sistema linear, a corrente também terá o comportamento senoidal, podendo ambas serem representadas por números complexos (fasores) que contabilizam o módulo e a fase destes sinais. Logo, por representar a razão entre dois números complexos, a impedância também pode ser representada por um número complexo (equação 2.1), com um módulo e uma fase (equação 2.2). Sendo assim, é possível representar graficamente a impedância no plano complexo, por meio de seus valores de módulo e fase ou partes real e imaginária (Figura 12)

$$\mathbf{Z} = R + jX \text{ ou } \mathbf{Z} = |\mathbf{Z}|e^{j\theta} \quad (2.1)$$

$$|\mathbf{Z}| = \sqrt{R^2 + X^2} \quad \theta = \arctg \frac{X}{R} \quad (2.2)$$

onde, Z é impedância, R é a resistência, X é a reatância, $|Z|$ é o módulo de Z e θ é fase de Z .

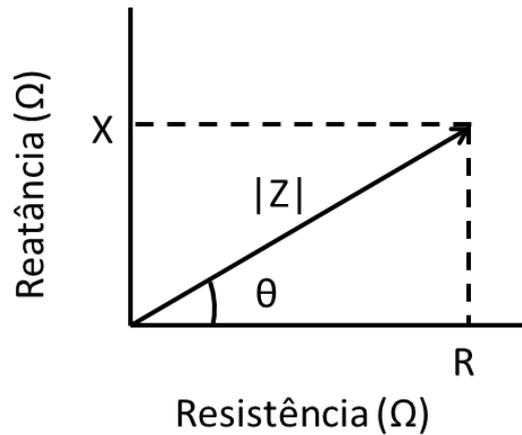


Figura 12. Representação da impedância no plano complexo.

Os valores de resistência e reatância são medidos em Ohms (Ω) e para um sinal senoidal de frequência ω suas magnitudes são dependentes da frequência do sinal (equações 2.3 e 2.4).

$$X_c = \frac{1}{j\omega C} \quad (2.3)$$

$$X_l = j\omega L \quad (2.4)$$

onde ω é a frequência do sinal, sendo $\omega = 2\pi f$ e $f = a$ frequência em graus.

2.3.1 Características de um volume condutor

Uma amostra de um determinado material do qual se deseja saber as características de impedância pode ser chamado de volume condutor. Um volume condutor possui características elétricas fixas inerentes ao material do qual o volume é formado, e outras dependentes das suas dimensões e geometrias. Para chegarmos aos valores de resistência e a reatância há de se levar em conta tanto as características intrínsecas do volume condutor como sua dimensão e forma.

Duas das principais características elétricas próprias do material de um volume condutor são a condutividade (σ) e a permissividade (ϵ). A condutividade é a propriedade elétrica que expressa a facilidade de um material em conduzir a corrente elétrica, sua unidade de medida é Siemens por metro (S/m) (IVORRA, 2002), sendo, às vezes, chamada de condutância específica; pois, diferente da condutância (recíproco da resistência), é específica de cada material e não depende das dimensões do mesmo. Alguns trabalhos exploram as características de resistividade (ρ), expressa em $\Omega \cdot m$, que pode ser definida como o recíproco da condutividade (σ^{-1}). A permissividade, por sua vez, caracteriza a capacidade isolante de um material e é expressa em Farad por metro (F/m) (IVORRA, 2002). A permissividade indica quanto um material isolante ou dielétrico é polarizado em resposta a um campo elétrico. Assim como a

condutividade, a permissividade é específica de cada material e não depende das suas dimensões.

A resistência de um material pode ser calculada a partir da sua resistividade ou condutividade. Considerando, por exemplo, um material de formato cilíndrico, homogêneo e isotrópico (Figura 13), ao se associar as características dimensionais do material e sua resistividade podemos obter o valor de sua resistência pela equação 2.5.

$$R = \rho \frac{L}{A_{st}} \quad (2.5)$$

onde, L é o comprimento do material e A_{st} representa a área de secção transversa.

As setas na Figura 13 representam os vetores de densidade de corrente supondo uma excitação externa de corrente. Por ser um meio homogêneo, nota-se que os vetores possuem as mesmas magnitudes, além de estarem igualmente e paralelamente distribuídos por todo o volume.

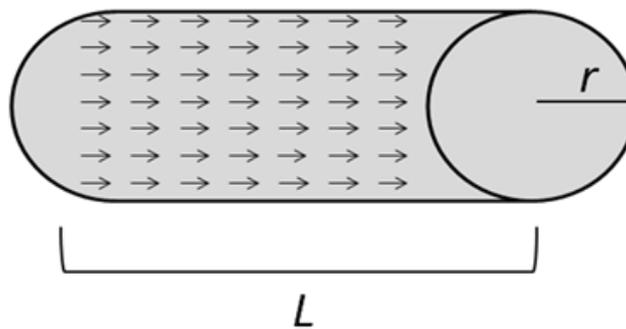


Figura 13. Volume condutor homogêneo. As setas representam os vetores de densidade de corrente, r - raio do cilindro e L - comprimento do Cilindro (Adaptado de GRIMNES e MARTINSEN, 2008)

No entanto é mais comum que os volumes condutores apresentem mais de um material em sua composição. Nesse caso cada material terá uma condutividade característica, volumes e formas diferentes uns dos outros, dentro de um mesmo volume condutor. Assim, a distribuição das linhas de densidade de corrente se alteram e a impedância do volume condutor é resultante da combinação desses diferentes materiais. A Figura 14 mostra como um meio não homogêneo, isto é anisotrópico, altera a distribuição das linhas de densidade de corrente. Nota-se que os vetores de densidade de corrente aumentam em magnitude nas áreas com maior condutividade. Então, podemos dizer que a impedância de meios não homogêneos (seja na condutividade ou na geometria), sofre influência da anisotropia do meio.

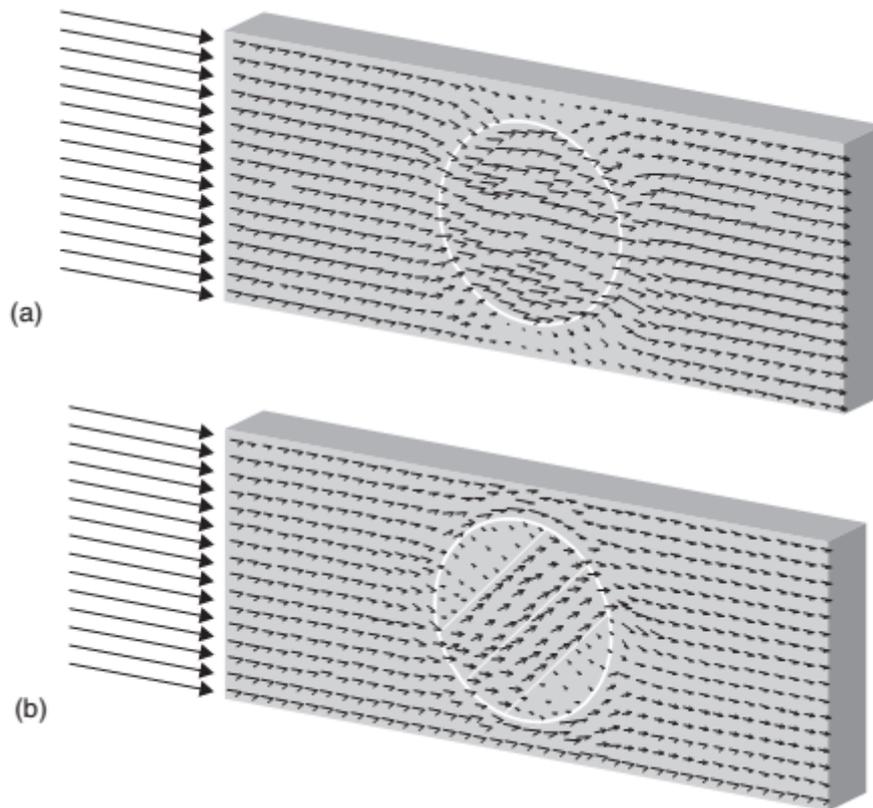


Figura 14 Volume condutor não homogêneo. (a) Área retangular e uma área circular, sendo a área circular com maior condutividade. (b) Área retangular, uma área circular e duas áreas retangulares no interior do círculo, sendo a área circular com menor condutividade e as áreas retangulares com a mesma condutividade. (GRIMNES; MARTINSEN, 2008).

2.3.2 Bioimpedância

O termo bioimpedância diz respeito às características de impedância elétrica em materiais biológicos, ou seja, é um atributo que avalia o quanto um material biológico é capaz de se opor ao fluxo de corrente elétrica. As características de impedância do corpo biológico seguem os mesmos princípios vistos anteriormente, sendo que além da parte resistiva, há uma parte reativa, geralmente capacitiva, o que torna a bioimpedância dependente da frequência do sinal de estimulação.

Nos materiais biológicos, cada tecido possui um comportamento particular em relação à sua impedância, ou seja, não podemos, por exemplo, dizer que as características elétricas do tecido muscular são as mesmas do tecido adiposo. A Tabela 2 mostra esta diferença e apresenta valores estimados de resistividade de alguns tecidos de porco. Os valores foram calculados a partir dos dados de condutividade, obtidos por Gabriel e colaboradores (2009), em frequências de 40 Hz e 70 Hz.

Tabela 2. Valores de resistividade (ρ) em diferentes tecidos de porco

Tecido	ρ ($\Omega \cdot m$)
Gordura	12,82
Crânio (secção medial)	3,125
Sangue	1,66
Músculo	6,66

Fonte: Gabriel e colaboradores (2009)

No entanto, algumas características podem ser vistas de forma comum em relação aos tecidos biológicos, isto é, todo tecido pode ser interpretado como um meio extracelular e um conjunto de células desempenhando uma mesma função (PLATONOV; BULATOVA, 2003), sendo que tanto o meio extracelular quanto as células possuem propriedades elétricas.

O conjunto de células que formam os tecidos pode ser dividido em duas partes; as membranas celulares formadas por uma bicamada lipídica, portanto com condutância muito baixa (IVORRA, 2002), e os meios intracelular e extracelular, que podem ser considerados eletrólitos e bons condutores elétricos. Portanto, pode-se observar um efeito capacitivo da membrana celular, por esta se comportar como um dielétrico separando os meios intracelular e extracelular, considerados bons condutores de corrente. Em decorrência das características elétricas acima descritas dos tecidos biológicos, na análise de bioimpedância é comum representarmos o comportamento dos tecidos estudados por meio de um modelo elétrico, como, por exemplo, o ilustrado na Figura 15.

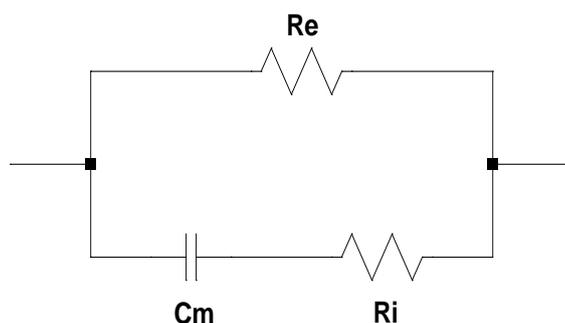


Figura 15. Modelo elétrico que mimetiza as características elétricas de um tecido biológico. R_e – Resistência extracelular, R_i – Resistência intracelular e C_m – Capacitância de Membrana.

Para regime permanente senoidal, a impedância equivalente (Z_{eq}) do modelo elétrico da Figura 15 pode ser calculada pela equação 2.6.

$$Z_{eq} = \frac{1}{\frac{1}{R_e} + \frac{1}{R_i + \frac{1}{j\omega C_m}}} \quad (2.6)$$

Uma vez adotado este modelo, caso uma corrente com frequência muito baixa seja injetada ao modelo, o capacitor se comportará como um circuito aberto (equação 3) e a corrente passará apenas pelo resistor R_e . Em outras palavras, a corrente permeará apenas o meio extracelular. Assim, o valor de R_e representará a Z_{eq} do sistema biológico em baixas frequências. Neste caso o valor de R_e também pode ser chamado de R_0 (resistência observada quando a frequência tende para zero). Em contrapartida, se a frequência da corrente injetada for muito alta, o capacitor se comportará como um curto circuito (vide equação 3) e a corrente percorrerá tanto o resistor R_e quanto R_i , ou seja, a corrente permeará tanto o meio extracelular quanto o meio intracelular. A Z_{eq} do sistema passará a ser descrita pela associação em paralelo entre R_e e R_i (equação 2.7) e podemos então chamar a Z_{eq} de R_{inf} (resistência observada quando a frequência tende para infinito).

$$R_{inf} = \frac{R_e R_i}{R_e + R_i} \quad (2.7)$$

A Figura 16 ilustra o comportamento descrito acima das correntes elétricas no tecido biológico em altas e baixas frequências.

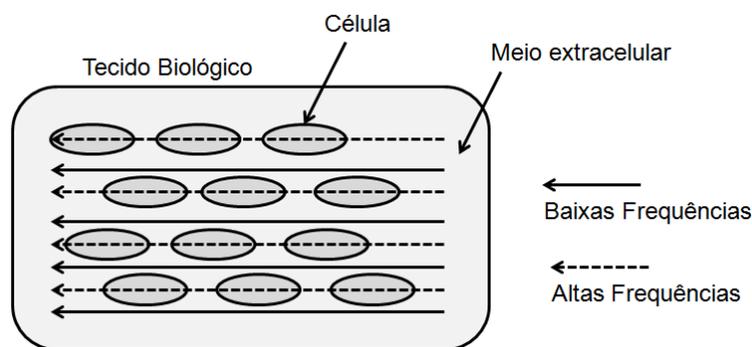


Figura 16. Caminhos preferenciais da corrente elétrica em função da frequência. (Elaborada pelo autor)

Assim, considerando o modelo elétrico da Figura 15 é possível representar o comportamento da bioimpedância em função da frequência, no plano complexo, por um *locus* assemelhado ao ilustrado na Figura 17, sendo a frequência característica a frequência associada à reatância máxima.

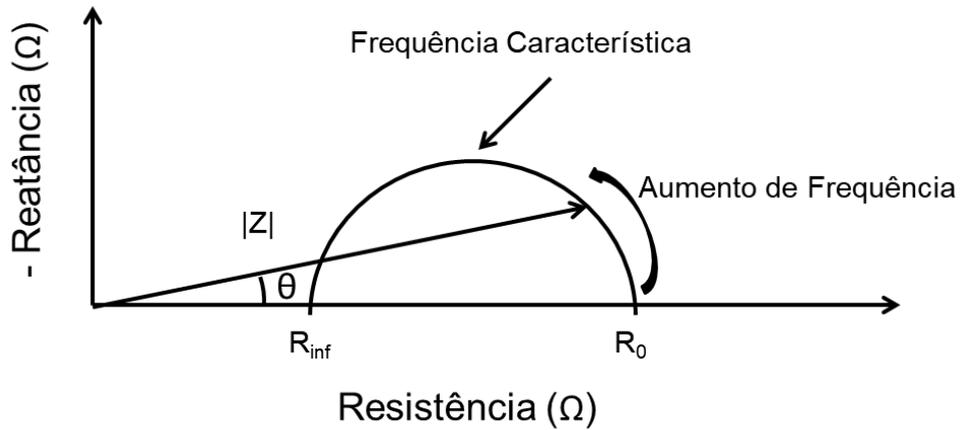


Figura 17. Representação gráfica da impedância (Z) de um sistema biológico em função do aumento da frequência. R_{inf} - resistência em frequências muito altas, R_0 - resistência na frequência 0 Hz, $|Z|$ - módulo da impedância, θ - fase.

O locus da Figura 17 representa a chamada dispersão que ocorre para frequências entre algumas centenas de Hz até alguns MHz. Para frequências mais baixas ou mais altas o modelo da Figura 15 já não é suficiente para representar todos os efeitos observados na bioimpedância. A Figura 18 mostra como os valores de condutividade e permissividade de um tecido biológico variam com a frequência da corrente que o permeia para uma faixa maior de frequências.

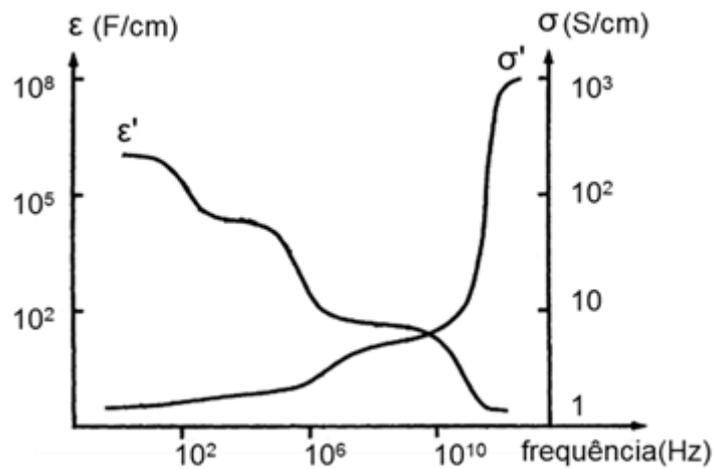


Figura 18. Características de condutividade e permissividade de tecidos biológicos em função da frequência (IVORRA, 2002).

Na Figura 19 e na Figura 20 podem ser visto um exemplo de dados de bioimpedância do músculo bíceps, em função da frequência no plano complexo e em relação ao seu módulo e sua fase.

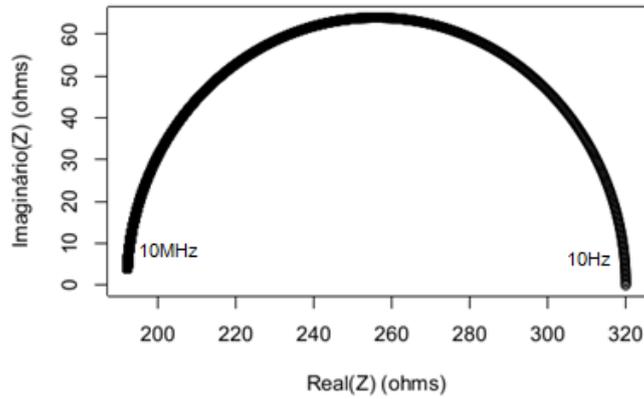


Figura 19. Exemplo do comportamento da bioimpedância de um tecido biológico no plano complexo em função da frequência. (Elaborada pelo autor)

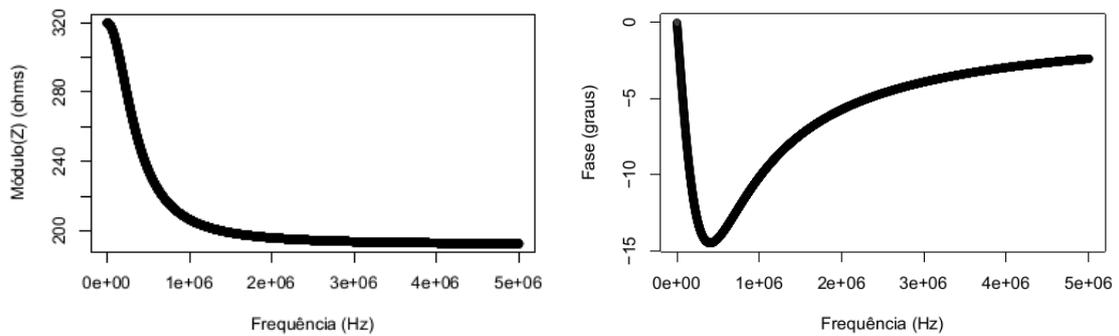


Figura 20. Módulo e fase da bioimpedância do músculo bíceps em função da frequência. (Elaborada pelo autor)

Um modelo mais sofisticado, capaz de representar o comportamento dos tecidos biológicos para uma faixa de frequências maior foi utilizado por Shiffman e Rutkove (2013) para aplicações de EIM. Os componentes adicionais se referem à membrana e ao fluido das organelas celulares (mitocôndrias, retículo endoplasmático, entre outras).

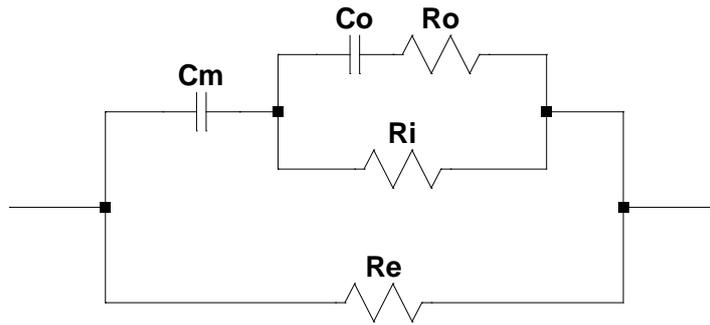


Figura 21. Modelo elétrico de cinco elementos para bioimpedância que contabiliza contribuição de organelas. C_m - capacitância de membrana, C_o - capacitância das organelas, R_o - resistência das organelas, R_i - resistência intracelular, R_e - resistência extracelular.

Nesse novo modelo R_e também pode ser chamado de R_o , a diferença é que em altas frequências o R_{inf} será a associação em paralelo de R_o , R_i e R_e , conforme equação 2.8, e a impedância equivalente do modelo é descrita pela equação 2.9.

$$R_{inf} = \frac{1}{\frac{1}{R_o} + \frac{1}{R_i} + \frac{1}{R_e}} \quad (2.8)$$

O *locus* do comportamento da impedância, seu módulo e fase são apresentados na Figura 22 e na Figura 23, nota-se que apenas a fase possui um *locus* diferente em relação ao modelo de três elementos. Os valores dos parâmetros do modelo elétrico de cinco elementos utilizados na estimativa de Z_{eq} , módulo e fase, foram os obtidos por Shiffman e Rutkove (2013), num estudo que foi utilizado este modelo elétrico. Os valores foram simulados com frequências entre 0 e 10 MHz.

$$Z_{eq} = \frac{1}{\frac{1}{R_e} + \frac{1}{\frac{1}{j\omega C_m} + \left(\frac{1}{R_i} + \frac{1}{\frac{1}{j\omega C_o} + R_o} \right)}} \quad (2.9)$$

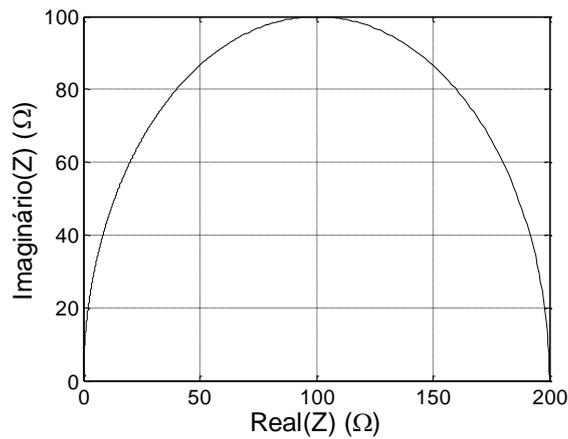


Figura 22. Comportamento da bioimpedância (Z) de um tecido biológico no plano complexo para frequências entre 0 e 10 MHz. (Elaborada pelo autor)

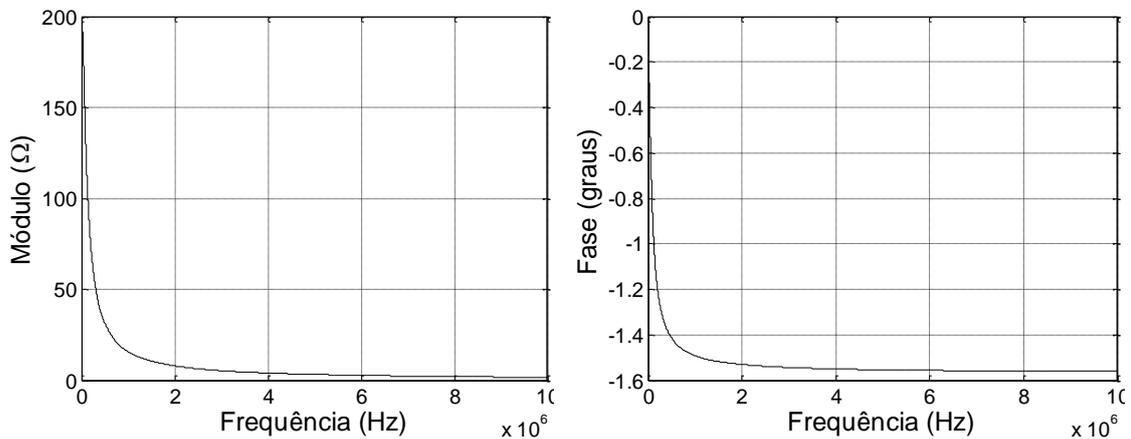


Figura 23. Módulo e fase da bioimpedância de um tecido biológico em função de frequências entre 0 e 10 MHz. (Elaborada pelo autor)

2.3.3 Medição de bioimpedância e miografia por impedância elétrica

Ao reduzir o objeto de estudo apenas ao tecido muscular, pode-se trabalhar com o conceito de EIM, que pode ser compreendido como o estudo da atividade muscular por meio da técnica de bioimpedância. Os conceitos de bioimpedância apresentados até o momento se aplicam à EIM. E os métodos de medidas apresentados a seguir serão os mais utilizados em estudos da técnica de bioimpedância, que também se aplicam à EIM.

De maneira geral aplica-se um campo elétrico de baixa amplitude, a fim de manter a linearidade em um determinado volume condutor (BARSOUKOV; MACDONALD, 2005), e mede-se a resposta elétrica do sistema. O estímulo elétrico aplicado pode ser tensão, ou corrente, depende da técnica de medida, e a resposta do sistema será tensão (caso uma corrente seja

aplicada), ou corrente (caso uma tensão seja aplicada). Além dos estímulos, as técnicas se diferenciam na quantidade de eletrodos (dois ou mais), e no domínio de análise (tempo ou frequência).

2.3.3.1 Domínio de Frequência

A técnica de análise mais comum consiste em aplicar uma corrente senoidal de baixa amplitude (300 μ A a 1 mA) e altas frequências (1 kHz a 10 MHz), e medir a resposta de tensão entre dois pontos quaisquer de interesse (Figura 24).

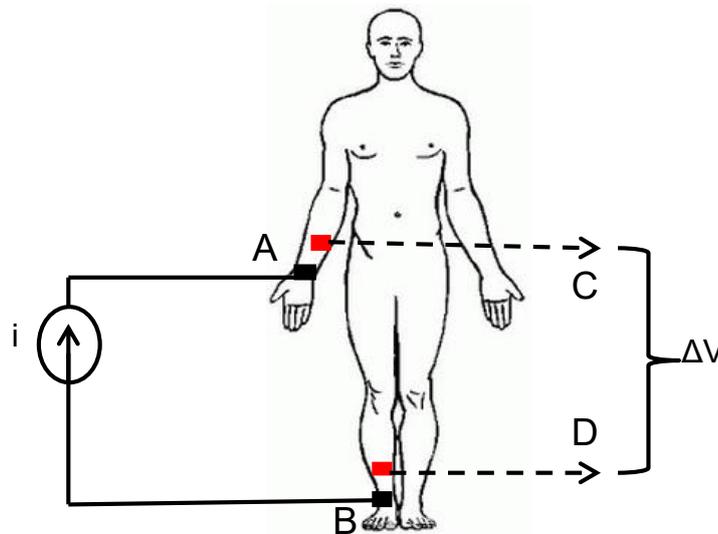


Figura 24. Exemplo de medição de bioimpedância. Aplica-se a corrente entre os pontos A e B e mede-se a tensão entre os pontos C e D. (Elaborada pelo autor)

Esta técnica pode medir a resposta de tensão em uma ou várias frequências (sistemas monofrequencial ou multifrequencial). Em equipamentos comerciais utilizados em estudos de EIM, as frequências analisadas chegam a 10 MHz. A análise pelo domínio da frequência possui a vantagem de apresentar uma boa razão sinal/ruído para a resposta de cada frequência e como as componentes da impedância são dependentes da frequência do sinal de estimulação, pode-se dizer que o método multifrequencial fornece uma resposta mais rica das características de impedância de um volume condutor. Num sistema multifrequencial, mede-se tantas respostas quanto o número de frequência analisadas, ocasionando uma baixa resolução temporal do sistema. Sendo que o tempo total da medida depende principalmente do período da menor frequência analisada pelo sistema. No caso de um sistema monofrequencial o tempo de resposta depende basicamente do período da onda de excitação e, como geralmente uma análise monofrequencial ocorre na frequência de 50 kHz (período de 20 μ s) esse método pode ser capaz de realizar medidas em resoluções temporais bem menores que o método multifrequencial.

2.3.3.2 Domínio do tempo

Técnicas no domínio do tempo têm a vantagem de, geralmente, realizarem medidas mais rápidas e, portanto, permitem uma melhor resolução temporal (MIN et al., 2008). Portanto, permite análises dinâmicas de impedância em intervalos de tempo menores que os métodos no domínio da frequência, sendo bastante úteis para avaliar volumes condutores que alteram muito rapidamente suas características impeditivas (MIN et al., 2008). No entanto, tem como desvantagem a necessidade de digitalizar a resposta e aplicar a transformada de *Fourier*, para transformar a mesma do domínio do tempo, para frequência (BARSOUKOV; MACDONALD, 2005). Este processamento pode gerar uma redução na razão sinal-ruído e mesmo que seja possível realizar medidas em intervalos de tempo pequenos, a visualização dos resultados de impedância, só é possível após o processamento digital. Pode-se dizer que nas técnicas no domínio do tempo utiliza-se, como sinal de entrada, uma estimulação banda larga, onde o tempo de estimulação está diretamente ligado à resolução espectral (equação 10). Já o intervalo de frequências analisadas, além do tempo de excitação, depende também da frequência de amostragem, sendo as frequências mínima e máxima definidas na equação 11.

$$\Delta f = \frac{1}{T} \quad (2.10)$$

onde, Δf é a resolução espectral e T é o período do sinal de excitação.

$$\begin{aligned} f_{\min} &= \Delta f \\ f_{\max} &= \frac{f_s}{2} \end{aligned} \quad (2.11)$$

onde f_s é a frequência de amostragem.

Alguns estudos de EIM já utilizam técnicas no domínio do tempo, como é o caso de Sanchez et al. (2014), Coutinho et al. (2015) e Jotta et al., (2017), visando justamente obter respostas mais rápidas, compatíveis ao tempo das variações de impedância do tecido muscular.

2.3.3.3 Arranjo de Eletrodos

Os sistemas de bioimpedância em geral utilizam arranjos de eletrodos bipolar ou tetrapolar, cada um com suas vantagens e suas limitações. O arranjo tetrapolar, por exemplo, tem a vantagem de não sofrer influência da impedância dos eletrodos. Contudo, por ser um sistema multiportas (excita numa porta e mede-se em outra porta), o sistema não mede a impedância propriamente dita e sim uma transimpedância (BROWN; WILSON; BERTEMES-FILHO, 2000). Por medir uma transimpedância, a diferença de potencial entre dois pontos quaisquer passa a ser dependente não apenas das características elétricas do volume condutor, mas também do posicionamento dos eletrodos de corrente (GRIMNES; MARTINSEN; JOHNSEN, 2010).

O arranjo bipolar é capaz de medir a impedância de um volume condutor, pois excita e mede na mesma porta. Porém, neste caso, a impedância de eletrodos influencia diretamente na medida do sistema, a menos que a impedância do volume condutor seja muito mais alta que a impedância dos eletrodos. Para minimizar os efeitos da impedância de eletrodos costuma-se aumentar a área dos eletrodos de medição.

As Figura 25 e Figura 26 ilustram como, ao medir a diferença de potencial em um mesmo local, utilizando dois arranjos de eletrodos diferentes, obtém-se resultados diferentes. As figuras apresentam o mesmo volume condutor de 15 cm de altura e 80 cm de comprimento. O volume está dividido em três camadas puramente resistivas, com condutâncias de 1 mS/m, 100 mS/m e 200 mS/m, sendo estas condutâncias referentes aos tecidos epitelial, adiposo e muscular retirados do trabalho de Gabriel et al. (2009), e eletrodos de captação de tensão na mesma posição. Na Figura 25 tem-se o arranjo tetrapolar com os eletrodos de corrente externos aos eletrodos de captação de tensão e com 70 cm entre eles. Na Figura 26 os eletrodos de captação de tensão também são utilizados como eletrodos de corrente, com 20 cm entre eles. A diferença de potencial registrada com o arranjo tetrapolar é muito menor que a registrada com o arranjo bipolar (0,015 V e 1,6 V). Essa grande diferença deve-se principalmente a distribuição dos vetores de densidade de corrente, que são diferentes nas duas situações.

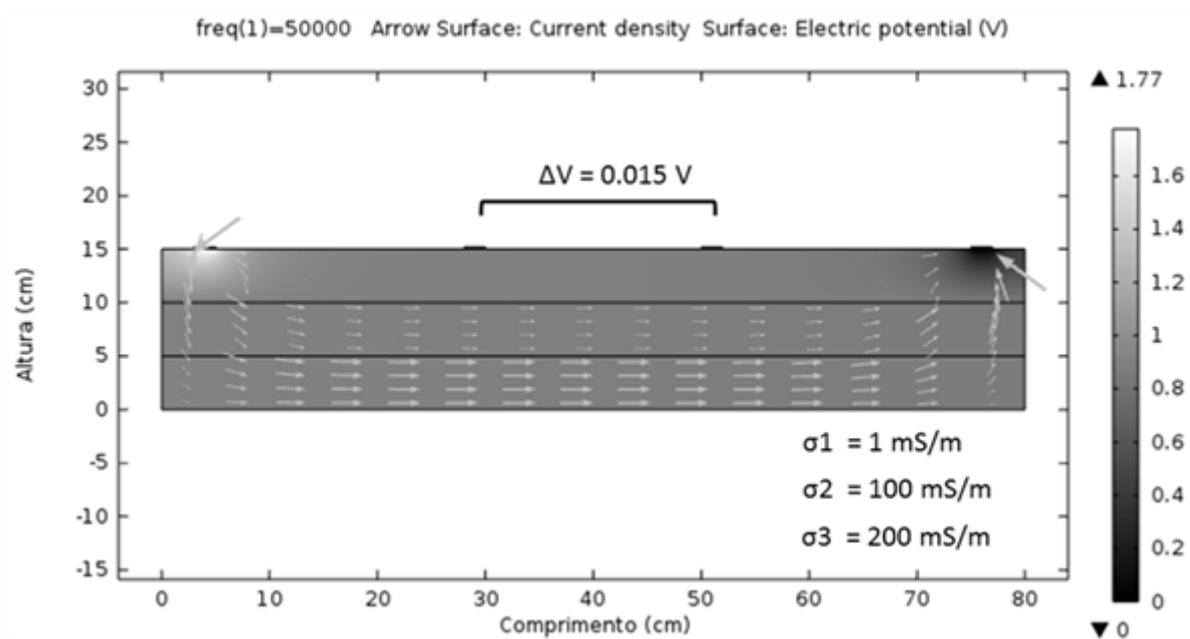


Figura 25. Modelo de elementos finitos de um volume condutor com 15 cm de altura e 80 cm de comprimento, dividido em três camadas puramente resistivas com condutância diferentes, σ_1 , σ_2 e σ_3 de cima para baixo, submetido a uma avaliação de impedância tetrapolar. As setas indicam a direção, sentido, distribuição e magnitude da densidade de corrente.

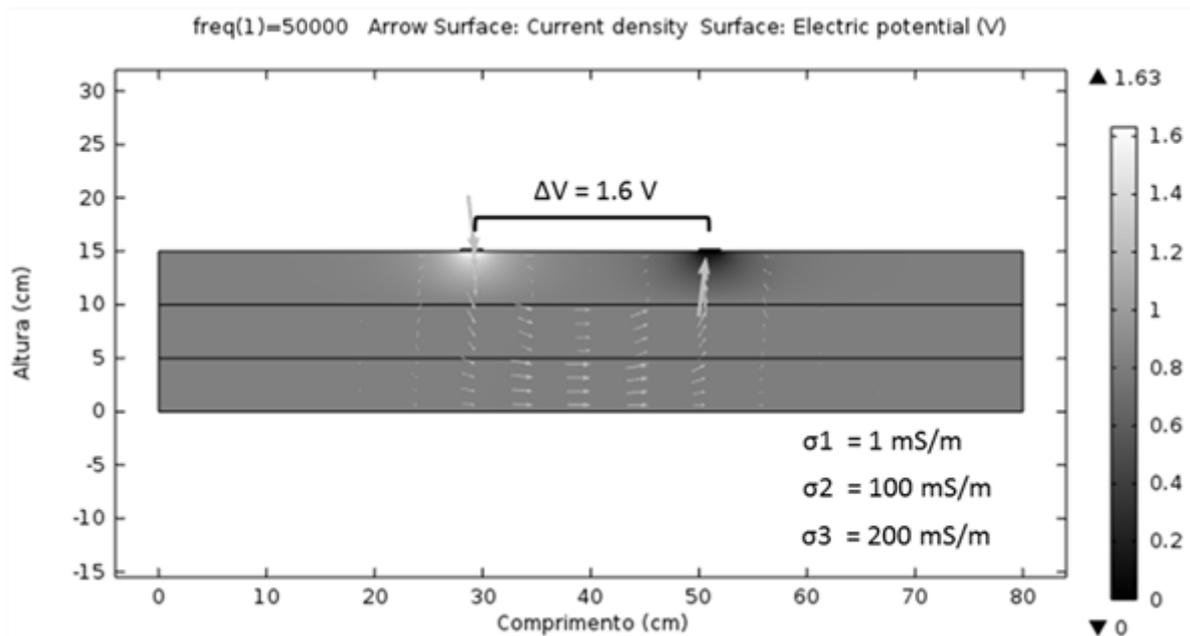


Figura 26. Modelo de elementos finitos de um volume condutor com 15 cm de altura e 80 cm de comprimento, dividido em três camadas puramente resistivas com condutância diferentes, σ_1 , σ_2 e σ_3 de cima para baixo, submetido a uma avaliação de impedância bipolar. As setas indicam a direção, sentido, distribuição e magnitude da densidade de corrente.

Na técnica EIM, o arranjo de eletrodos tetrapolar também é o mais comum. Existem basicamente duas maneiras de se posicionar os eletrodos no arranjo tetrapolar; o *linear EIM* e o *near-current electrode* (SHIFFMAN, 2013). A primeira consiste em colocar os eletrodos de corrente distantes com relação ao ponto de interesse, normalmente nas mãos ou nos pés, e o conjunto de eletrodos de captação de tensão ao redor da região de interesse. Na segunda maneira a grande diferença é o posicionamento dos eletrodos de corrente, que neste caso ficam mais próximos da musculatura estudada.

Estas diferenças no posicionamento dos eletrodos de corrente podem gerar diferenças na distribuição das linhas de correntes (GRIMNES; MARTINSEN, 2008). No arranjo *linear EIM*, por exemplo, a grande distância dos eletrodos de correntes permite uma distribuição paralela dos vetores de densidade de corrente, em relação ao volume condutor, durante grande parte do caminho percorrido pela corrente. Como observado na Figura 27, que simula o *linear EIM*, além de se distribuírem paralelamente, grande parte da corrente aplicada permeia o meio mais condutivo. Na Figura 28, que simula o *near-current electrode*, nota-se que apenas uma parte dos vetores de densidade de corrente se encontra paralela entre si e também é visto que a corrente procura o meio mais condutivo. Comparando os dois casos, no linear EIM grande parte da resposta do sistema seria influenciada pela camada mais condutiva, e no *near-current electrode* a resposta sofre uma maior influência das outras camadas. Sendo assim, medir a diferença de

potencial entre os mesmos pontos nos dois casos (Figura 27 e Figura 28), resultam em valores diferentes.

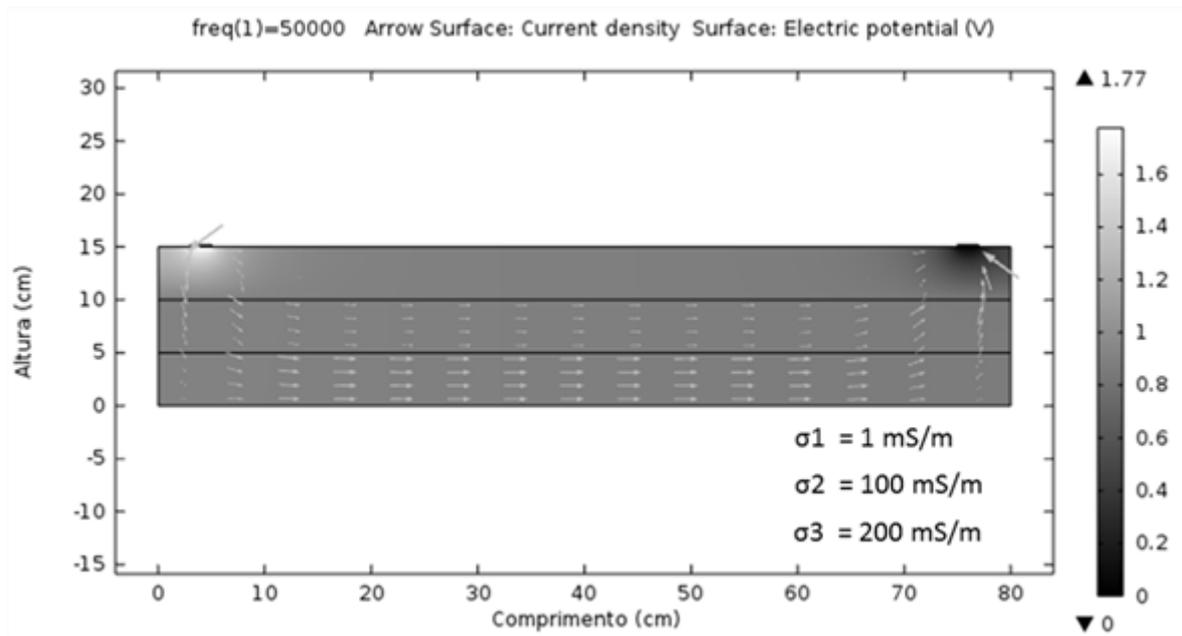


Figura 27. Modelo de elementos finitos de um volume condutor com 15 cm de altura e 80 cm de comprimento, dividido em três camadas puramente resistivas com condutância diferentes, σ_1 , σ_2 e σ_3 de cima para baixo. As setas indicam a direção, sentido, distribuição e magnitude da densidade de corrente.

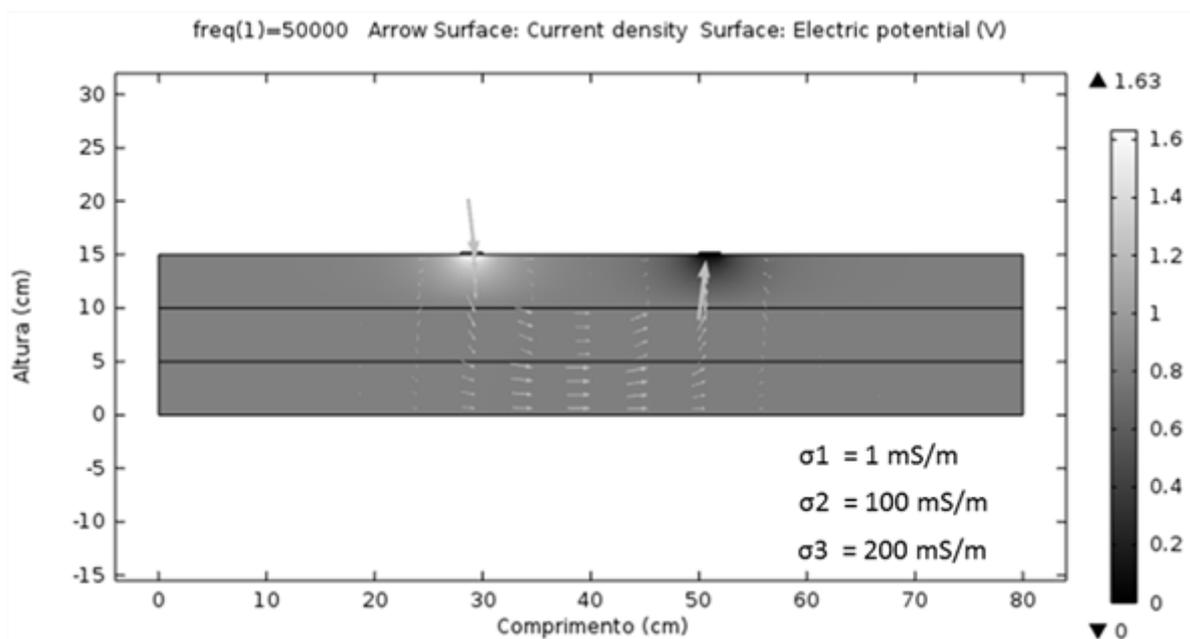


Figura 28 Modelo de elementos finitos de um volume condutor com 15 cm de altura e 80 cm de comprimento, dividido em três camadas puramente resistivas com condutância diferentes, σ_1 , σ_2 e σ_3 de cima para baixo. As setas indicam a direção, sentido, distribuição e magnitude da densidade de corrente.

2.4 Eletroestimulação Neuromuscular

A eletroestimulação neuromuscular (do Inglês, *neuromuscular electrical stimulation - NMES*) consiste na aplicação de estímulos elétricos externos ao organismo, a fim de gerar uma contração muscular. Esta foi desenvolvida no âmbito terapêutico principalmente para recuperação de indivíduos com lesões medulares ou neuromusculares que geram deficiência funcional no movimento. Posteriormente a NMES também passou a ser estudada e associada a exercícios de força, onde foi visto que a eletroestimulação também pode, além de permitir um determinado movimento, gerar ganhos de força e adaptações neuromusculares (KITCHEN; BAZIN, 2001).

Hoje em dia existe uma ampla gama de trabalhos (MUNKVIK et al., 2009; MRÓWCZYŃSKI et al., 2011; ATHERTON et al., 2005; SANCHEZ et al., 2014) que utilizam a eletroestimulação em modelos animais como forma de mimetizar diversos tipos de treinamento ou atividades musculares aplicáveis em humanos, uma vez que em humanos os treinos podem ser controlados por meio de estratégias como, comando verbal, *feedback* visual, entre outros. Tal situação não é viável em animais de experimentação, e a eletroestimulação permite programar treinos controlados a fim de gerar determinadas adaptações agudas ou crônicas, no músculo, em resposta a um determinado tipo de treinamento.

2.4.1 Parâmetros de Estimulação

Alguns parâmetros são de extrema importância para controlar um estímulo elétrico capaz de gerar uma contração. A forma de onda, a amplitude, a frequência e o tempo de duração da onda são os principais parâmetros controlados em estimuladores elétricos.

As formas de onda mais comuns podem ser pulsos, retangulares ou triangulares (Figura 29a), ondas simétricas (Figura 29b) e ondas assimétricas (Figura 29c). E cada uma dessas formas de onda possui uma duração previamente determinada. A duração do pulso (d_p) ou da onda é o tempo total entre o início e o final de um único pulso ou onda, no caso da onda também pode ser chamada de período (T). A Figura 30 ilustra o período de uma onda senoidal e a duração de um pulso, assim como a amplitude do sinal de estimulação. Geralmente, nos trabalhos com ratos ou camundongos, os estímulos são pulsos retangulares e suas durações não passam de 1 ms.

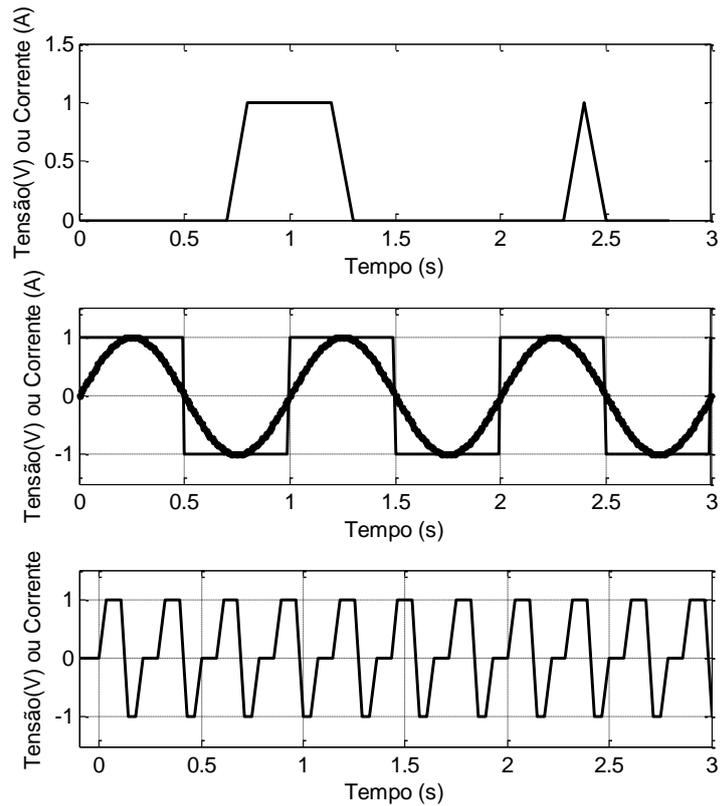


Figura 29. Pulsos e formas de onda usados na estimulação neuromuscular. A) Pulsos quadrado e triangular. B) Formas de onda simétricas. C) Formas de onda assimétricas.

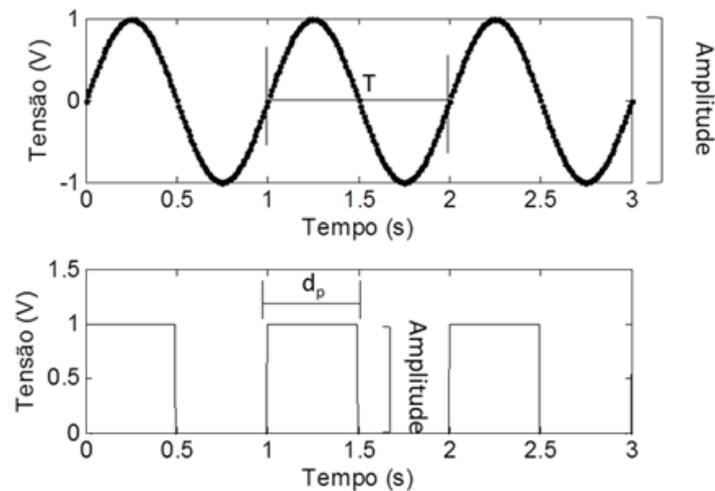


Figura 30 Onda senoidal (acima) e Pulsos (abaixo). T - período da onda, d_p - duração do pulso de estimulação.

A amplitude também pode ser entendida como a magnitude da estimulação e possui uma relação diretamente proporcional com a força produzida pelo músculo. O estímulo elétrico pode ser por corrente ou tensão. Trabalhos com modelo animal, utilizando ratos, costumam utilizar o estímulo por tensão, e as amplitudes utilizadas variam bastante, podendo chegar a 50 V em

casos de estimulação por campo elétrico em músculos isolados (ATHERTON et al., 2005). Eletroestimulações realizadas diretamente no músculo utilizam amplitudes muito menores e próximas de 1V.

A frequência de estimulação representa o número de estímulos gerados pelo eletroestimulador no período de 1 s. A frequência, assim como a amplitude, também possui uma relação diretamente proporcional com a produção de força do músculo. Trabalhos com ratos dificilmente utilizam frequências acima de 100 Hz, uma vez que as frequências maiores que 100 Hz não apresentam aumento significativo da força produzida pelo músculo (MRÓWCZYŃSKI et al., 2011). Além disso, os estímulos podem aplicar as frequências continuamente ou com intervalos. Quando há intervalos, denomina-se os estímulos elétricos de trem de pulsos, sendo que os trens de pulsos também são periódicos, ou seja, possuem uma frequência. A Figura 31 exemplifica uma estimulação via trem de pulsos e um estímulo contínuo. Nota-se na figura que a soma do tempo de duração do trem mais o tempo necessário para que um novo trem comece é denominado o período do trem de pulsos ou T_t , sendo que, o recíproco do T_t é a frequência do trem de pulsos (f_t). No caso da figura, $d_t = 1s$, $T_t = 2s$ e $f_t = 0,5 Hz$. Na parte de baixo da Figura 31, podemos ver um exemplo de estímulo contínuo com duração de 4 s, onde as variáveis controladas foram a duração do pulso (dp) e a frequência da estimulação (f), sendo $dp = 0,1$ e $f = 5 Hz$

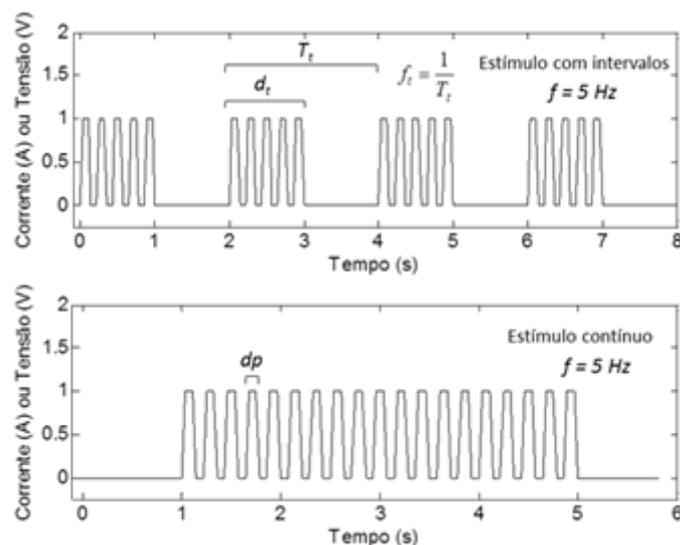


Figura 31. Exemplo de eletroestimulação contínua e com intervalos. T_t - Período do trem de pulsos, d_t - duração do trem de pulsos, dp - duração do pulso, f_t - frequência do trem de pulsos e f - frequência dos pulsos.

O controle desses quatro parâmetros permite aos pesquisadores criar programas de treinamento controlados que mimetizam diversas situações análogas às atividades físicas realizadas pelos seres humanos. Ou seja, permite a realização de treinamentos em modelo

animal, controlando tempo e a intensidade de treinamento que não são possíveis de realizar por meio de comando verbal como feito com os humanos.

3 Revisão de literatura

3.1 Bioimpedância e atividade física

A avaliação de parâmetros ligados à atividade física, como limiar ventilatório, limiar de lactato, fadiga muscular localizada, dentre outros, são realizados em ambientes clínicos especializados por meio da utilização equipamentos de alto custo (FAUDE; KINDERMANN; MEYER, 2012). A técnica de bioimpedância tem se mostrado uma alternativa viável devido ao seu baixo custo, inclusive, já existindo aparelhos comerciais, portáteis para medir impedância elétrica muscular segmental, e a literatura tem reportado sobre a associação de parâmetros obtidos com a bioimpedância com indicadores relacionados à atividade física. Ikai e colegas (2007) e Coutinho et al. (2015), por exemplo, procuram estabelecer uma associação da variação de bioimpedância com fadiga muscular localizada. Ambos registram queda na impedância do músculo com o decorrer do tempo de atividade; ainda que o tipo de contração tenha sido diferente, isotônica no estudo de Ikai e colegas (2007) e isométrica no trabalho de Coutinho et al. (2015). Coutinho et al. (2015) ainda compararam os dados de impedância com dados de força e encontraram indícios de que a resistência elétrica do músculo identifica a fadiga antes da identificação pelos dados de força, ou seja, reduções de força musculares podem estar associadas com mudanças prévias de resistividade do músculo.

Alvarenga (2008) e Jotta et al., (2017) utilizaram os resultados de impedância a fim de associar mudanças de resistividade muscular com Limiar Anaeróbico (LA). O primeiro trabalho comparou resultados de parâmetros de impedância com dados de concentração de lactato sanguíneo (Lac). O estudo foi feito em cicloergômetro com aumento incremental de carga até a 180 W, sendo identificada uma redução em dois parâmetros (R_e e R_{inf}) na potência associada ao limiar de lactato (LL), potência ao redor de 120 W no estudo (Figura 32), e consequentemente associada ao LA.

Carga (W)	Média(mmo/l)	±DP
Repouso	1,96	0,33
60	2,60	0,46
90	3,92	0,65
120	4,92	0,84
150	6,53	1,14
180	9,54	1,02

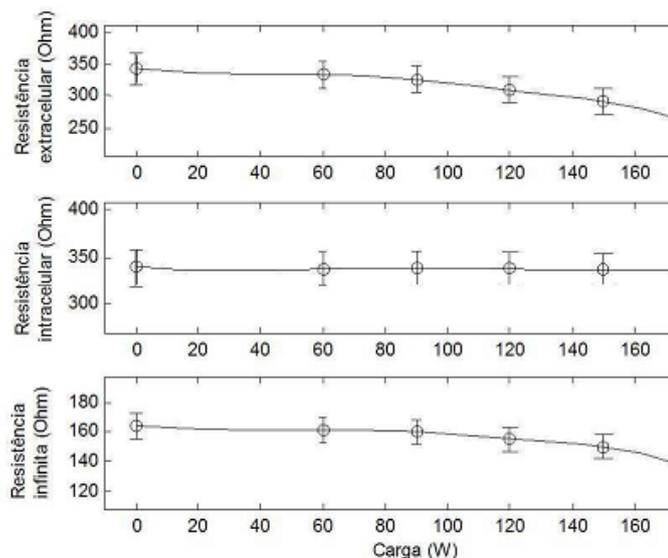


Figura 32. Tabela de Lac para cada potência do cicloergômetro e o comportamento das Resistências (intracelular, extracelular e infinita) em cada uma das potências (ALVARENGA, 2008).

Jotta et al., (2017) utilizaram o limiar de lactato (LL) durante exercício com aumento incremental de intensidade em remoergômetro como método de detecção de LA. Os autores utilizaram um modelo de 5 elementos, utilizando a segunda derivada relativa dos parâmetros do modelo a fim de elencar o elemento que apresentava cinética relativa mais homogênea durante a progressão do esforço. Num segundo momento, o valor da potência associada ao momento de cruzamento pelo zero da derivada mencionada foi elencada como estimativa do LL através de bioimpedância elétrica. Esses resultados foram comparados a um método tradicionalmente usado e aceito para determinação do LL, mostrando-se concordante e correlacionado, apresentando coeficiente de correlação linear de 0,85 com as estimativas obtidas por bioimpedância elétrica.

Apesar dos bons resultados, esses trabalhos de Alvarenga (2008) e Jotta et al. (2017) procuraram investigar respostas sistêmicas (como o LA) realizando, em seus experimentos, medidas segmentais. Diferente dos dois primeiros trabalhos citados (IKAI et al., 2007; COUTINHO et al., 2015) que utilizaram medidas de bioimpedância segmentar, e procuraram investigar os processos de fadiga local, no músculo onde foram realizadas as medições.

Mesmo assim os trabalhos indicam que controlar o comportamento elétrico dinâmico de um músculo, pode ser suficiente para identificação de respostas sistêmicas como o LA. Também não se pode dizer que os resultados da literatura, até o momento, são conclusivos em relação à associação do sinal de bioimpedância com fadiga muscular e/ou LA, apenas que a técnica parece ser sensível às mudanças elétricas do músculo que tais situações provocam. Portanto, necessitando de estudos mais aprofundados. Sendo assim, a técnica de EIM dinâmica, definida

por Shiffman et al. (2003), apresenta-se com potencial para identificação de respostas locais e sistêmicas associadas a atividade física.

3.2 EIM

A EIM surgiu como uma técnica alternativa de baixo custo que visa avaliar quantitativamente a sanidade muscular (RUTKOVE et al., 2008), e por conta disso, a maioria dos trabalhos são voltados para a área clínica e comparam um músculo sadio com um músculo portador de alguma miopatia, disfunção ou inflamação; como, por exemplo, esclerose lateral amiotrófica (ESPER et al, 2006), radiculopatias (RUTKOVE et al, 2005), dores na região lombar (CHING et al, 2013), distrofia em crianças (RUTKOVE; DARRAS, 2013) e em idosos (AARON et al., 2006).

A quantidade de estudos que buscam associar os resultados da EIM com aspectos da contração muscular em músculos sadios são mais escassos (SANCHEZ et al., 2014), fazendo com que diversas questões relevantes para o aprimoramento da técnica ainda precisem ser avaliadas. Além disso, mesmo os trabalhos que avaliam músculos sadios, têm como objetivo principal comparar a funcionalidade deste com um músculo não saudável (SHIFFMAN et al., 2003, SANCHEZ et al., 2014, LI et al., 2016). Estes trabalhos procuram discutir essas diferenças dos valores de impedância (entre um músculo sadio e um não saído), principalmente, em relação aos níveis de força muscular produzidos por ambos e, portanto, as explicações sobre porque um aumento ou redução de impedância ocorrem de forma superficial. Contudo, por ser sensível tanto a mudanças dimensionais como a mudanças de impeditividade de um volume condutor esta técnica possui um potencial para investigação dos processos de contração muscular, que provocam ambas as mudanças (dimensionais e impeditivas).

3.3 EIM Dinâmica

O estudo de Shiffman et al. (2003) foi um dos primeiros a investigar a técnica de EIM durante a contração muscular. Os autores sugerem o nome de EIM dinâmica para os estudos da EIM realizados durante o processo de contração muscular. A razão para tal sugestão de nomenclatura reside no fato da grande parte dos estudos realizarem medidas com o músculo em repouso, ou seja, em condições estáticas. No citado trabalho, os autores realizam medidas contínuas em tempo real, iniciadas com os músculos flexores do punho e dos dedos em repouso, seguindo-se de contração e posteriormente retorno ao repouso; gerando as características dinâmicas da EIM (Figura 33).

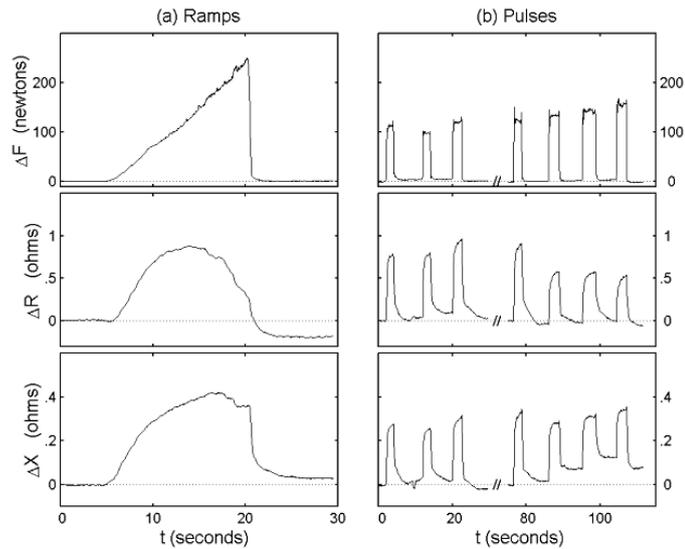


Figura 33 Variações de força, resistência e reatância, da parte dorsal do antebraço, em função do tempo em ambos os testes. (SHIFFMAN; AARON; RUTKOVE, 2003).

Até o presente momento poucos estudos abordaram a EIM dinâmica em seus trabalhos; destacando-se os estudos de Rutkove (2009), Figura 34, e Sanchez et al. (2014), Figura 35. Shiffman et al. (2003) e Rutkove (2009) realizaram medidas em humanos, enquanto Sanchez et al. (2014) realizaram testes em camundongos com contrações geradas por meio de eletroestimulação.

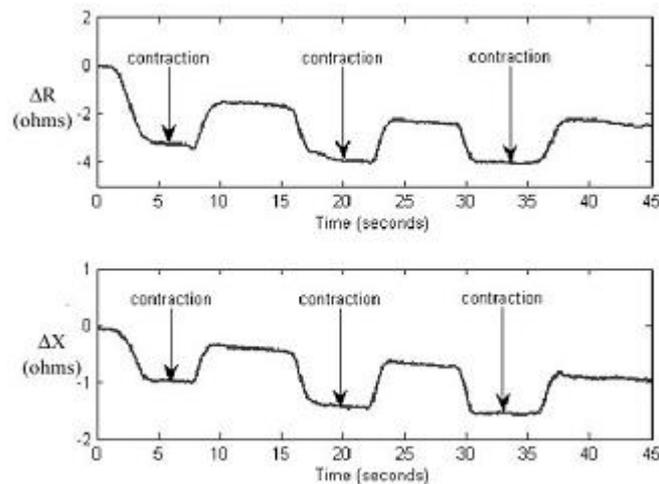


Figura 34. Variação de resistência (acima) e reatância (abaixo) do bíceps conforme contração muscular. Delta R: variação de resistência; Delta X: variação de reatância.(RUTKOVE, 2009)

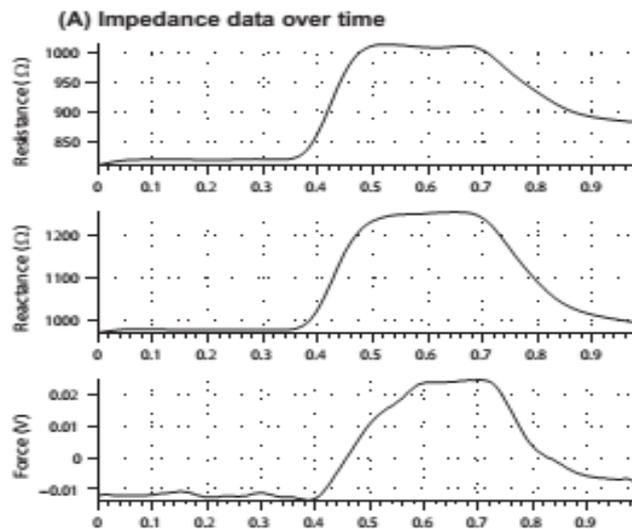


Figura 35. Dados de impedância variando de acordo com a força muscular. Estudo realizado no músculo gastrocnêmio de camundongos (SANCHEZ et al., 2014).

Nota-se nos trabalhos citados que as respostas de impedância à contração muscular não apresentam o mesmo comportamento. A contração muscular provocou diferentes alterações de bioimpedância em cada estudo, sendo que em dois deles houve aumento de resistência e reatância e um estudo registrou redução dos mesmos parâmetros. Contudo, a comparação direta desses resultados é complexa. Cada estudo avaliou um músculo diferente (flexores de punho, bíceps e gastrocnêmio de ratos), utilizou protocolos experimentais diferentes, em seres vivos diferentes e com instrumentações diferentes. Sendo assim, apesar dos resultados serem diferentes não podemos falar que um ou outro resultado está errado, tão pouco que existe um padrão. A grande diferença de metodologia entre os trabalhos nos leva a falta de conclusões sobre o padrão de alteração esperado devido à contração muscular. Cabe então a cada pesquisador avaliar o que esperar do seu próprio protocolo experimental e se a resposta obtida é coerente.

3.4 Fatores de variação do sinal de EIM

3.4.1 Fatores biológicos

Segundo a literatura (SHIFFMAN et al., 2003; RUTKOVE, 2009), as variações de impedância elétrica do músculo durante uma contração ocorrem devido a dois aspectos principais: as variações de morfologia e de fisiologia do músculo, as quais ocorrem, na maioria das vezes, concomitantemente durante uma contração. As mudanças de morfologia dizem respeito a qualquer modificação estrutural do músculo avaliado, tais como: comprimento, área de secção transversa e volume. As variações fisiológicas se referem a mudanças na impeditividade (ou

admitividade) do músculo, que ocorrem devido aos processos bioquímicos da contração muscular.

A aplicação da EIM para investigar a contração muscular, está sendo estudada por mais de uma década, mas ainda não está claro como os aspectos anteriormente mencionados influenciam os valores da impedância elétrica do músculo. Este fato ocorre provavelmente porque as mudanças de morfologia e de fisiologia ocorrerem simultaneamente e os estudos apresentam algumas contradições. Por exemplo, o estudo de Zagar e Krizaj (2008) e Rutkove (2009) relatam que as ligeiras alterações da bioimpedância elétrica estão associadas com alterações morfológicas, enquanto um outro (SHIFFMAN; AARON; RUTKOVE, 2003) indica que as alterações de bioimpedância são, principalmente, devidas às alterações na resistividade do músculo. Shiffman et al. (2003) levantaram esta hipótese porque verificaram que as alterações de resistência e reatância ocorreram momentos antes das alterações de força, quando a morfologia músculo ainda não havia sido alterada. As variações de impedância dos trabalhos de Rutkove (2009) e Shiffman et al. (2003) já foram apresentados anteriormente na Figura 34 e na Figura 33; os resultados de Zagar e Krizaj (2008) se encontram na Figura 36.

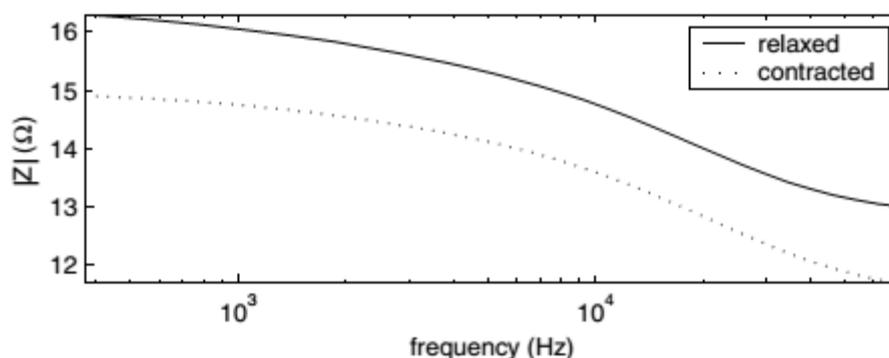


Figura 36. Valores do módulo da impedância do bíceps braquial, com frequências variando de 300 Hz a 75 kHz (ZAGAR; KRIZAJ, 2008).

Outra questão importante no estudo da EIM é a influência da anisotropia do músculo nos resultados da EIM. No corpo humano, grande parte dos músculos são penados, ou seja, as fibras musculares estão arranjadas na mesma direção dentro do músculo, porém essa direção não é a mesma direção na qual o músculo sofre um encurtamento. Os músculos fusiformes (por exemplo, o bíceps braquial e o tibial anterior) são exceções deste caso. Estes possuem as fibras alinhadas na mesma direção de encurtamento do músculo. Essas diferenças de alinhamento de fibras também causam influências nas medidas de bioimpedância e é, portanto, um fator que deve ser considerado ao se realizar um estudo de EIM.

Então, devido à anisotropia, os resultados de EIM podem variar em um mesmo músculo somente mudando o ângulo de posicionamento dos eletrodos. Alguns trabalhos (SANCHEZ et

al., 2014; CHIN et al., 2008; RUTKOVE, 2009) discutem essas diferenças e mostram que, por exemplo, uma medida realizada com os eletrodos posicionados transversalmente às fibras do músculo aumentam os valores basais medidos de bioimpedância. De fato, posicionar os eletrodos transversalmente às fibras musculares faz com que uma corrente de excitação permeie um maior número de fibras, assim, podendo explicar o aumento dos valores. Pode ser também que medir um maior número de fibras potencialize as alterações de impedância provocadas pela contração. A Figura 37 ilustra o posicionamento dos eletrodos, na mesma direção das fibras e com 90° de rotação, em um músculo fusiforme.



Figura 37. Arranjo de eletrodos (cinza) posicionados longitudinalmente as fibras musculares (esquerda) e transversalmente as fibras musculares (direita) (Rutkove 2009).

Por último, é importante ressaltar que as medidas de EIM nunca são um resultado referente somente ao tecido muscular analisado, principalmente quando se mede a EIM em humanos. As medições de EIM feitas em seres humanos utilizam dois ou mais eletrodos posicionados na superfície da pele. Assim, além da bioimpedância do músculo propriamente dito, os resultados de EIM são afetados por fatores como a interface eletrodo-pele, as camadas de pele e gordura, pelo tecido conjuntivo, fluxo sanguíneo, entre outros (JAFARPOOR et al., 2013). Então, pode-se dizer que ao realizar uma medida de EIM posicionando os eletrodos na superfície de um segmento do corpo, a medida é resultado da impedância de um conjunto de tecidos (epitelial, adiposo, sanguíneo, conjuntivo, muscular). Assim, explicitar como cada um destes tecidos pode interferir na propagação da corrente elétrica dentro do músculo e, conseqüentemente, sobre os resultados da EIM, ainda é um desafio de pesquisa. Neste ponto, a utilização de modelos animais vem surgindo como uma alternativa para minimizar as influências de tecidos adjacentes e ressaltar as características elétricas do tecido muscular.

3.4.2 Instrumentação

A literatura relata dois principais problemas instrumentais que podem influenciar diretamente nos resultados de EIM: o arranjo de eletrodos e a técnica de medida.

Duas principais configurações de eletrodos são utilizadas para medir bioimpedância, a bipolar e a tetrapolar. A bipolar tem como principal fonte de erro a influência da impedância da interface eletrodo-tecido, mas quanto maior a área do eletrodo menor será essa influência.

Alguns trabalhos já utilizaram o arranjo bipolar para medir EIM (JOTTA et al., 2012; COUTINHO et al., 2015; JOTTA et al., 2017) utilizando eletrodos com área de 5 cm² para minimizar o efeito da impedância de eletrodos. Portanto, se o volume condutor for pequeno, como os usados em modelos animais de pequeno porte, este arranjo não é o mais recomendado, pois são utilizados eletrodos com dimensões pequenas, aumentando a influência da impedância de eletrodos na medida.

Como já mencionado, o sistema tetrapolar tem sido o mais utilizado, uma vez que em teoria é imune às influências da interface eletrodo-tecido. Porém, por ser uma configuração multiportas (excita numa porta e mede em outra), não mede impedância e sim transimpedância (BROWN; WILSON; BERTEMES-FILHO, 2000). No entanto, são os mais indicados para se medir volumes condutores pequenos com eletrodos de dimensão reduzida, uma vez que a impedância dos eletrodos não influencia diretamente na medida. Apesar disso, a configuração tetrapolar de eletrodos também possui suas fontes de erro e a uma delas é a influência nos resultados da distância entre os eletrodos de corrente e tensão. GRIMNES et al. (2010) mostraram que conforme essas distâncias aumentam, as medidas de tensão, num mesmo ponto do volume condutor, tendem a cair e, conseqüentemente a reduz o valor de impedância medido. (Figura 38). Outro problema são as zonas de sensibilidade negativas nos volumes condutores de multicamadas (GRIMNES; MARTINSEN, 2007), como é o caso de um músculo real avaliado pela EIM. A não homogeneidade dos volumes condutores biológicos e a pequena distância entre eletrodos, por ser uma medida segmental, propiciam uma dispersão não homogênea das linhas de densidade de corrente (GRIMNES; MARTINSEN, 2008). Assim, aumentos de impedância em um volume condutor podem provocar a redução do valor medido, sendo que o contrário também é verdadeiro.

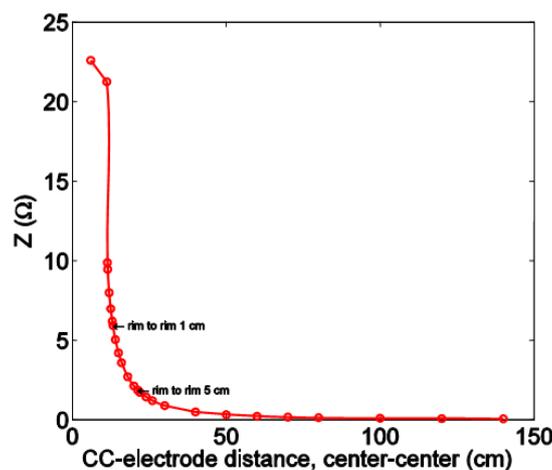


Figura 38. Valores de impedância em função da distância dos eletrodos de corrente para os eletrodos de tensão (GRIMNES; MARTINSEN; JOHNSEN, 2010).

As diferentes técnicas de medições utilizadas nos trabalhos também podem influenciar os resultados. A escolha da técnica de medição de EIM para um determinado estudo pode estar diretamente ligado ao sucesso ou insucesso do mesmo. Características de medidas como riqueza de informações, velocidade de resposta, relação sinal/ruído, dentre outras, variam de acordo com a técnica utilizada e por isso, é importante fazer uma avaliação prévia das técnicas para escolher a que mais se adequa ao objetivo do estudo.

Primeiramente, medidas de EIM utilizando equipamentos multifrequenciais, por varredura senóides, possuem uma resolução temporal limitada, não sendo aconselhável para avaliar volumes condutores que alterem sua impedância rapidamente. Grande parte dos trabalhos de EIM utilizam este tipo de equipamento, contudo esta técnica é mais utilizada em estudos que avaliam a EIM estática e, portanto, não sendo recomendável para medir a EIM dinâmica.

Uma solução para medidas dinâmica pode ser a utilização de instrumentação monofrequencial, como a utilizada por Shiffman et al. (2003). Normalmente a frequência utilizada é a de 50 kHz, uma vez que é em torno dela que se encontra a frequência característica no tecido biológico de humanos. No entanto, este método ainda exige processamento *offline*, porque a resposta analógica do sistema é uma senóide de tensão e apenas através de cálculos pós-medição, estima-se a parte real, parte imaginária, módulo e fase da resposta do sistema. Mesmo com os cálculos pós-medições, este método é consideravelmente mais rápido que o método multifrequencial, sendo mais indicado para medições dinâmicas. Contudo, se a resposta analógica do sistema já fosse uma informação de interesse (módulo, por exemplo), este método poderia ser ainda mais rápido. Neste caso seria necessário um processamento a nível de *hardware* a fim de obter analogicamente a saída desejada.

Min et al. (2008) afirma que para identificar alterações rápidas de impedância de um determinado volume condutor, técnicas de medidas no domínio do tempo são mais indicadas. Contudo, técnicas no domínio do tempo precisam de digitalização e de processamento da resposta medida para obtenção da informação de bioimpedância (BARSOUKOV; MACDONALD, 2005). Apesar de atualmente ser possível realizar-se coleta dos sinais envolvidos com alta taxa de aquisição, permitindo uma razoável resolução temporal da resposta final da bioimpedância, técnicas no domínio do tempo demandam mais tempo, a nível de *software*, para processamento da resposta e obtenção de uma relação sinal ruído que se aproxime das obtidas com técnicas no domínio da frequência (MIN et al., 2008).

Analisando a literatura, duas técnicas no domínio do tempo têm sido mais aplicadas em estudos de EIM. A BIS-STEP, utilizada no trabalho de Coutinho et al. (2015), por exemplo, consiste na resposta de corrente do sistema biológico a uma excitação causada por um degrau

de tensão (NEVES; SOUZA, 2000). Apesar da técnica realizar medidas em altas taxas de aquisição do sinal de corrente (resposta do sistema), isso não é suficiente para uma análise mais detalhada do comportamento da bioimpedância. A resposta precisa ser associada há um modelo elétrico representativo do tecido biológico avaliado (como os apresentados nas Figura 15 e Figura 21) para obtenção de parâmetros de bioimpedância que ajudam a interpretação dos resultados. O processamento necessário para estimar os parâmetros de bioimpedância reduz consideravelmente a capacidade do sistema em avaliar mudanças de impedância muito rápidas no músculo. Uma saída para este problema seria processar todas as respostas ao final dos protocolos experimentais. Sanchez et al. (2014) utilizam a FRA (*Frequency Response Analyzer*) que consiste num estímulo banda larga de corrente e medição da resposta de tensão. Também através de processamento *offline*, corrente e tensão são levados para o domínio da frequência e então se obtêm a resposta em frequência da bioimpedância do sistema, pela razão [espectro de tensão] / [espectro de corrente]. Nota-se, em ambas as técnicas, que apesar das altas taxas de medições que esses sistemas permitem, os usuários não conseguem visualizar em tempo real a resposta final de bioimpedância. Ou seja, as técnicas medem as respostas rapidamente, porém os usuários não podem avaliar os resultados em tempo real.

3.5 Utilização de Modelo Animal

Algumas das influências citadas anteriormente, como interface eletrodo-pele, tecidos adjacentes, camadas de pele e gordura, podem ser evitadas se a medida de EIM for realizada diretamente no músculo. Nesta situação, a utilização de modelo animal (ratos ou camundongos) surge como a melhor opção. O número de estudos de EIM com modelo animal vem aumentando com o passar do tempo; mas tratando-se em sua maioria de estudos com uma perspectiva de aplicação em doenças neuromusculares (TARULLI et al., 2006, AHAD; RUTKOVE, 2009, WANG et al., 2011, LI et al., 2014; KAPPUR et al., 2018). Esta alternativa parece ser importante, uma vez que os modelos animais permitem a avaliação somente do tecido muscular, facilitando a interpretação dos resultados. No entanto, pensando numa contração muscular, animais não são capazes de controlar intensidade de contração por meio de estímulo verbal como humanos, e o controle da contração muscular é essencial para o desenvolvimento dos estudos.

Alguns trabalhos têm mostrado que é possível controlar a intensidade e o tempo de duração da contração muscular em animais através de eletroestimulação do nervo ciático; como no estudo de Delavar et al. (2014). Também utilizando esta técnica, o estudo de Sanchez et al. (2014) apresentou resultados da relação entre dados de bioimpedância e contração muscular (gerada por eletroestimulação) em camundongos (Figura 35), já apresentados anteriormente. Outro estudo (LI et al., 2016) realizou treinamento longitudinal, entre 12 e 14 dias, no músculo

gastrocnêmio de ratos Wistar saudáveis e com miopatia também por meio de eletroestimulação. A grande diferença desse estudo deve-se ao fato da eletroestimulação não ter sido feita no nervo e sim diretamente no músculo, porém as medidas foram realizadas pré e pós treinamento, nunca durante o treinamento. Ainda assim, a EIM teve alterações significativas devido às mudanças estruturais do músculo, principalmente a área de secção transversa, e a eletroestimulação mais uma vez foi uma ferramenta eficaz para o controle de tempo e intensidade da contração muscular.

3.6 Modelos FEM (Método de Elementos Finitos)

Um trabalho de Jafarpoor e colaboradores (2013) tentou investigar a influência de tecidos adjacentes e arranjos de eletrodos na medida de EIM criando simulações através do *software* COMSOL Multiphysics via Modelo de Elementos Finitos (*Finite Element Model* - FEM). Os autores sugerem diferentes posicionamentos dos eletrodos para melhorar a sensibilidade da EIM, sendo que cada posicionamento de eletrodo por eles sugerido faz uma característica diferente (geometria, resistividade e camada de gordura) governar a sensibilidade do sistema. A Figura 39 mostra a simulação da distribuição dos vetores de densidade de corrente em três diferentes posicionamentos de eletrodos de injeção na superfície do braço (região do ventre do músculo bíceps braquial). Nota-se o aumento da distribuição dos vetores de densidade de corrente pelo volume condutor conforme a distância entre os eletrodos aumenta. Assim, a corrente injetada, que foi a mesma nos três casos, permeia de maneira diferente cada tecido.

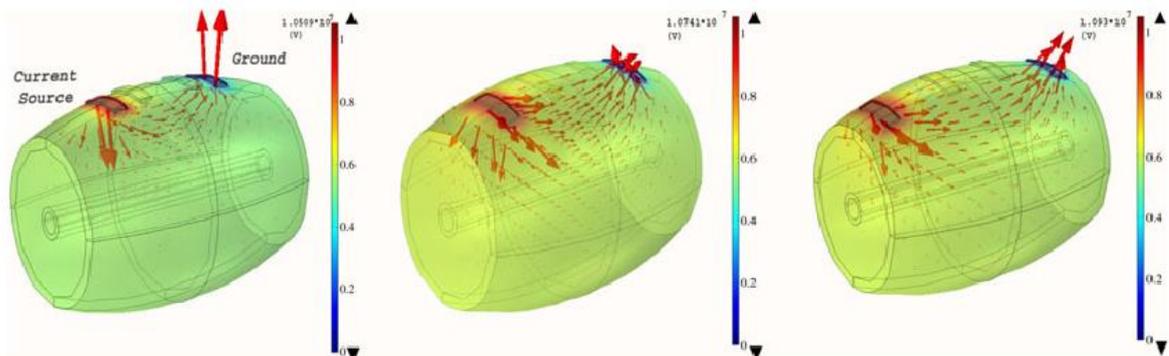


Figura 39. Distribuição dos vetores de densidade de corrente conforme a distância entre os eletrodos de injeção de corrente aumenta (JAFARPOOR et al., 2013).

Estas simulações podem ser uma ferramenta valiosa para se compreender melhor como fatores externos (eletrodos, camada de pele de gordura, o fluxo sanguíneo) e internos (seção transversal, fluidos intracelulares) influenciam a bioimpedância do músculo.

A utilização de modelos FEM ainda tem outras aplicações no estudo de bioimpedância, principalmente no que concerne aos eletrodos. Grimnes *et al.* (2010), mostraram que estimular

um volume condutor em diferentes lugares gera medidas diferentes de tensão em um mesmo local. Outro trabalho do mesmo grupo (Grimnes; Martinsen, 2007) discute as fontes de erro associadas ao arranjo de eletrodos tetrapolar. Mesmo não se tratando do estudo de bioimpedância de músculos, os trabalhos possuem grande relevância por avaliar técnicas de medidas que são utilizadas na EIM.

4 Materiais e Métodos

4.1 Amostra

Os experimentos foram realizados com ratos machos, da espécie Wistar, com massa corporal entre 250 g e 400 g e idade entre 2 e 4 meses. Na fase I do estudo foram utilizados 19 animais e 10 animais na fase II. Os animais foram expostos a ciclos de 12h de claro-escuro com alimentação *ad libitum*. Uma vez que os experimentos foram in vivo, para tal, os animais foram anestesiados com isoflurano 3% e posteriormente o músculo gastrocnêmio esquerdo do animal foi exposto por meio de procedimento cirúrgico. Após exposição do músculo, o tendão do gastrocnêmio foi fixado a um sensor de força por meio de um fino cordão inextensível de *nylon* e eletrodos de agulha foram fixados nas extremidades e no ventre do músculo com funções de estimular a contração muscular e captar o sinal de EIM. O protocolo experimental foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética de Pesquisas com Animais sob no número 019/15.

Importante informar que ao todo 36 animais foram testados no presente estudo. Contudo, devido a alguns problemas experimentais, alguns animais foram excluídos ou não puderam ter todos seus dados aproveitados. Por consequência a numeração dos animais, apresentada no capítulo de resultados (capítulo 5), é apresentada forma ordinal, contudo conservando a numeração original destinada para cada animal.

4.2 Instrumentação

A maioria dos equipamentos comerciais que medem impedância elétrica não são capazes de fornecer sinais contínuos, em tempo real, que representam as componentes reais e imaginárias de bioimpedância. Então, para viabilizar o desenho experimental planejado, os sistemas de impedância elétrica, de condicionamento do sinal da célula de carga e de eletroestimulação neuromuscular (NMES), foram projetados e desenvolvidos em nosso laboratório. Todos os dispositivos foram previamente caracterizados de acordo com a necessidade do estudo (os principais parâmetros serão mostrados no decorrer do capítulo).

As Figura 40 e Figura 41 mostram todo o aparato experimental onde se pode ver o tendão do gastrocnêmio fixado na célula de carga (para medição da força muscular) e os eletrodos (de eletroestimulação e de bioimpedância) já posicionados no músculo. A Figura 42 ilustra de forma esquemática o aparato experimental apresentado na Figura 41.

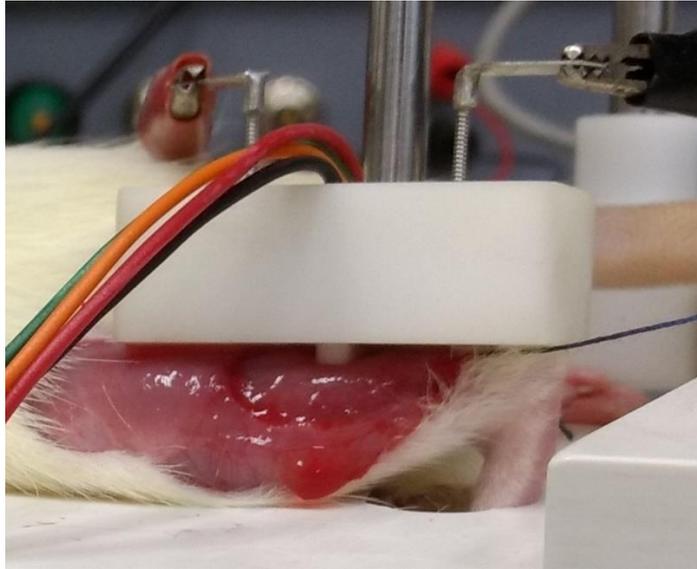


Figura 40. Imagem aproximada do posicionamento da peça com material isolante que contém os eletrodos de EIM e eletroestimulação.

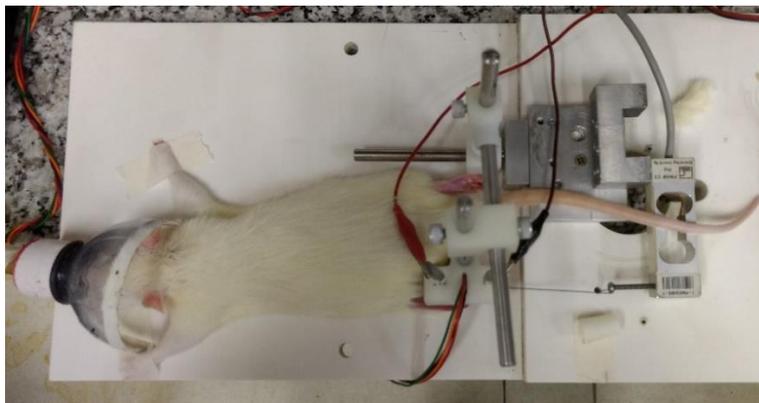
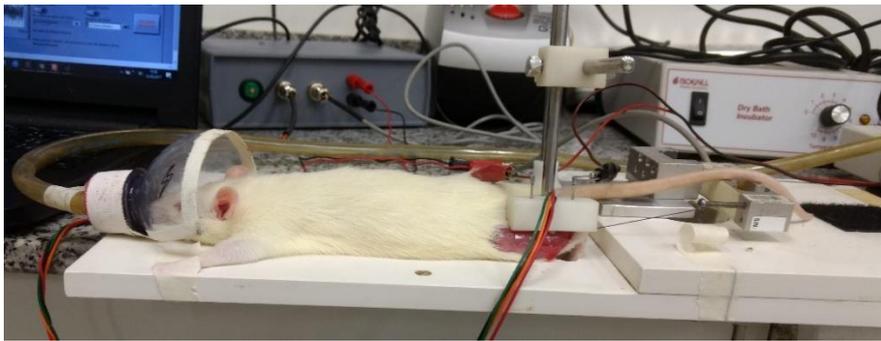


Figura 41. Aparato experimental onde vê-se o animal com o tendão do gastrocnêmio fixado a célula de carga e a peça isolante contendo os eletrodos (bioimpedância e eletroestimulação) posicionada sobre o ventre muscular.

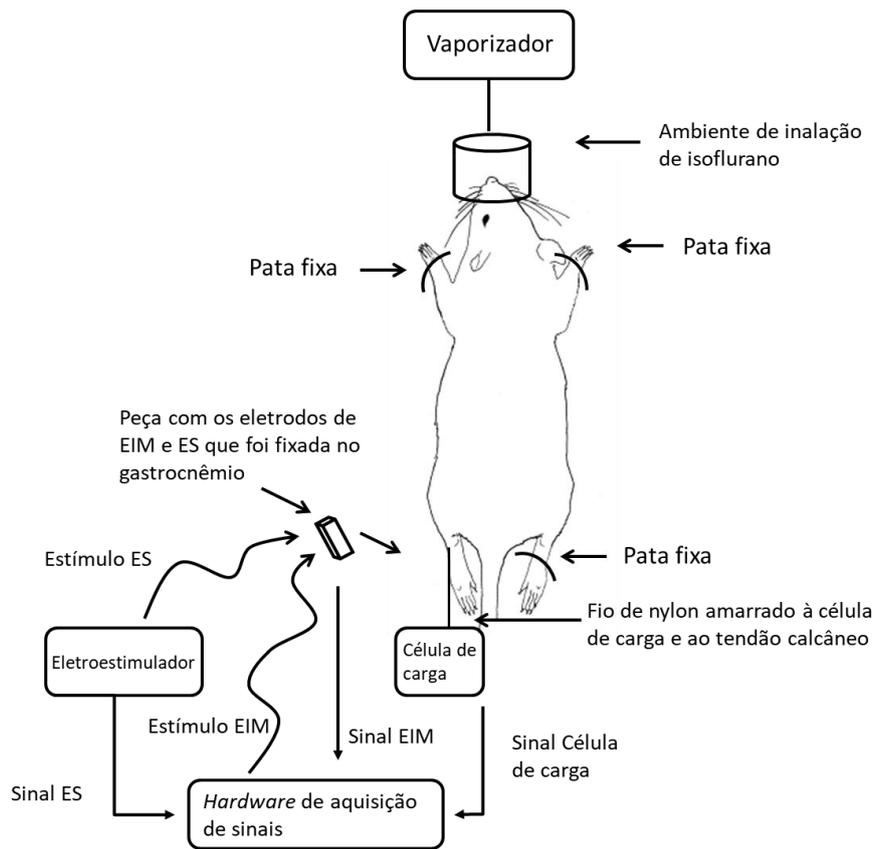


Figura 42. Desenho esquemático do aparato experimental.

4.2.1 Eletrodos

Para medição do sinal de impedância do músculo, quatro eletrodos de agulhas, feitas com aço inoxidável, foram posicionados no ventre muscular do gastrocnêmio do animal transversalmente à direção do encurtamento do músculo. O conjunto de eletrodos, especificamente feito para esse estudo, foi fixado a uma peça de material isolante. Os eletrodos de EIM ficavam igualmente espaçados com uma distância de 0,2cm entre eles e 0,6 cm entre os eletrodos externos. Outros dois eletrodos de agulha, também feitos com aço inoxidável, também foram acoplados à peça isolante e foram posicionados nas extremidades (proximal e distal) do músculo. Esses dois eletrodos foram utilizados para a eletroestimulação, como em estudos anteriores (KERN et al., 2005; LIMONI; ARRUDA, 2013), com o objetivo de gerar, no músculo, as consequências fisiológicas e químicas desejáveis ao experimento. A Figura 43 tem uma ilustração esquemática do posicionamento dos eletrodos no gastrocnêmio dos animais, visto de cima.

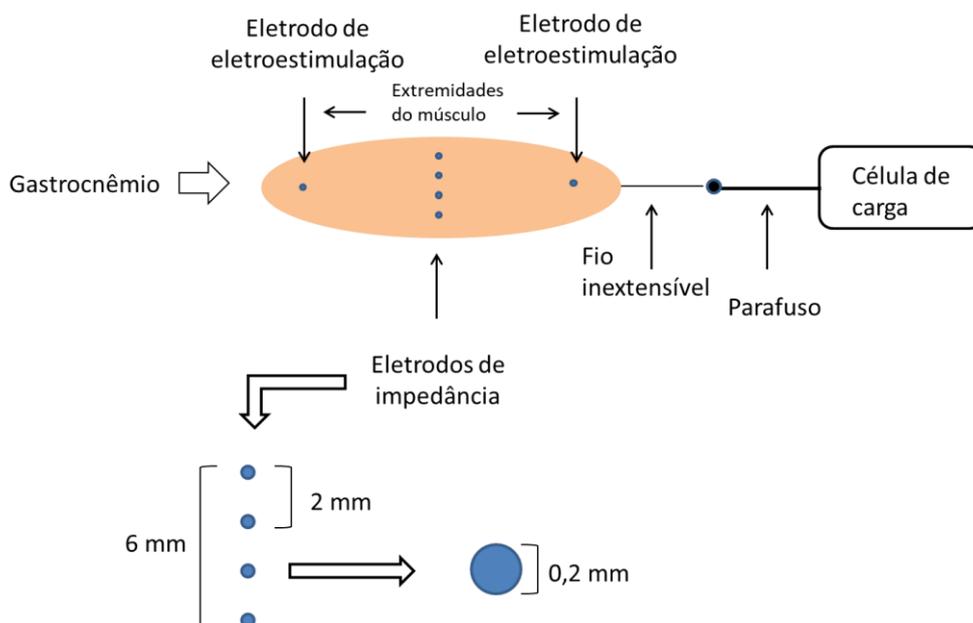


Figura 43. Esquemático simples do posicionamento dos eletrodos no músculo gastrocnêmio dos ratos.

Como os eletrodos de eletroestimulação tinham uma área muito pequena, a corrente injetada se dispersava espacialmente pouco pelo músculo, reduzindo as chances de estimular músculos adjacentes, propiciando uma contração somente do músculo desejado (NELSON; COX, 2004). Os protocolos mais comuns de NMES utilizam a estimulação no nervo ou no ponto motor; contudo, preferiu-se posicionar os eletrodos nas extremidades do gastrocnêmio por alguns motivos que passam a ser expostos. Primeiro, para estimular somente o músculo gastrocnêmio. Seria possível uma estimulação somente do gastrocnêmio, acessando uma ramificação específica do nervo ciático, o nervo tibial. Esta opção seria extremamente desafiadora por ser um tecido muito sensível e com uma área muito pequena para posicionar os eletrodos e com acesso muito difícil. O segundo motivo é a dificuldade que o próprio aparato experimental oferece. Com eletrodos posicionados no ventre muscular, tendão do músculo fixado a um fio, a complexidade da cirurgia para expor e instrumentalizar o nervo tibial aumentaria ainda mais. Se a estimulação fosse realizada num nível mais acima do nervo ciático (antes do nervo tibial), como realizado nos estudos de Sanchez et al. (2014) e Li et al. (2016), outros músculos (bíceps femoral, tibial anterior e sóleo), que não são de interesse do estudo, seriam contraídos quando o sinal de NMES fosse aplicado e assim, não seria possível distinguir no sinal de força, a força relativa apenas ao movimento de flexão plantar, realizado pela contração do gastrocnêmio. Por último, a área do ponto motor do gastrocnêmio foi justamente o local onde foram posicionados os eletrodos de EIM. Nesse sentido, é importante relatar que o local específico do ponto motor difere entre os animais. Contudo, mesmo não sendo exatamente no mesmo lugar, o ponto motor do gastrocnêmio está sempre na região do ventre muscular, como mostrou Gobbo e colaboradores

(2014). Então, podemos considerar que os eletrodos de EIM estavam sempre na região do ponto motor, inviabilizando o posicionamento de mais eletrodos para a eletroestimulação.

O posicionamento de eletrodos de NMES nas extremidades de um músculo gera uma contração porque o estímulo elétrico despolariza a membrana celular (NELSON; COX, 2004). Resumindo, procurou-se aplicar um protocolo que seria capaz de evocar uma contração muscular controlada que preservasse os principais eventos fisiológicos do processo de contração, mesmo com as restrições que são inerentes a técnica de NMES.

4.2.2 Dispositivos

Para aquisição dos dados de força (F) foi utilizado uma célula de carga (MLB 50, Interface, EUA) e um sistema de condicionamento de sinal desenvolvido especificamente para este sensor (esquemático no Anexo IV), gerando uma sensibilidade de 379 mV/N. O sistema fornecia um sinal DC proporcional a força aplicada à célula de carga que foi conectada ao tendão do gastrocnêmio por meio de uma linha fina e inextensível.

A calibração foi realizada com a célula de carga posicionada na posição vertical e utilizou-se massas conhecidas de 0,001 kg a 0,1 kg que foram multiplicadas pelo valor da aceleração da gravidade ($9,8 \text{ m/s}^2$), para que a reta de regressão transformasse os valores em Volts (V) para Newtons (N) diretamente. A correlação entre os valores estimados e os valores reais foi de $r = 0,99$. A equação de calibração pode ser vista na equação 4.1 (Os gráficos com a reta de calibração e com a comparação entre dados estimado e dados reais encontram-se nas Figura 69 e Figura 70 no Anexo I.)

$$F = S_F \times 369.8 + 157.6 \quad (4.1)$$

onde, S_F é o sinal elétrico, em volts, da célula de carga.

O sistema de eletroestimulação foi composto por um *buffer* (esquemático no Anexo V) conectado a uma das saídas D/A de uma placa NI6252 (National Instruments, EUA) que tinha uma taxa de atualização de 2,86 Ms/s e foi controlada por um *software* desenvolvido em LABView, especificamente para os propósitos deste estudo (rotina do *software* no Anexo VI). O sistema era capaz de gerar um pulso bifásico entre -2,5 e 2,5 volts, com largura de pulso fixa de 500 μ s e com frequências entre 0,5 Hz e 1 kHz. O protótipo foi testado com cargas de impedâncias entre 100 Ω e 1k Ω , onde viu-se que o sistema atinge a amplitude estimulação desejada com um *risetime* de 340 ns.

Foi avaliada uma possível interferência do sistema de NMES no sinal de bioimpedância por um possível *crosstalk* entre os sistemas. A avaliação foi realizada em um animal (post mortem)

que foi estimulado com um pulso bifásico de 1V de amplitude, 500 μ s de largura de pulso a uma frequência de 5Hz por um minuto. Durante a estimulação, nenhuma contração foi observada e o sinal de impedância não apresentou alterações nos momentos de estimulação. Logo, a possibilidade de *crosstalk* entre os sistemas foi descartada.

Para as medições de impedância (Z) do músculo, utilizou-se um protótipo desenvolvido em nosso laboratório (esquemático no Anexo II) capaz de medir, em tempo real, a resistência (R) e a reatância (X). Este protótipo consiste em um sistema monofrequencial (50 kHz) que injeta, no volume condutor, uma corrente senoidal com 1mA de amplitude.

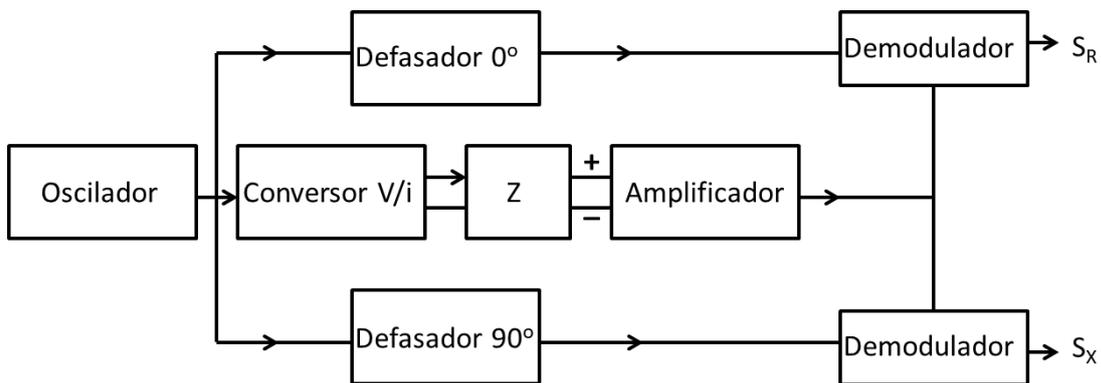


Figura 44. Diagrama de blocos do sistema de medição de impedância.

A Figura 44 ilustra o diagrama de blocos do referido sistema. No diagrama podemos ver que a resistência e a reatância são obtidas na saída do demodulador em quadratura que recebe como sinais de referência duas ondas quadradas, sendo uma em fase com a corrente de excitação e outra defasada em 90°. Então a saída do sistema fornece dois sinais de baixa frequência (menor que 10 Hz), sendo um proporcional à resistência (S_R) e outro à reatância (S_X), que foram devidamente calibrados com resistências entre 0 e 326 Ω (10, 46,7, 98,5, 270,4 e 326) e reatâncias entre 0 e -42,2 Ω (-3,8, -6,1, -7, -10,2, -15,2, -21,5, -26,1, -34,1 e -42,2). As equações 4.2 e 4.3 permitem estimar as partes real e imaginária da impedância do músculo, com um coeficiente de correlação de Pearson de 0,99 e 0,99, respectivamente, entre as grandezas aplicadas no processo de calibração e aquelas estimadas pelo sistema. (Os gráficos com a reta de calibração e com a comparação entre dados estimado e dados reais encontram-se nas Figura 65 a Figura 68 no Anexo I.)

$$R = -0.98 \times S_R^3 - 3.22 \times S_R^2 - 106.18 \times S_R + 1.39 \quad (4.2)$$

onde, S_R é o sinal elétrico do protótipo proporcional à resistência.

$$X = (S_x - (-10^{-10} \times S_R^3 - 1.6 \times 10^{-6} \times S_R^2 + 10^{-4} \times S_R)) \times 103.91 + 188.92 \quad (4.3)$$

onde, S_x é o sinal elétrico do protótipo proporcional à reatância.

A resposta ao degrau do sistema foi levantada obtendo-se o *settling time* de 132,8 ms e *rise time* de 34,7 ms. A frequência de corte foi estimada a partir de: $0,35/\text{rise time} \approx 10$ Hz. A Figura 45 apresenta o sinal analisado para o levantamento da resposta ao degrau.

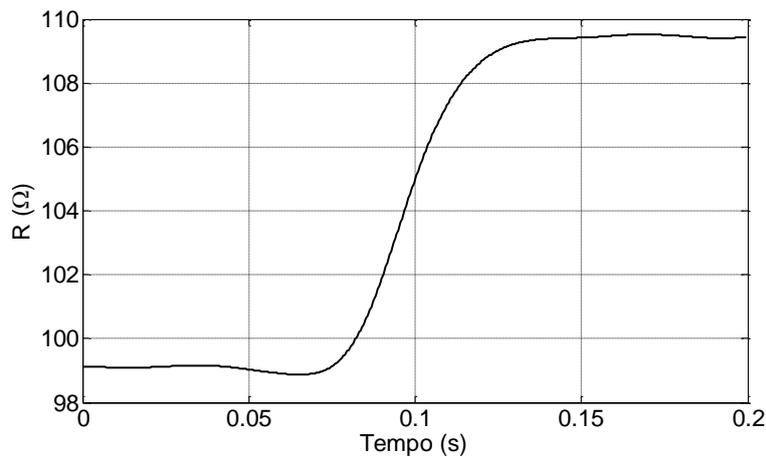


Figura 45. Sinal do sinal de resistência utilizado para analisar a resposta ao degrau.

Os sinais de resistência e reatância, assim como os sinais de força e os pulsos de eletroestimulação foram digitalizados por meio da placa de aquisição de dados NI 6009 (National Instruments, EUA) numa frequência de amostragem de 4kHz. Um programa em LABView (National Instruments, EUA) foi desenvolvido para a aquisição e visualização em tempo real dos dados (rotina do programa no Anexo III).

4.3 Protocolo experimental

4.3.1 Fase I – Variação de força em função da frequência com estímulos curtos.

Nesta primeira fase procurou-se associar a intensidade da contração com as variações nos sinais de EIM dinâmica. Para tal, os dados foram adquiridos com o objetivo de se obter a curva que expressasse a dependência entre a frequência de estimulação do NMES em função da força ($f \times F$) de cada animal e identificar a frequência que gerasse a força máxima exercida pelo músculo, esta identificação também foi importante para coleta de dados da fase II. Logo, todos os ratos que foram submetidos ao protocolo experimental da fase II, foram submetidos, primeiro, ao protocolo da fase I, que será explicado a seguir.

Os dados para investigar o comportamento da força em função da frequência de estimulação, para cada animal, foram obtidos por um protocolo baseado no estudo de Mrówczyński e colaboradores (2011). Os parâmetros de NMES utilizados encontram-se na tabela 3, a seguir.

Tabela 3. Parâmetros de NMES utilizados no protocolo experimental da fase I

Largura de pulso	Frequências (Hz)	Duração dos trens de pulsos	Intervalo entre os trens de pulsos
500 μ s	2, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 75, 100, 150	1 s	40 s

Dez trens de pulsos foram aplicados no gastrocnêmio dos animais, com duração de 1s e intervalo entre os trens de 40s para recuperação das condições de repouso do músculo antes do trem de pulso seguinte. Cada trem de pulso tinha uma frequência de estimulação diferente (que podem ser vistas na tabela 3) e foram aplicadas em ordem aleatória. Os sinais de *R*, *X* e *F* foram adquiridos continuamente durante todo o protocolo e ao final do experimento todo o sinal foi salvo. Como os estímulos foram muito curtos, apenas 1s de duração com um grande tempo de repouso, assumimos que neste protocolo o ATP fornecido ao músculo era quase que exclusivamente do sistema ATP-CP (R CORE TEAM, 2015).

4.3.2 Fase II – Estimulação de 100s com frequência fixa correspondente a 30% da *F*_{max}.

O protocolo experimental da fase 2 depende de o animal ser submetido ao protocolo descrito anteriormente (da fase I). Neste protocolo os animais foram submetidos a contrações (estímulos elétricos) intervaladas de 1s de duração com 1s de repouso por um total de 100s. O objetivo era estimular que todos os sistemas de regeneração de ATP fossem ativados e assumissem predominância no fornecimento de energia para o músculo em diferentes momentos, justamente devido a particularidade de cada sistema. Os parâmetros de estimulação desta fase podem ser vistos na Tabela 4.

Tabela 4. Parâmetros de NMES utilizados no protocolo experimental da fase II

Tipo	Largura de pulso	de frequência	Duração do trem de pulsos	Intervalo entre os trens de pulsos	Tempo total
intervalada	500 μ s	30% da <i>F</i> _{max}	1 s	1 s	100 s

Como pode ser visto na Tabela 4, a frequência tinha por objetivo gerar uma força de aproximadamente 30% da força máxima encontrada na curva Frequência x Força obtida no protocolo anterior. A partir desta curva, fez-se o ajuste de uma *spline* cúbica e estimou-se qual a frequência de estimulação geraria a força desejada (30% da Fmax). Na Figura 46, vê-se um exemplo da estimativa para um dos animais. No caso, para este animal o protocolo da fase II foi realizado com a frequência de 31 Hz.

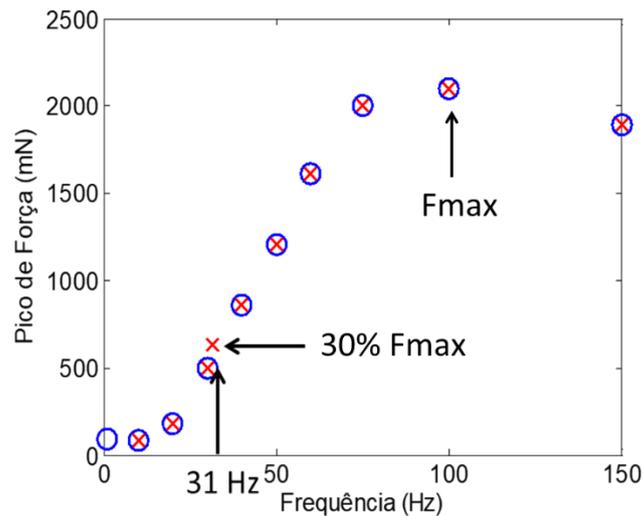


Figura 46. Ajuste da curva Frequência x Força por spline cúbica (valores representados pelo x) e a identificação da frequência correspondente à 30% da força máxima do animal.

4.4 Análise e processamento dos dados

4.4.1 Fase I - Variação de força em função da frequência com estímulos curtos

Após a aquisição dos dados, os sinais de impedância (R e X) foram filtrados por um filtro digital Butterworth passa baixas de segunda ordem com frequência de corte em 30 Hz para remover interferências de alta frequência. Então, a partir dos dois sinais já filtrados, calculou-se a fase (ϑ) da impedância: $\arctan^{-1}(X/R)$.

Considerando que os valores de linha de base da impedância variaram ao longo do experimento, um segundo filtro digital, Butterworth, passa-altas, de segunda ordem, com frequência de corte de 0,01 Hz, foi aplicado aos dados de impedância (R, X e ϑ). A seguir os picos de R, X, ϑ e F , durante o estímulo de cada trem de pulsos foram identificados. Esses valores foram subtraídos do valor médio de repouso dos 3 segundos que antecederam cada contração, conforme equação 4.

$$\Delta S = S_p - S_b \quad (4.4)$$

onde, ΔS é a variação do sinal (R , X , θ , ou F), S_p é o valor de pico durante uma estimulação e S_b é o valor basal médio dos 3 segundos que antecederam o estímulo.

É importante considerar que o pico pode ter valores menores que os de repouso e nesses casos, ΔS é negativo. A Figura 47, abaixo, ilustra a identificação do pico e do intervalo de onde calculou-se o valor médio basal.

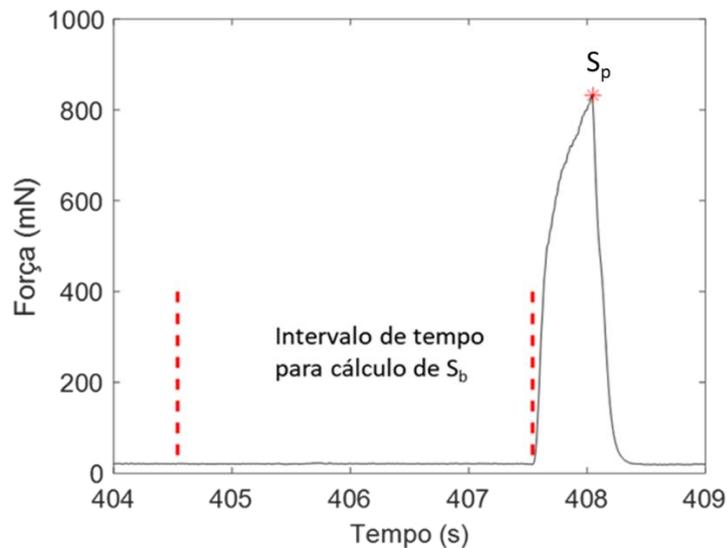


Figura 47. Sinal de força momentos antes da contração e durante a contração. Entre as linhas tracejadas, o intervalo de tempo onde calculou-se o valor médio da força e dos outros sinais para o cálculo de S_b .

Como os valores de F e Z em cada animal variam em diferentes intervalos, foi feita uma normalização com objetivo de colocar todos os dados dentro do mesmo intervalo. Normalizou-se os valores de ΔS pelo módulo do maior valor de ΔS do próprio animal ($|\Delta S_{max}|$) e em seguida multiplicou-se por 100 (equação 4.5).

$$\Delta S_{rel} = \frac{\Delta S}{|\Delta S_{max}|} \times 100 \quad (4.5)$$

onde ΔS_{rel} é a variação do sinal relativa a variação máxima, ΔS é a variação do sinal durante um ciclo de estimulação e $|\Delta S_{max}|$ é o módulo da variação máxima do sinal.

Gráficos do tipo boxplot de ΔS_{rel} em função da frequência foram utilizados para analisar o comportamento dos sinais. O coeficiente de correlação de Pearson foi calculado e testado estatisticamente para avaliar as correlações entre $\Delta F_{rel} \times \Delta R_{rel}$; $F\Delta_{rel} \times \Delta X_{rel}$; e $\Delta F_{rel} \times \Delta \theta_{rel}$. Por último fez-se uma análise de regressão linear, a fim de investigar a influência que o parâmetro ΔF_{rel} exerceu nos parâmetros de impedância.

Todo o processamento foi realizado em ambiente MATLAB R2017a (Mathworks, USA) e as análises estatísticas foram realizadas no ambiente R 2.13(R CORE TEAM, 2015).

4.4.2 Fase II - Estimulação de 100s com frequência fixa correspondente a 30% da Fmax.

Os sinais foram filtrados, assim como na fase I, por um filtro digital Butterworth, passa-baixas, com frequência de corte de 30Hz nos sentidos direto e reverso. Após a filtragem, fez-se a identificação dos valores de pico (Z_{pico}) para cada ciclo de estimulação, conforme pode ser visto na Figura 48. Também foram identificados os valores de repouso (Z_{base}), onde foi considerado o valor mínimo do ciclo de contração. Após a identificação dos picos e valores de repouso foram realizados mais dois processamentos.

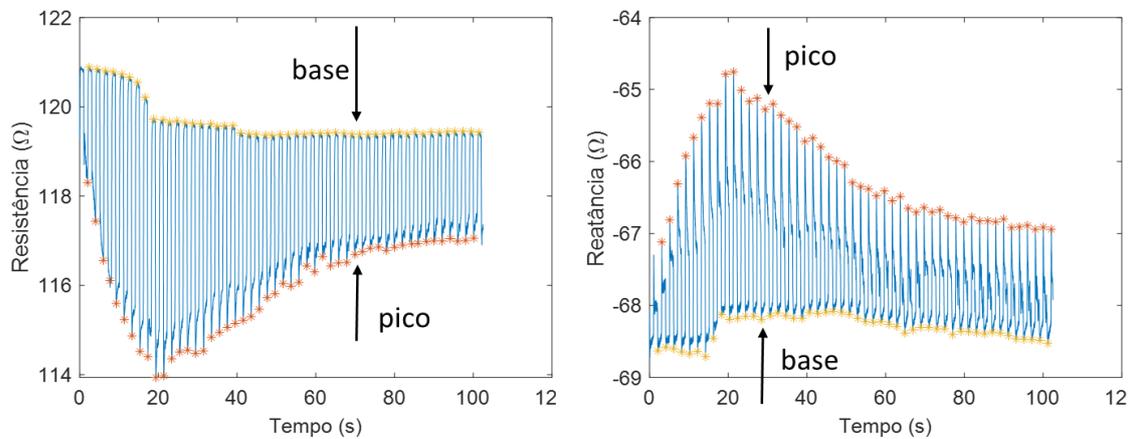


Figura 48. Sinais de resistência e reatância de um animal com a identificação dos valores de pico (vermelho) e de base (amarelo) para cada ciclo de contração.

O primeiro processamento é descrito pela equação 4.6, que calcula as variações relativas dos picos em relação as bases de cada ciclo de contração. Denominou-se este parâmetro de ΔZ_{inst} . Foi calculado o valor de ΔZ_{inst} para cada ciclo de contração, tendo-se assim 50 valores por animal. A Figura 49 mostra um sinal com a escala reduzida onde pode-se visualizar dois ciclos completos de contração. Neles, podemos ver indicado em vermelho o pico e em amarelo a base.

$$\Delta Z_{inst} = \frac{|Z_{pico} - Z_{base}|}{|Z_{base}|} \quad (4.6)$$

onde, ΔZ_{inst} é a variação do sinal de impedância (resistência ou reatância) relativa ao Z_{base} do próprio ciclo de contração. Z_{pico} é o maior valor de Z durante o período de contração e Z_{base} é o valor mínimo de Z durante o período de repouso.

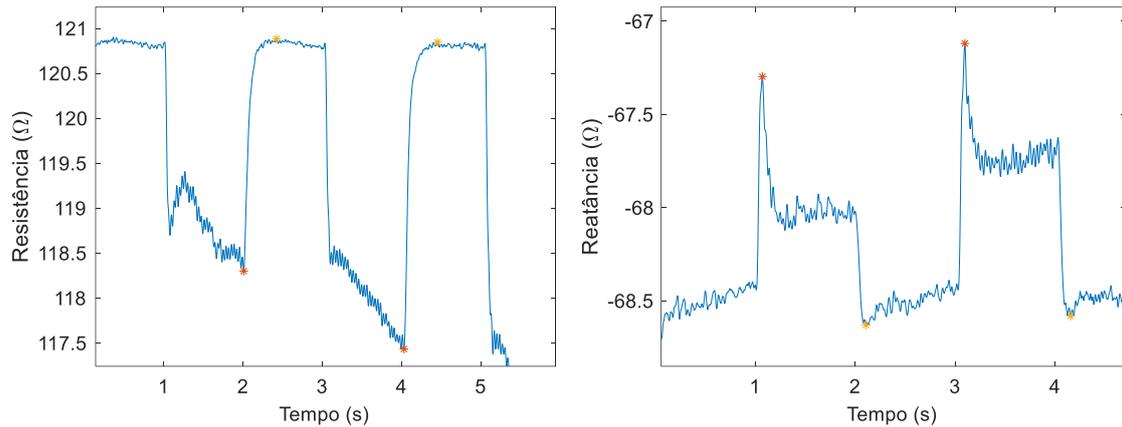


Figura 49. Sinais de dois ciclos de estimulação de resistência (esq) e reatância (dir) com as indicações dos valores de picos (vermelho) e bases (amarelo).

O segundo processamento pode ser descrito pela equação 4.7, que simplesmente normaliza os valores de pico pelo valor médio do último segundo de repouso que antecedeu o primeiro estímulo elétrico. Como cada valor de pico é sempre comparado como repouso prévio ao início da atividade muscular, este parâmetro foi denominado de ΔZ_{rep} . Assim como em ΔZ_{inst} , para cada animal foram calculados 50 valores de ΔZ_{rep} , um para cada ciclo. A Figura 50 indica por meio dos círculos vermelhos, os períodos de 1s utilizados para calcular Z_{rep} . Todo o processamento desta fase foi realizado em ambiente MATLAB R2017a (Mathworks, USA).

$$\Delta Z_{rep} = \frac{Z_{pico}}{Z_{rep}} \quad (4.7)$$

onde, ΔZ_{rep} é a variação do sinal de impedância relativa a Z_{rep} , Z_{pico} é o valor máximo de Z durante o período de contração e Z_{rep} é o valor médio do último segundo que antecedeu a primeira contração.

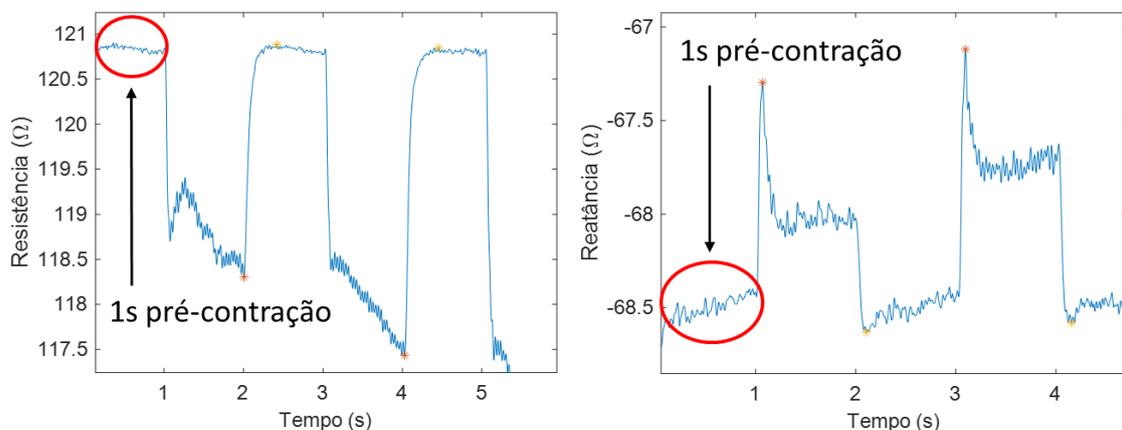


Figura 50 Sinais de dois ciclos de estimulação de resistência (esq) e reatância (dir) com as indicações dos valores de picos (vermelho) e bases (amarelo) além do período pré contração utilizado para calcular Z_{rep} .

Como ambos os parâmetros ($\Delta Z inst$ e $\Delta Z rep$) possuem a mesma quantidade de valores em todos os animais e ainda, os estímulos foram realizados no mesmo instante, foi possível calcular os valores médios das séries temporais de $\Delta Z inst$ e $\Delta Z rep$ (equações 4.8 e 4.9).

$$\overline{\Delta Z inst}(i) = (\sum_1^n \Delta Z inst(i))/n \quad (4.8)$$

$$\overline{\Delta Z rep}(i) = (\sum_1^n \Delta Z rep(i))/n \quad (4.9)$$

onde, $\overline{\Delta Z inst}(i)$ é valor médio de $\Delta Z inst$ dos $n = 10$ animais durante a i -ésima contração e $\overline{\Delta Z rep}(i)$ o valor médio de $\Delta Z rep$ dos $n = 10$ animais também durante a i -ésima contração, sendo $i = \{1,2,3...50\}$.

Após o cálculo das séries temporais médias, calculou-se a derivada discreta da série temporal para ambos os parâmetros conforme, equações 4.10 e 4.11.

$$d\overline{\Delta Z inst}(i)/dt = (\overline{\Delta Z inst}(i + 1) - \overline{\Delta Z inst}(i))/dt \quad (4.10)$$

$$d\overline{\Delta Z rep}(i)/dt = (\overline{\Delta Z rep}(i + 1) - \overline{\Delta Z rep}(i))/dt \quad (4.11)$$

onde, $d\overline{\Delta Z inst}(i)/dt$ é a derivada discreta de $\overline{\Delta Z inst}(i)$ relativa a contração de $n^{\circ}i$ e $d\overline{\Delta Z rep}(i)/dt$ é a derivada de $\overline{\Delta Z rep}(i)$ relativa a contração de $n^{\circ}i$, sendo $i = \{1,2,3...50\}$.

5 Resultados

5.1 Fase I - Variação de força em função da frequência com estímulos curtos.

A Figura 51 ilustra um exemplo típico de um sinal completo adquirido durante o protocolo experimental. É importante lembrar que as frequências de NMES foram aplicadas em ordem aleatória, explicando as amplitudes aleatórias vistas nos sinais de F , R e X . Além disso, observa-se um sincronismo entre os picos dos quatro sinais, conforme esperado.

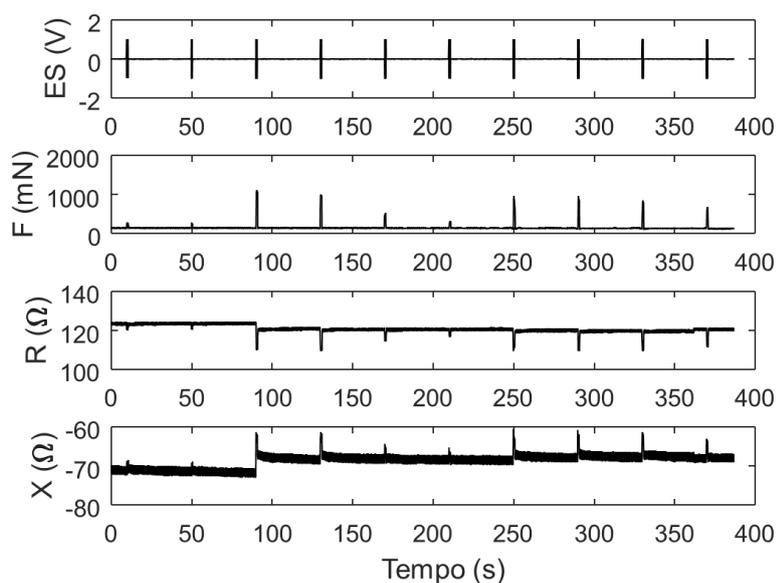


Figura 51. Exemplo de um sinal típico adquirido durante o protocolo experimental. ES- eletroestimulação; F – força; R – resistência e; X- reatância.

A Figura 52 retrata um exemplo de um sinal de resistência após todo o processo de filtragem. Nota-se um aumento da relação sinal/ruído (Figura 52 meio) e a retificação da linha de base (Figura 52 abaixo) para uma melhor estimativa de ΔS . Ao final do processo de filtragem, os picos foram levemente atenuados, contudo as diferenças entre a magnitude dos picos continuaram relacionadas com a magnitude da força.

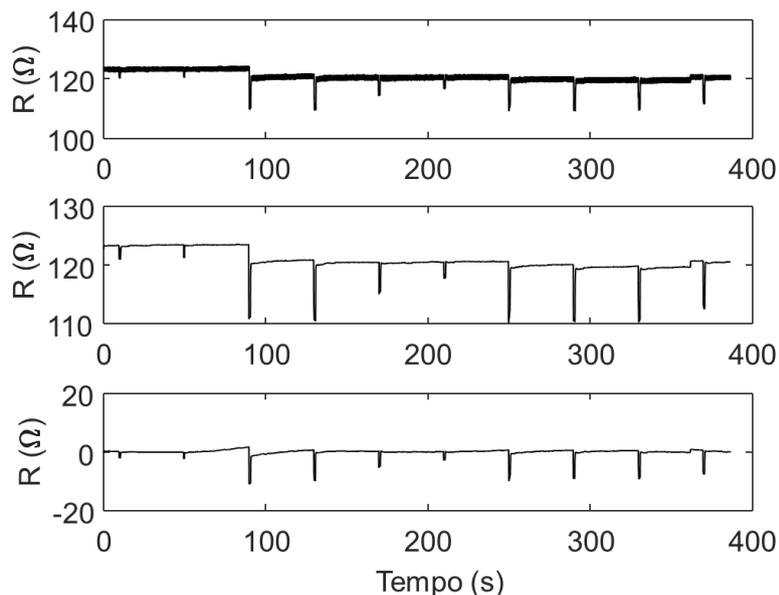


Figura 52. Exemplo do processo de filtragem do sinal. Acima: sinal original de resistência. Meio: sinal após filtragem passa baixas (frequência de corte de 30 Hz). Abaixo: sinal após filtragem pelo filtro passa- altas (frequência de corte de 0,01 Hz).

Um exemplo dos dados já processados de um animal pode ser visto na Figura 53, que mostra a curva $f \times \Delta F$ (Figura 53 a) e as variações dos parâmetros de impedância, R (Figura 53 b), X (Figura 53 c), e θ (Figura 53 d) em função da variação relativa de força (ΔF_{rel}). A Figura 54 mostra os boxplots das variações relativas dos parâmetros de impedância em função das frequências de NMES. Os dados de todos os animais podem ser encontrados no Anexo VII.

Um comportamento sigmoidal da curva $f \times \Delta F$ foi observado em todos os animais. Um comportamento similar, porém, mais suave foi observado nos sinais de impedância, ΔR e ΔX . Ainda, observou-se que amplitude das variações dos parâmetros de impedância (ΔR , ΔX e $\Delta \theta$) foram de até 15%. É importante considerar que a diferença entre as menores e as maiores variações dos parâmetros de impedância não são grandes e, são similares as variações entre os valores de repouso e as menores variações. Sendo assim, pode-se dizer que a magnitude das variações de impedância tem relação com a intensidade da contração. Contudo, a condição do músculo (repouso ou contraído) também exerce uma influência considerável nas variações de impedância.

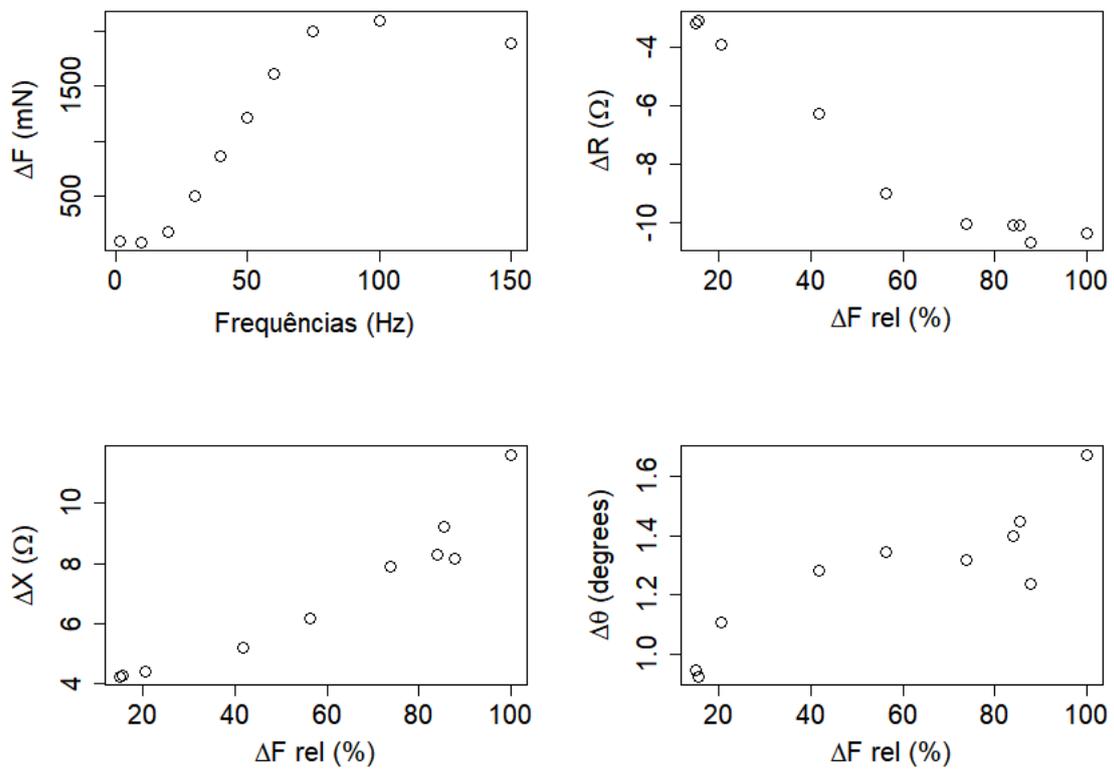


Figura 53. Exemplo dos dados processados de um animal. (a): curva frequência x força. Parâmetros de bioimpedância ΔR (b), ΔX (c), $\Delta\theta$ (d) em função de ΔF_{rel} .

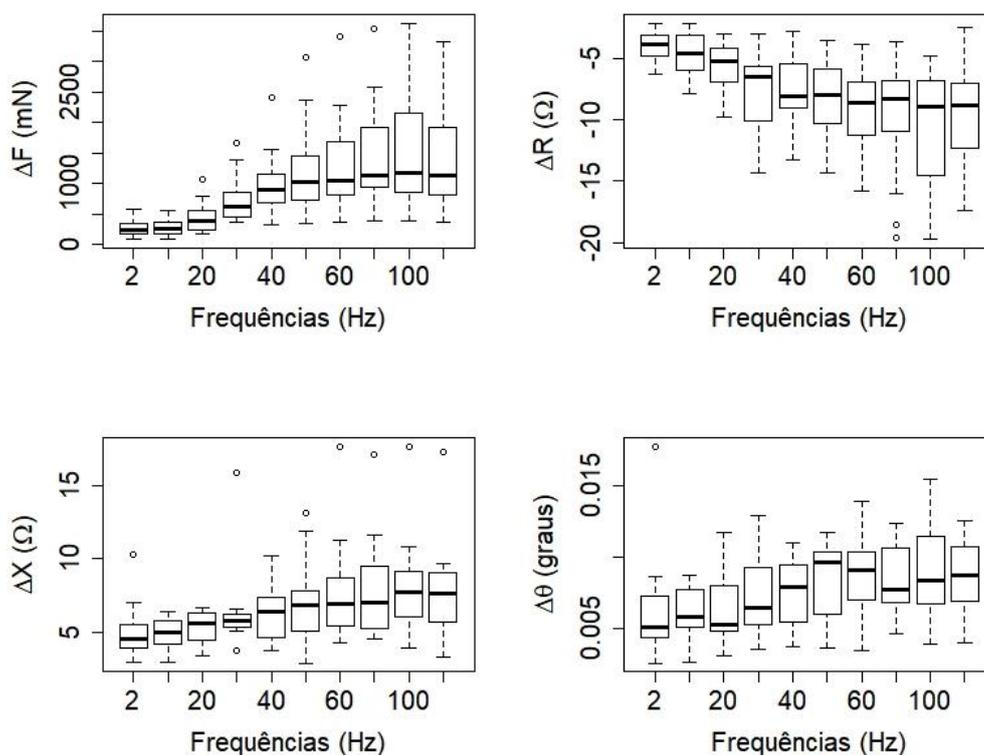


Figura 54. Boxplots dos dados processados em função das frequências de NMES, incluindo todos os animais. (a): ΔF , (b): ΔR , (c): ΔX e (d): $\Delta\theta$.

Após todos os dados serem normalizados, pudemos analisar os dados de impedância com outras variáveis contínuas ao invés da frequência que é uma variável discreta e pode-se ver estas análises na Figura 55. Dentre os parâmetros de EIM, a resistência apresentou a correlação mais forte com as variações percentuais de força (ver Tabela 5). As três correlações e análises de regressão foram estatisticamente significantes ($p < 0,05$). Contudo, as variações de impedância não podem ser justificadas apenas pela força exercida pelo músculo, uma vez que as mudanças morfológicas do músculo também podem exercer uma influência considerável, principalmente nas intensidades mais baixas de contração, momento o qual a deformação é mais significativa. Os coeficientes “b” (coeficiente linear) da análise de regressão linear (Tabela 5) indicam variações importantes, principalmente na reatância e na fase, nas contrações de baixa intensidade. Essas variações representam aproximadamente 50% da variação total dos parâmetros. É importante considerar que os valores de linha de base não foram considerados para a análise de regressão, portanto a reta não cruza a origem no gráfico e o coeficiente linear ($\approx -35\%$ para ΔR rel, $\approx -48\%$ para ΔX rel e $\approx -52\%$ para $\Delta\theta$ rel) indica que variações muito baixas de força representam variações grandes dos parâmetros de EIM.

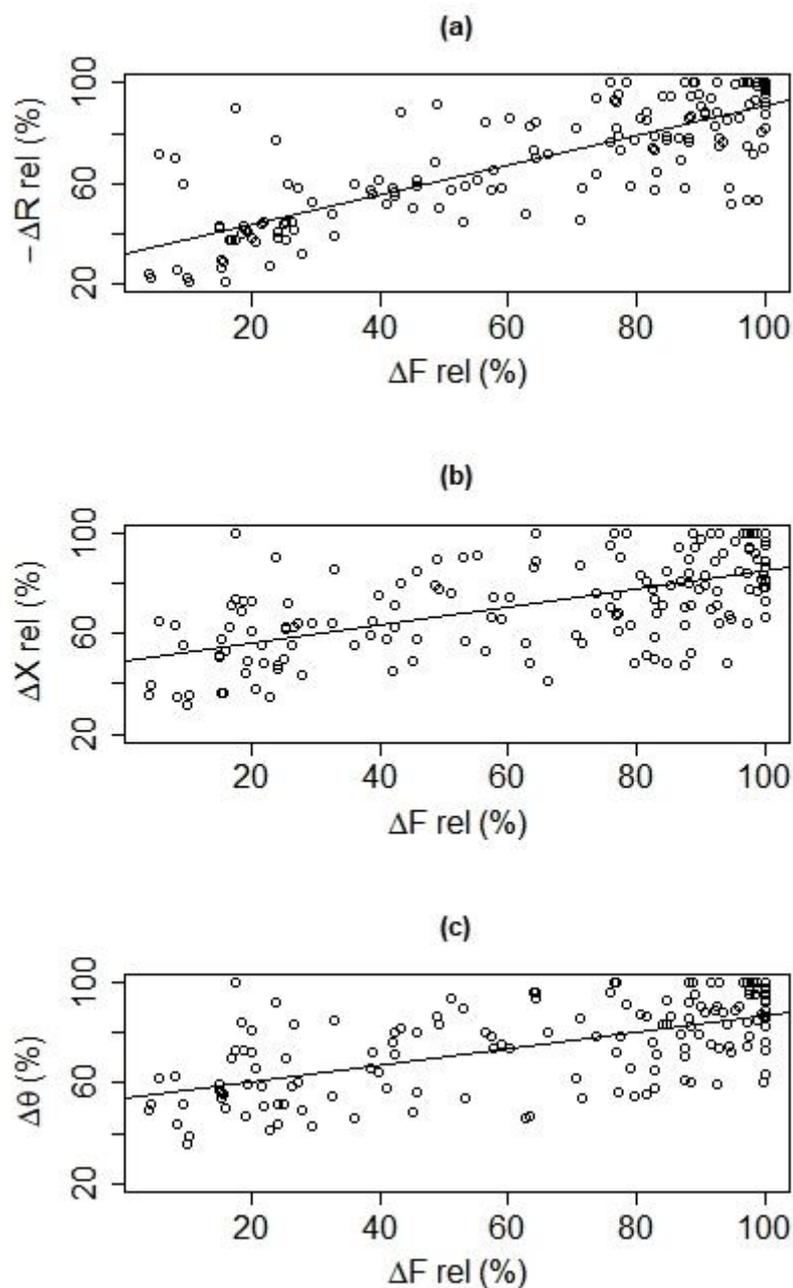


Figura 55. Gráficos de dispersão entre as variações percentuais dos parâmetros de bioimpedância em função das variações percentuais de força (ΔF_{rel}). ((a): ΔR_{rel} ; (b): ΔX_{rel} and (c): $\Delta \theta_{rel}$).

Tabela 5. Parâmetros estatísticos entre as variações percentuais de bioimpedância e as variações percentuais de força. r - Coeficiente de correlação de Pearson; R^2 – coeficiente de determinação da análise de regressão linear; coeficientes da reta de regressão: a – coeficiente angular e b – coeficiente linear.

	$\Delta R_{rel}(\Delta F_{rel})$	$\Delta X_{rel}(\Delta F_{rel})$	$\Delta \theta_{rel}(\Delta F_{rel})$
r	-0.76	0.57	0.53
R^2	0.58	0.33	0.28

a	-0.57	0.34	0.30
b	-35.42	48.64	52.94

5.2 Fase II - Estimulação de 100s com frequência fixa correspondente a 30% da F_{max} .

Na fase II o estímulo realizado foi de contrações intervaladas e tiveram a duração total de 100 segundos, equivalentes à 50 contrações. A Figura 56 ilustra os sinais de F , R e X após filtragem digital (passa-baixas em 30 Hz). A Figura 57, já mostra os sinais de R e X sem filtro (topo) e com filtro (abaixo), onde nota-se uma eliminação relevante de ruídos nos sinais.

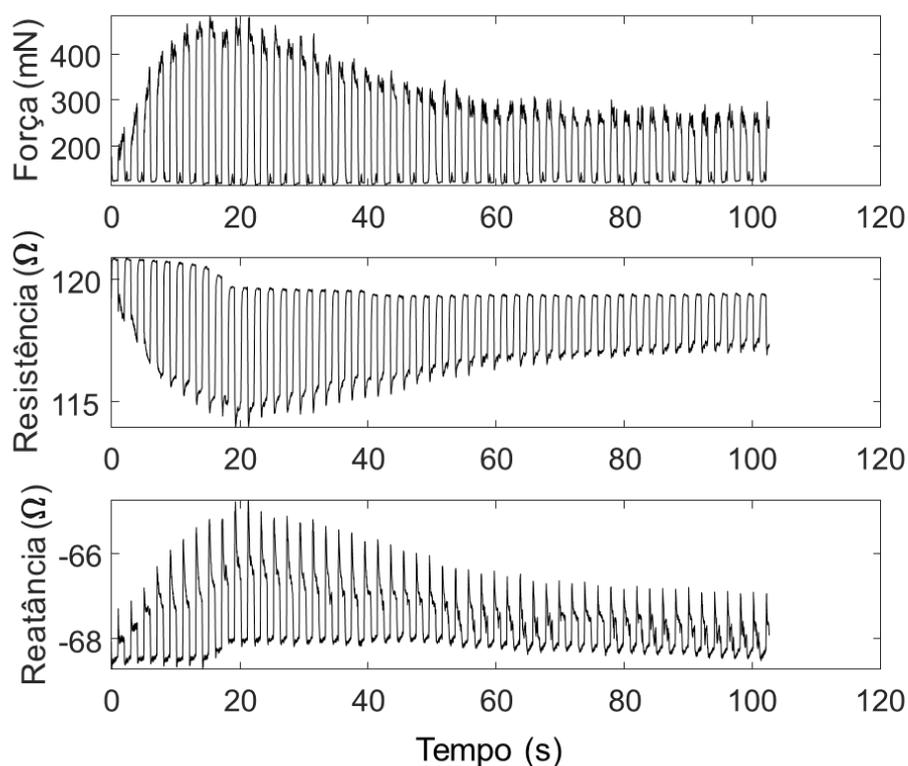


Figura 56. Sinais de Força (topo), resistência (meio) e reatância (abaixo) de um animal após filtragem digital em 30 Hz.

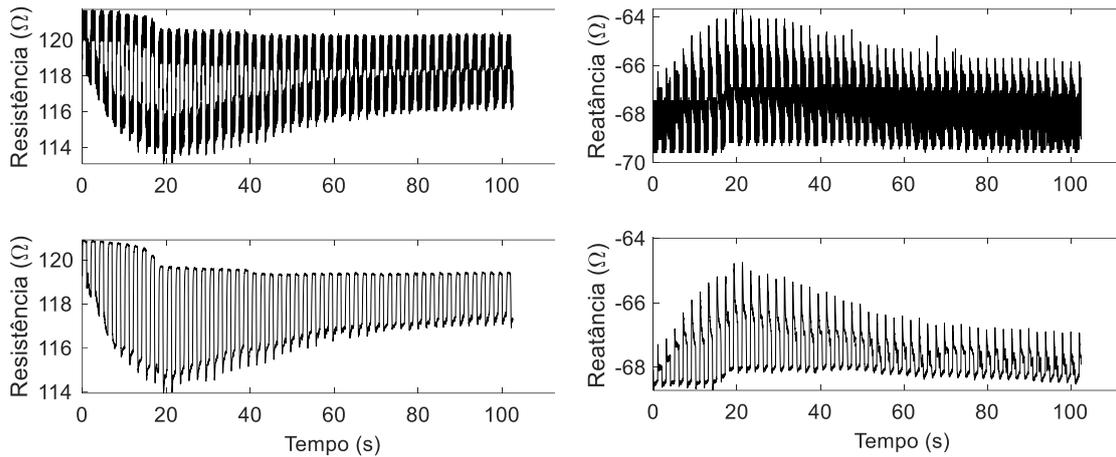
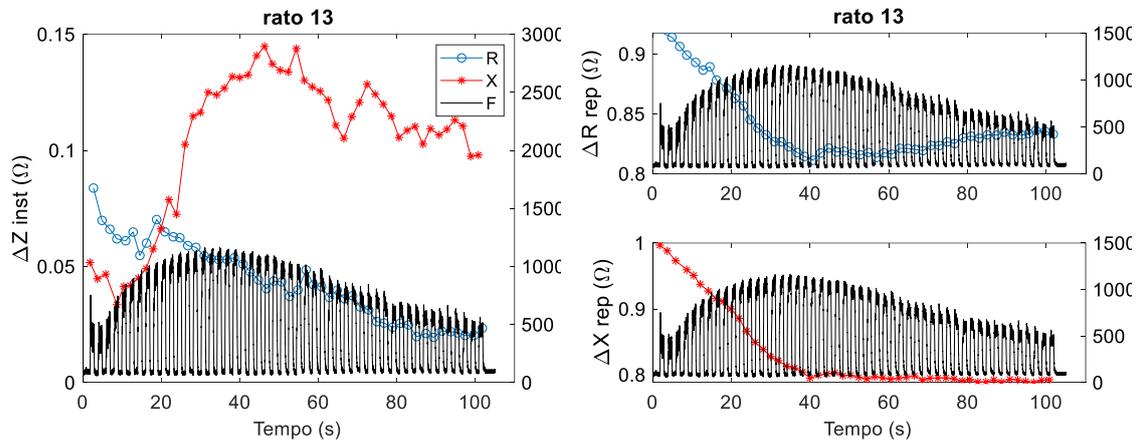
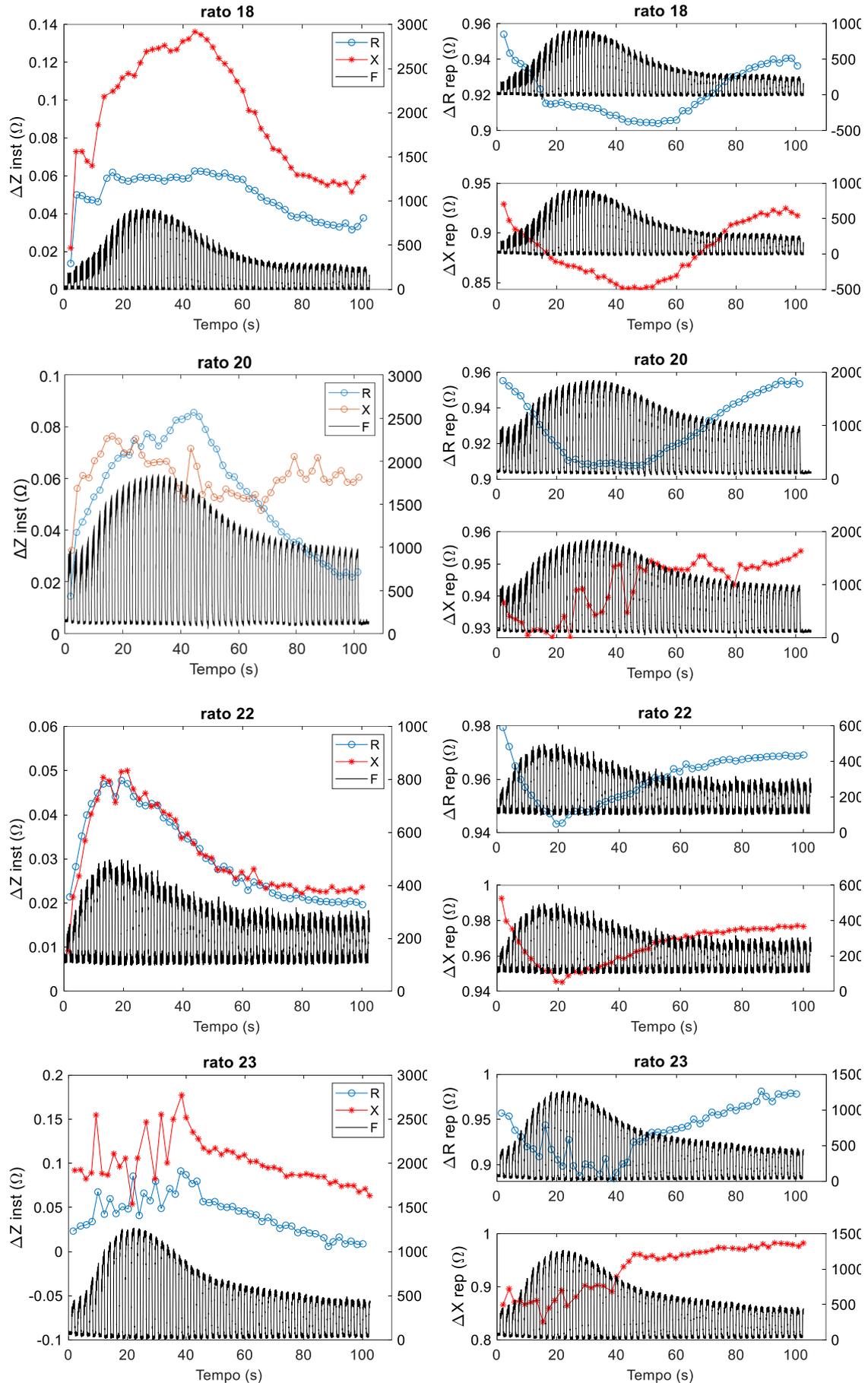
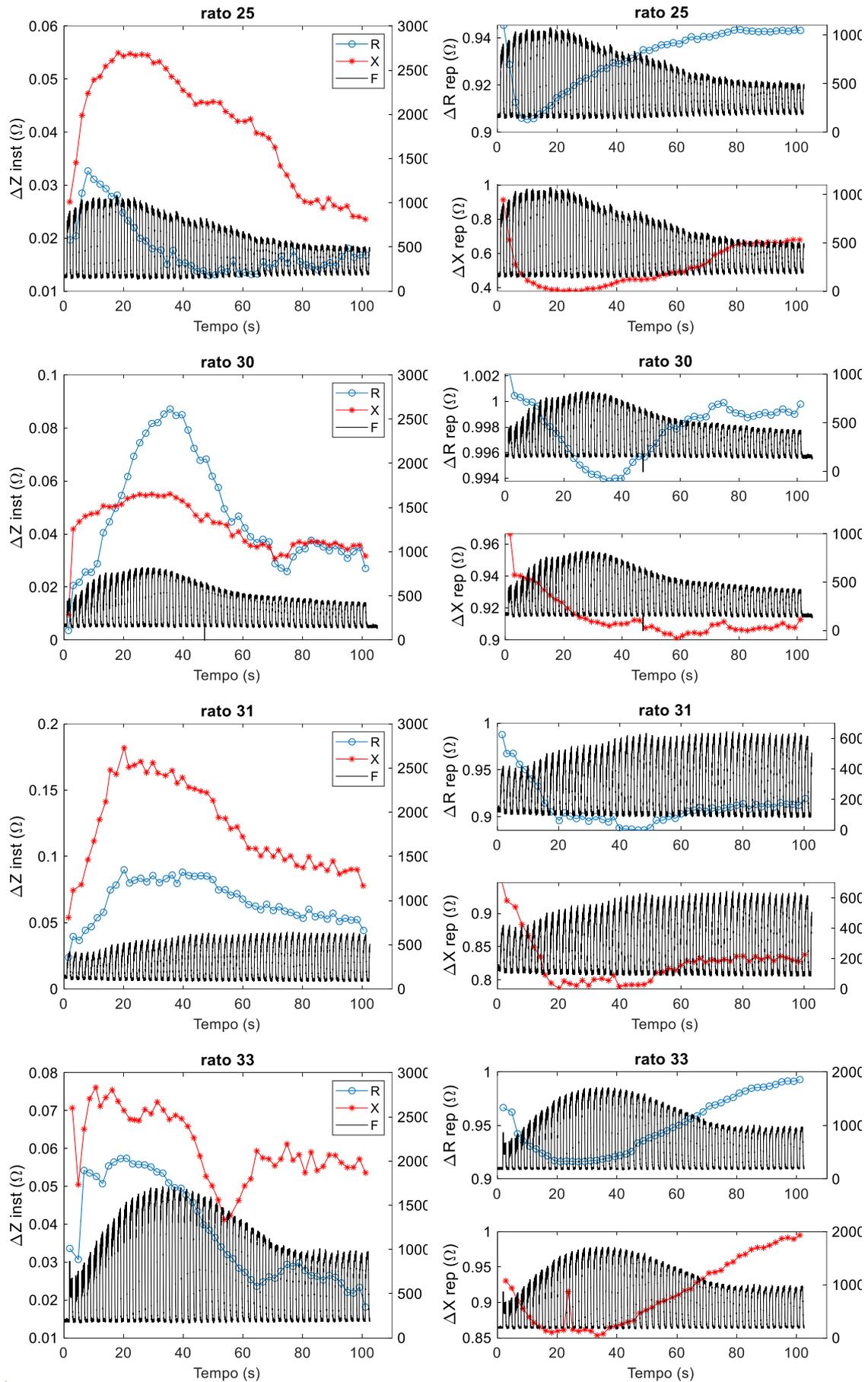


Figura 57. Sinais de resistência (esquerda) e reatância (direita), antes (acima) e após (abaixo) a filtragem.

A Figura 58 mostra os resultados após o processamento descrito no capítulo anterior (seção 4.4.2). Nos gráficos a esquerda vê-se os resultados de ΔZ_{inst} (eixo Y esquerda) e o sinal de força (eixo Y direita). Este processamento indica uma variação das componentes de impedância em relação ao momento que antecede cada contração, ou seja, uma variação relativa instantânea. Os gráficos a direita mostram os valores de ΔZ_{rep} (eixo Y esquerda) e o sinal de força (Y esquerda) e representam uma variação relativa aos valores repouso de Z. Sendo assim, indicam uma variação mais lenta que ΔZ_{inst} , uma variação relativa à um único valor de repouso.







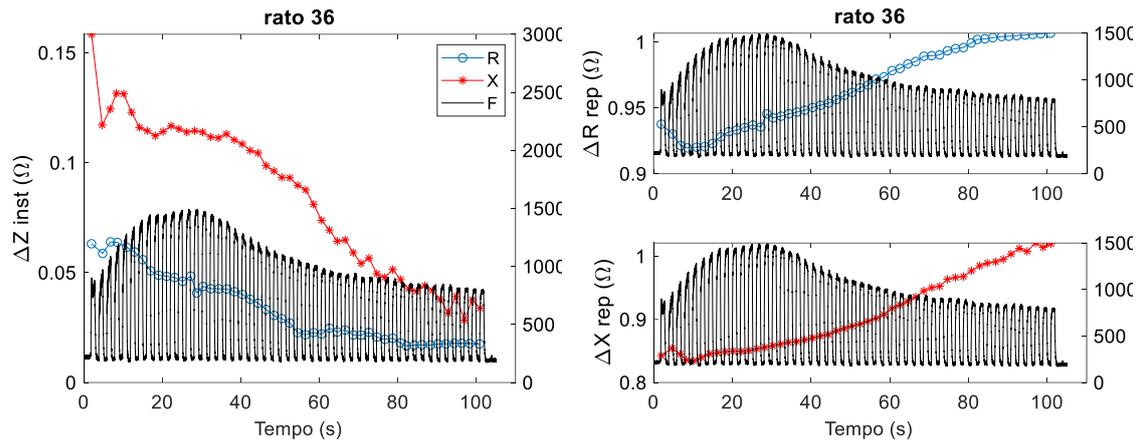


Figura 58. Sinais pós processamento no eixo y (esquerda) com os sinais de força no eixo y (direita).

Ao observar os gráficos da Figura 59, pode-se ver o comportamento dos valores médios de ΔZ_{inst} e ΔZ_{rep} no decorrer da estimulação e percebe-se que esse comportamento médio é semelhante aos vistos nos gráficos individuais. Pode-se perceber que o comportamento mais comum (e representado no comportamento médio) de ΔZ_{inst} é um aumento inicial do parâmetro chegando num ápice que, observando os gráficos da Figura 58, ocorre num tempo próximo aos valores máximos dos sinais de força, contudo não são eventos sincronizados. Todavia, há de se considerar que o aumento de ΔZ_{inst} mostra-se ligado ao período de aumento na produção de força. Esses resultados também vão ao encontro dos achados da fase I, que mostraram uma correlação entre a amplitude da força produzida e a amplitude da variação das componentes de impedância.

Os valores de variação foram numa faixa entre 3% e 6% para ΔR_{inst} e 8% a 14% para ΔX_{inst} , sendo que as principais variações ocorrem nos momentos iniciais na estimulação, como pode ser visto na Figura 60, onde as derivadas são maiores no início do protocolo. Contudo, com o decorrer das contrações, as variações dos valores de força tendem a ficar constantes, como observado na Figura 61 que mostra o sinal de força de um animal submetido as mesmas condições experimentais descritas no item 4.3.2 da metodologia, porém com uma duração de 10 minutos. Então, vê-se que da mesma forma que ΔF tende a ficar constante, ΔZ_{inst} também mostra uma tendência a ficar aproximadamente constante no final dos 100s de protocolo.

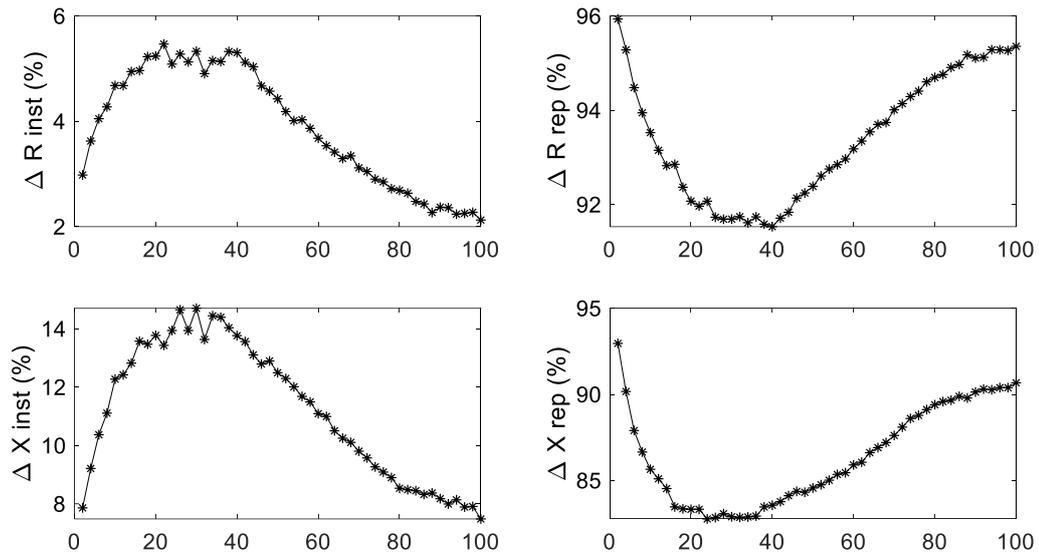


Figura 59. Comportamento médio dos parâmetros $\Delta R \text{ inst}$, $\Delta X \text{ inst}$, $\Delta R \text{ rep}$, $\Delta X \text{ rep}$.

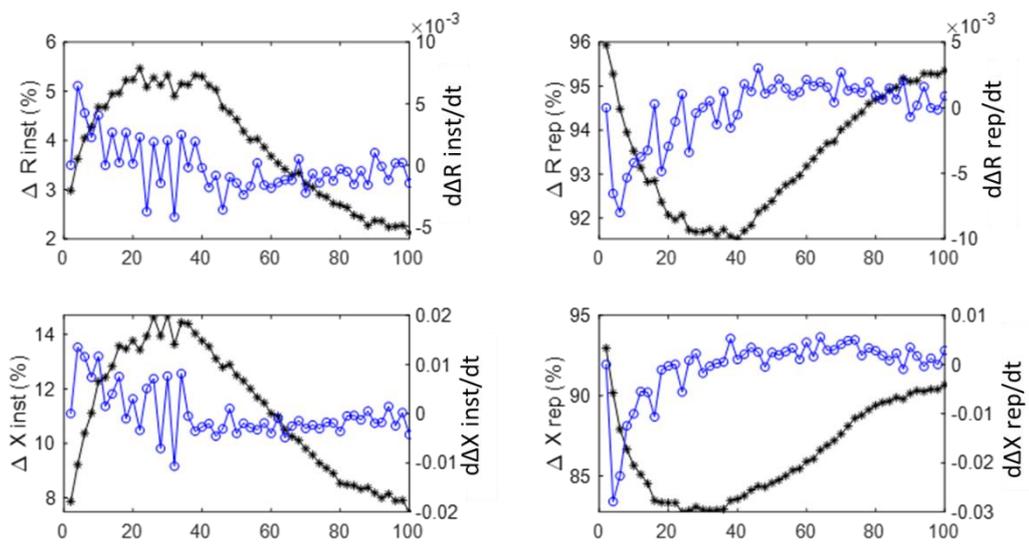


Figura 60. Comportamento médio dos parâmetros $\Delta R \text{ inst}$, $\Delta X \text{ inst}$, $\Delta R \text{ rep}$, $\Delta X \text{ rep}$ com suas respectivas derivadas no eixo Y da direita de cada gráfico.

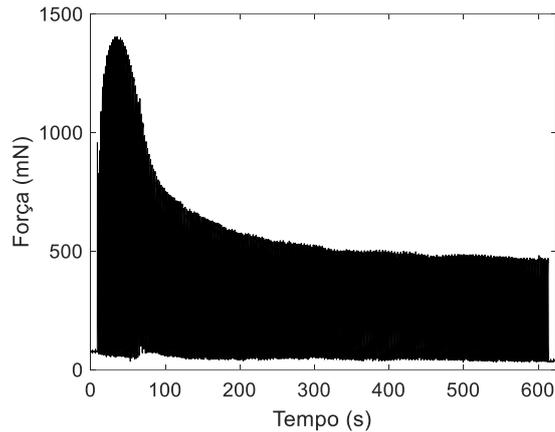


Figura 61. Sinal de força após 10 minutos de estimulação. Este sinal é do mesmo animal da Figura 56 e mostra como a amplitude do sinal de força é praticamente constante após aproximadamente 250 s de estimulação

Em relação a ΔZ_{rep} , os gráficos (Figura 58 e Figura 59) mostram que os valores de Z durante uma contração são menores que os valores de Z de repouso (valor da relação abaixo de 1) e que, essa relação tende a estabilizar, com a derivada se aproximando de zero (Figura 60) e algumas vezes a retornar à valores mais próximos aos de repouso, com o decorrer da contração.

Os resultados de um modo geral mostram uma série de indícios que podem ser associados com metabolismo do músculo durante as contrações, e por consequência, com os sistemas de regeneração de energia utilizados pelo corpo durante uma atividade. Esses indícios são: aumento rápido de ΔZ_{inst} ; ponto máximo de ΔZ_{inst} próximo ao pico de força; ponto mínimo de ΔZ_{rep} também próximo ao pico de força; a tendência de ΔZ_{inst} e ΔZ_{rep} em tornarem-se constantes no final do protocolo, a derivada ΔZ_{inst} e ΔZ_{rep} tender à zero (em momentos diferentes); e serão discutidos e interpretados no capítulo a seguir.

6 Discussão

6.1 Fase I - Variação de força em função da frequência com estímulos curtos.

Nossos achados indicaram uma forte correlação entre as variações de bioimpedância, principalmente a resistência, e a força muscular.

O protocolo experimental utilizando a eletroestimulação permitiu que a intensidade de contração do músculo fosse controlada pela frequência dos pulsos, uma vez que amplitude e a largura de pulso foram constantes. Os tornozelos dos ratos não estavam imobilizados, contudo o pé dos animais encostava num anteparo que permitia uma variação angular do tornozelo muito pequena. Sendo assim, com um movimento articular muito pequeno, considerou-se que a contração exercida pelo músculo foi isométrica.

Mesmo sem movimento articular, quando o gastrocnêmio contraía, o comprimento do ventre muscular reduzia e sua área de secção transversa aumentava. Ambos os eventos causam uma redução da resistência de qualquer volume condutor (GRIMNES; MARTINSEN, 2008). Então, era esperado uma redução dos valores de resistência durante os períodos de contração e este foi o comportamento observado. Esta redução corrobora com alguns estudos prévios (COUTINHO et al., 2019; LI et al., 2016; RUTKOVE, 2009; ZAGAR; KRIZAJ, 2008). Logo, podemos atribuir uma parte das variações de EIM a essas variações morfológicas do músculo. Contudo, essas mudanças na morfologia muscular durante a contração não são proporcionais à intensidade da contração em contrações acima de 30% de uma contração isométrica máxima. Em contrações acima desses 30% as variações morfológicas são desprezíveis (HODGES et al., 2003). Isto indica que as variações de resistência também são influenciadas por outras características da contração muscular, como os aspectos fisiológicos e bioquímicos. Devido as mesmas razões mencionadas anteriormente, as variações de reatância também apresentam uma relação com a força exercida pelo músculo.

A fim de tentar explicar nossos achados, devemos considerar o que está acontecendo no interior do músculo durante uma atividade muscular muito rápida e como as diferentes intensidades podem interferir nos processos bioquímicos e fisiológicos. Considerando o tempo de contração no protocolo experimental, podemos considerar que as moléculas de ATP foram regeneradas, quase que exclusivamente, pelo sistema creatina-fosfato (ATP-CP) (BROOKS; FAHEY; WHITE, 1996), justamente porque este sistema é capaz de fornecer ATP rapidamente, viabilizando uma contração, forte ou fraca, instantaneamente (MCARDLE et al., 2010). Como a eletroestimulação foi muito curta (1s) e o período de recuperação/repouso foi de 40s, podemos considerar que o músculo teve tempo suficiente para recuperar os estoques de creatina (principal substrato do sistema ATP-CP). Então, assumimos que durante o experimento o

músculo dos ratos contraiu utilizando as moléculas energéticas fornecidas predominantemente pelo sistema ATP-CP.

Observando a Figura 51, pode-se ver que a eletroestimulação provocou uma contração com um aumento muito rápido da força muscular (quase instantâneo). As Figura 51 e Figura 52 também mostram que os sinais de impedância variam numa taxa tão alta quanto o sinal de força e que as amplitudes dessa variações são proporcionais à força exercida. Como dito anteriormente, para que seja possível este aumento de força, é necessário fornecimento de ATP numa taxa muito alta. Uma taxa alta de utilização de ATP implica no acúmulo rápidos de íons produzidos pela hidrólise do ATP e pelas reações do sistema ATP-CP. Esses íons são basicamente prótons de hidrogênio (H^+) e fosfato inorgânico (P_i) (MCARDLE et al., 2010; NELSON; COX, 2004). Esses íons, por possuírem cargas livres, aumentam a condutividade do meio sarcoplasmático. Então, as reações químicas poderiam, além das alterações morfológicas, explicar a redução dos valores de resistência durante a contração. Além disso, diferentes concentrações dos íons associadas às diferentes utilizações de ATP em cada contração (devido às diferentes intensidades de contração), podem estar relacionadas com a forte correlação entre as variações de resistência e de força. E por fim, as altas taxas de variação de impedância durante a atividade do músculo, pode ser um importante indicador de que o sistema ATP-CP seria, no momento, o principal sistema fornecedor de ATP.

As variações de reatância são relacionadas às alterações nas características da membrana celular e às camadas de tecidos (DE LORENZO et al., 1997). No presente estudo as medições foram realizadas diretamente nos músculos e assim, não foram considerados os efeitos das camadas de tecidos como as de tecido conectivo/músculo e/ou tecido adiposo/músculo. Então, assumimos que variações no sinal de reatância foram provenientes, principalmente, por alterações nas características da membrana celular. As membranas celulares guardam uma analogia com o dielétrico de um capacitor, principalmente por armazenarem cargas opostas em cada uma de suas camadas (interna e externa). É importante esclarecer que essa característica elétrica das membranas se refere tanto as organelas celulares quanto a própria membrana plasmática. Shiffman e colaboradores (2013), por exemplo, apresentaram num estudo, um modelo elétrico para as características de resistência e reatância das organelas e com isso foram capazes de melhorar, a partir deste modelo, as estimativas dos dados de impedância. Sendo assim, as mudanças nas propriedades elétricas das organelas podem ser de grande importância para uma melhor interpretação dos dados de impedância e mais precisamente, entender o papel das mitocôndrias e retículo sarcoplasmático que estão intimamente envolvidos nos processos bioquímicos da atividade muscular.

Contudo, considerou-se, neste primeiro momento, somente a membrana plasmática, onde, podemos considerar também a geometria das fibras musculares, que são cilíndricas. Quando o comprimento de um capacitor em formato cilíndrico diminui, sua capacitância também reduz e consequentemente a reatância aumenta (ver equação 13).

$$C = 2\pi\epsilon_0\epsilon_r \frac{L}{\ln(b/a)} \rightarrow X_c = \frac{\ln(b/a)}{j\omega 2\pi\epsilon_0\epsilon_r L} \quad (5.1)$$

onde, C é a capacitância do cilindro, ϵ_0 e ϵ_r são, respectivamente, as permissividades no vácuo e relativa, L é o comprimento do capacitor, a o raio da camada interna do cilindro e b o raio da camada externa do cilindro.

Considerando que a relação entre b/a é praticamente constante e que suas variações podem ser negligenciadas por serem muito menores que as variações no comprimento (L), podemos assumir que quando o músculo contrai a reatância deve aumentar. No entanto, os dados de reatância apresentaram uma correlação de 0,57 com a força muscular que, mesmo sendo estatisticamente significativa, são menores que a correlação obtida com a resistência. Um motivo para esse valor, pode ser a influência limitada que o parâmetro L pode exercer, assim como na resistência, onde acima de uma determinada intensidade de contração, as variações de comprimento são praticamente nulas.

É importante notar que as características elétricas passivas da membrana não são afetadas pelas trocas iônicas provenientes das bombas de Na/K e Ca^{++} , uma vez que essas alterações são originadas pelas variações das propriedades elétricas ativas da célula. Contudo, atividades musculares com um maior tempo de duração, podem permitir que canais sejam abertos na membrana celular, principalmente por sinalização enzimática, a fim de permitir a passagem de íons e substâncias específicas através da membrana celular (NELSON; COX, 2004). Sendo assim, se uma certa quantidade de íons puder atravessar a membrana celular a sua permissividade pode aumentar, embora esta hipótese precisaria ser testada.

Os dados relacionados ao ângulo de fase são utilizados em outros estudos porque poderiam reduzir a influência das mudanças de tamanho e formato do músculo nos resultados de impedância (LI et al., 2016). Nossos resultados mostraram que o comportamento da fase foi similar ao da reatância, inclusive, apresentando praticamente a mesma correlação, 0,57 e 0,53 (ver Tabela 5).

Observando os valores do coeficiente b da reta de regressão (ver Tabela 5) podemos perceber que as alterações morfológicas têm maior influência nos dados de impedância nas contrações de baixa intensidade. Então, a impedância do músculo é influenciada principalmente

quando o músculo deixa a condição de repouso e contrai. Por exemplo, um estímulo de 2 Hz apresentou uma variação de reatância e fase entorno de 50% da variação total destes parâmetros. Mesmo a resistência, apresenta um coeficiente b que indica que 35% das variações de resistência já ocorrem nas contrações menos intensas. Contudo, o coeficiente de determinação e o coeficiente angular, mostram que as variações de resistência podem ser explicadas 58% pela intensidade da contração, um valor consideravelmente maior que 33% (reatância) e 28% (fase) dos outros parâmetros.

6.2 Fase II - Estimulação de 100s com frequência fixa correspondente a 30% da F_{max} .

Para iniciar a discussão dos resultados é importante apresentar algumas considerações relevantes para interpretação dos mesmos nesta fase. Primeiramente, tem que ser entender que o protocolo de eletroestimulação não gerava uma contração máxima e desta forma, o músculo não entrava rapidamente em processo de fadiga. Para confirmar que o músculo não entrou em processo de fadiga a Figura 61 mostra que mesmo após 10 minutos de estimulação o músculo continua produzindo uma força com intensidade semelhante à força produzida em 100s. Além disso, nenhum evento indicativo de processo de fadiga local como, incapacidade de produção de força ou redução muito grande da intensidade de força (THEOFILIDIS et al., 2018; WAN et al., 2017), foi identificado. Outra característica importante é que o protocolo foi intervalado. Uma contração contínua acelera os processos de fadiga, já no protocolo aplicado, para cada 1s de estímulo o músculo permanecia 1s em repouso e nesses momentos de repouso o músculo recuperava e/ou deixava de consumir os principais substratos dos sistemas energéticos (MCARDLE et al., 2010), possibilitando uma atividade muscular prolongada.

Em contrapartida, por se tratar de um estímulo elétrico externo, uma vez que o potencial elétrico percorre a membrana celular, todas as unidades motoras são ativadas (GORGEY et al., 2009), diferentemente de uma contração voluntária que, por sua vez, utiliza estrategicamente as unidades motoras necessárias para realizar a contração desejada e conseqüentemente otimiza a utilização de ATP. Logo, essa característica de utilizar todas as unidades motoras a cada contração tende a implicar num maior consumo energético por contração e conseqüentemente, ao final do protocolo.

Também foi visto nos gráficos da Figura 58 que os valores de força atingiram seu ápice com o decorrer da estimulação e não logo no primeiro estímulo e, considerando que a intensidade da força produzida pelo músculo está diretamente relacionada com a quantidade e a taxa de utilização de ATP (CHASIOTIS; BERGSTRÖM; HULTMAN, 1987), pode-se constatar que estes

parâmetros variaram durante a execução do protocolo. Uma vez que houve uma variação nas quantidades e taxas de ATP durante a eletroestimulação, há de se considerar que diferentes sistemas de regeneração de ATP tiveram uma atuação predominante em diferentes momentos do protocolo.

Então faz-se necessário tentar compreender a atuação dos sistemas energéticos durante uma atividade submáxima de intensidade baixa/moderada e associar as características de cada sistema aos sinais (força, resistência e reatância) e parâmetros (ΔR_{inst} , ΔX_{inst} , ΔR_{rep} , ΔX_{rep}) de impedância disponíveis.

É importante ressaltar que em todos os momentos do protocolo os três principais sistemas de regeneração de ATP (ATP-CP, Glicolítico e Oxidativo) estão ativos e fornecendo ATP ao músculo, embora cada sistema atue como fornecedor predominante de ATP em diferentes momentos e são justamente esses momentos que tentaremos identificar. A Figura 62, retirada do trabalho de Fielder e colaboradores (2016), mostra como os sistemas estão ativos desde o início de uma atividade submáxima com intensidade constante, 40 % da contração voluntária máxima (baixa/moderada), do movimento de flexão plantar, com frequência de 0,3Hz e com duração de 300s e, que justamente durante os 100 primeiros segundos há uma alternância no sistema predominante.

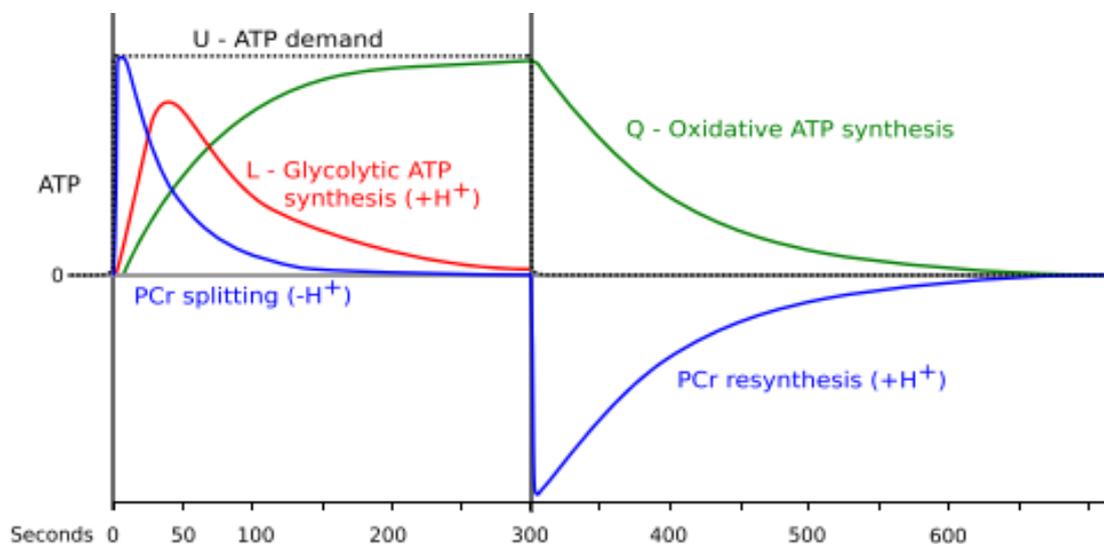


Figura 62. Fornecimento de ATP por cada um dos sistemas energéticos, durante uma atividade submáxima de 300s de duração e durante 400s de recuperação, pós atividade (FIEDLER et al., 2016).

6.2.1 Parâmetros de impedância e metabolismo

Então, antes de interpretar os sinais e os parâmetros de impedância, é necessário interpretar como os sistemas energéticos atuaram durante o protocolo experimental deste estudo,

principalmente, a partir da observação dos sinais de força. Ao analisar a atuação de cada sistema faremos a associação com os sinais e/ou os parâmetros de impedância.

Toda atividade física ou contração muscular quando iniciada, por necessitar de uma quantidade imediata de energia, tem como principal fonte de ATP o sistema ATP-CP. Uma vez ativado, este sistema inicia o processo químico de regeneração de ATP em sua máxima taxa e com o decorrer das contrações essa taxa vai diminuindo. Considerando que a contração não é contínua, pode-se considerar que nos momentos de repouso (1s entre as contrações), o sistema ainda consegue ter uma breve economia das suas reservas além de um rápido momento de recuperação. Sendo assim, podemos admitir que o predomínio do sistema ATP-CP se dá desde o início da eletroestimulação e que se mantém até o consumo de aproximadamente 60-70% dos estoques de creatina-fosfato (PCr), conforme estudo de Fiedler et al., (2016) e, a partir deste momento, quando em atividade moderada, o sistema glicolítico passaria a predominar. Contudo, para o sistema glicolítico ser o principal fornecedor de ATP, há um crescimento ao longo do tempo da sua taxa de fornecimento de ATP. A Figura 63 indica esses momentos no comportamento médio dos sinais deste estudo que podem ser de grande importância para associarmos a EIM com o metabolismo. O momento t_{0+} indicaria o instante taxa máxima do sistema ATP-CP, ou seja, o momento imediato em que se inicia a atividade muscular. O intervalo entre t_{0+} e t_1 de ΔR_{inst} seria análogo ao período de aumento da taxa de fornecimento de ATP pelo sistema glicolítico. Neste momento tanto o sistema ATP-CP quanto o glicolítico estariam contribuindo de forma importante no fornecimento de ATP, embora até o instante t_1 a contribuição do sistema ATP-CP tende a diminuir e do glicolítico a aumentar. Contudo, dados da concentração de PCr e Lactato seriam de fundamental importância para sustentar as hipóteses. Sendo que, os dados de PCr deveriam ser menores e os de Lactato maiores que os valores de repouso. Ainda, considerou-se que nesse período a soma da contribuição dos dois sistemas poderia ser associada ao aumento na produção da força que é representada também no aumento dos parâmetros ΔR_{inst} e ΔX_{inst} . O intervalo t_1-t_2 de ΔR_{inst} representaria o período que o sistema glicolítico inicia a sua predominância. Neste instante vê-se pouca variação nos valores de ΔR_{inst} e ΔX_{inst} , indicando uma espécie de “platô”, onde um sistema consegue manter por determinado tempo a intensidade da contração, neste caso, o sistema glicolítico. Importante frisar que a representação da Figura 63 é uma análise do comportamento médio dos animais, sendo uma interpretação de caráter genérico dos sinais de EIM obtidos, em relação ao metabolismo. Contudo, nota-se, pela análise da Figura 58, que os instantes representados não são facilmente reprodutíveis quando avalia-se os animais individualmente. Os instantes t_1 , t_2 e t_3 , são influenciados pela individualidade de cada animal além de possíveis fontes de erros experimentais que serão expostos mais a frente (seção 6.2.2). Além disso, observa-se que o os

instantes t_1 , t_2 e t_3 , marcados de em ΔX_{inst} são diferentes dos marcados em ΔR_{inst} . Contudo nota-se que o comprimento dos intervalos t_1-t_2 e t_2-t_3 são parecidos. A partir dessa observação, podemos intuir que apesar do comportamento semelhante vistos nos dois gráficos da Figura 63, as variações de reatância ocorrem um pouco antes das de resistência. Esse fato sugere que alterações relativas a capacitância da membrana celular, ocorrem antes das mudanças nas características resistivas nos meios eletrolíticos extra e intracelular. Nota-se que esse comportamento também pode ser percebido nos gráficos da Figura 64.

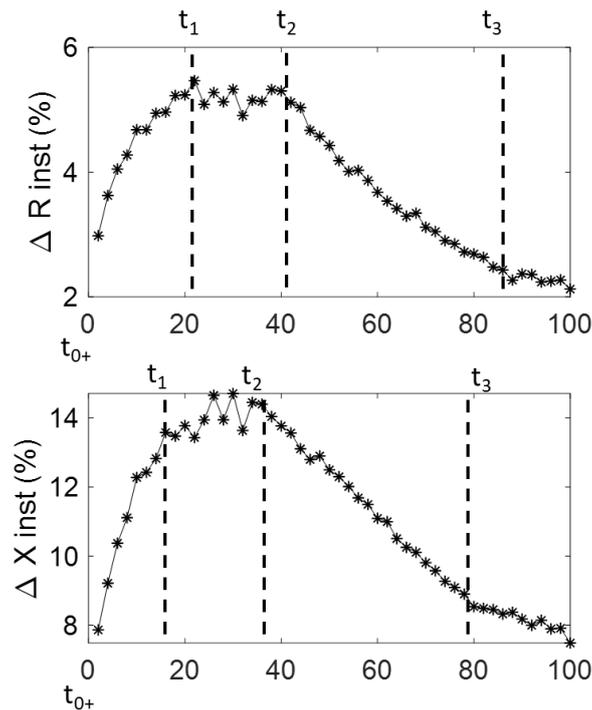


Figura 63. Identificação dos momentos t_{0+} , t_1 , t_2 e t_3 para os valores médios de ΔZ_{inst} dos animais.

O último instante indicado na Figura 63 é t_3 e este, buscou-se associar como o início do predomínio do sistema oxidativo. O intervalo entre t_2 e t_3 é justamente o momento de transição entre os dois sistemas, onde ocorre uma redução rápida na taxa de regeneração de ATP pelo sistema glicolítico e aos poucos o sistema oxidativo vai se tornando o principal responsável pelo fornecimento energético para o músculo. Nota-se ainda que a partir do instante t_3 a derivada de ΔR_{inst} e ΔX_{inst} é aproximadamente zero sugerindo que o sistema como um todo está entrando em equilíbrio entre a necessidade e a disponibilidade energética.

A análise dos parâmetros ΔZ_{inst} se mostrou de grande importância, apesar de ser um resultado cuja interpretação fisiológica das variações de Z se aproxima muito do que já foi discutido na fase I, por se tratar da análise da amplitude da contração. Assim, fatores como intensidade da contração, mudanças morfológicas e fisiológicas, exercem influências

semelhantes ao relatado anteriormente e este protocolo corrobora os achados da fase I, onde a intensidade da força é diretamente proporcional a amplitude das variações de impedância.

Sendo assim, o segundo processamento da fase II apresenta uma variação sempre comparada ao valor de repouso e como essa variação se comporta ao longo do tempo. Esta análise podemos associar com as variações fisiológicas e químicas não instantâneas, que ocorrem de forma mais lenta e durante o todo o protocolo. Em especial, foram destacados dois momentos, ambos indicados na Figura 64. O círculo menor (preto), em $\Delta R rep$, pode ser associado ao predomínio do sistema glicolítico, inclusive está no mesmo intervalo de tempo do intervalo t1-t2 da Figura 63. Neste momento temos os valores mínimos para $\Delta R rep$ também para $\Delta X rep$, contudo $\Delta X rep$ inicia esse platô mínimo um pouco antes de $\Delta R rep$. Pensando nos eventos bioquímicos da atividade muscular, neste mesmo momento tem-se uma redução do pH, devido ao aumento de $[H^+]$ e aumento da $[Lac^-]$, fatores que corroboram para uma redução da R. Neste momento do protocolo, avaliações da $[Lac^-]$ e do pH seriam de vital importância para corroborar a os processos descritos. Considerando o círculo preto em $\Delta X rep$, observa-se, que o platô se inicia momentos antes do visto em $\Delta R rep$. Este fato também sugere que alterações na permissividade da membrana celular ocorrem antes do acúmulo de substâncias no interior da célula. Portanto, o aumento da permissividade da membrana celular para maior captação de substratos aponta para uma redução de $\Delta X rep$.

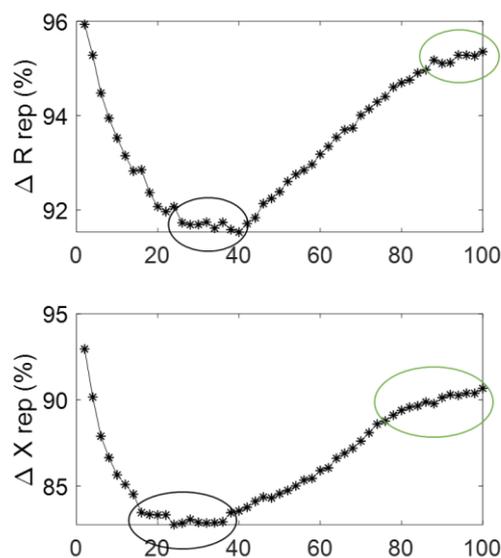


Figura 64. Identificação dos momentos de predomínio do sistema glicolítico (círculo preto) e do sistema oxidativo (círculo verde)

O círculo maior (verde) que assumimos estar associado ao predomínio do sistema oxidativo, mostra um retorno lento dos valores de $\Delta R rep$ e $\Delta X rep$ no sentido dos valores iniciais. Contudo,

tende a estabilizar sem retornar aos primeiros valores e, principalmente aos valores de repouso, como podemos ver na Figura 64. Ainda, assim como no círculo preto, ΔX_{rep} apresenta as características descritas em momentos anteriores à ΔR_{rep} . Sugerindo, de igual maneira, que mudanças a níveis de membrana celular seriam prévios aos acúmulos de substâncias no interior de célula. Importante notar que parâmetro, ΔZ_{rep} , se mostrou mais reprodutível que o ΔZ_{inst} .

Neste momento, a atividade tende a entrar num estado equilíbrio (*steady-state*), com predomínio do sistema oxidativo, e existe uma redução da atividade da via glicolítica como reporta o estudo Fedler e colaboradores (2016). Contudo, a via glicolítica permanece ativa e a produção de lactato continua relativamente alta, uma vez que com o desvio da predominância do sistema energético para o sistema oxidativo, o ânion de lactato passa a atuar também como precursor para a gliconeogênese (síntese de moléculas de glicogênio) no músculo e o fígado, como substrato de energia para o cérebro e respiração mitocondrial (associada ao sistema oxidativo) (Brooks, 2020). O estudo de Fedler e colaboradores (2016) ainda mostra que os níveis de pH permanecem constantes nesta fase da atividade. Então considerando que o pH se mantém constante, podemos atribuir o aumento gradativo de ΔR_{rep} a utilização lactato em outros órgãos, fígado e cérebro, e seu catabolismo na mitocôndria, fazendo com que haja uma pequena redução da $[Lac^-]$ intramuscular. O lactato sistêmico (comumente avaliado na amostra sanguínea) permaneceria com os seus valores próximos aos valores do momento de predomínio do sistema glicolítico. Ainda, o trabalho de Munkvink e colaboradores (2008) apresenta valores de $[Lac^-]$ intramuscular (≈ 6 mmol/kg *wet wt*), próximo aos valores de repouso (≈ 3 mmol/kg *wet wt*), após 15 min de um protocolo de eletroestimulação no músculo solear de ratos wistar e valores de quase uma ordem de grandeza a mais (≈ 20 mmol/kg *wet wt*) quando avaliados em 100 s de exercício. Indicando que a $[Lac^-]$ intramuscular pode reduzir com o decorrer do exercício. Contudo o protocolo do estudo de Munkvik e colaboradores (2008), provocou fadiga, diferente do protocolo deste estudo, e avaliou o lactato num momento muito distante (15 min de atividade) dos estudados no presente trabalho. Sendo assim, somente as medidas da $[Lac^-]$ dentro do intervalo do estudo (em repouso, 30s e 100s de atividade, por exemplo) poderia esclarecer melhor a hipótese descrita.

Em relação a componente reativa da impedância, ΔX_{rep} , pode estar sendo influenciado também pela condição de *steady-state* da contração, levando a variações menores de fluxo sanguíneo, reduzindo as mudanças do efeito capacitivo entre os tecidos (sanguíneo e muscular), e a um comportamento constante da membrana celular, estabilizando suas características de permissividades, transportando para o interior da célula somente os metabólitos necessários para manter o sistema oxidativo ativo, eliminando para o exterior das células algumas toxinas e assim, as características de permissividade da membrana celular, assim como os valores de ΔX

rep. Vale ressaltar que num primeiro momento o sistema oxidativo tem como principal substrato a molécula de glicose, mesmo substrato do sistema glicolítico. Com o decorrer da atividade o sistema oxidativo se torna ainda mais eficiente ao utilizar o ácido graxo como substrato e, como uma molécula de ácido graxo produz grandes quantidades de ATP, a taxa de captação de substrato através da membrana tende a reduzir ainda mais e posteriormente a estabilizar.

Após a discussão feita acima, é importante considerar que o comportamento observado do metabolismo dos animais sofreu influência de algumas características de todo o arranjo experimental. Um exemplo é o fato dos animais serem todos sedentários e por isso não possuem uma otimização do metabolismo energético, o que poderia levar uma rápida e ineficiente utilização dos sistemas de ATP-CP e Glicolítico (THYFAULT et al., 2015), uma vez que os animais, quase nunca estavam exercendo atividades com alto gasto energético. Além do sedentarismo, a massa corporal (250 g a 400 g) e a idade (2 a 4 meses) dos animais podem ter sido fatores de viés dos dados, prejudicando sua reprodutibilidade. Um animal com 2 meses, por exemplo, é considerado jovem e 4 meses adulto, podendo haver diferença grande na atividade metabólica dos animais. As diferenças de massa corporal também podem estar associadas as diferenças de força e metabolismo.

Outro ponto importante é a técnica de eletroestimulação. Esta técnica, por induzir a contração de todas as unidades motoras da região estimulada (GORGEY et al., 2009), pode ter acelerado a depleção da molécula de PCr e por isso, acelerado o predomínio e o consumo do metabolismo da via glicolítica. Além disso, a via glicolítica também pode ter sido predominante de maneira precoce, uma vez que no músculo essa via é mais atuante quando comparado à resultados de análise de metabolismo via VO_2 (FIEDLER et al., 2016). Contudo, mesmo que o comportamento metabólico do músculo em atividade isolada seja diferente comparado à uma atividade global, como corrida, o sistema de EIM, em tempo real, parece ter potencial para identificar os estágios do metabolismo durante o exercício.

6.2.2 *Reprodutibilidade dos resultados*

Os resultados de ΔZ_{inst} e ΔZ_{rep} mostram-se reprodutíveis. A maioria dos animais testados apresentam resultados que se assemelham com os da Figura 59. Contudo, nota-se que como em todo sistema biológico, cada animal possui sua individualidade biológica e o metabolismo de cada um é diferente e por isso, faz-se pertinente que haja diferenças nos tempos dos instantes t_1 , t_2 e t_3 para cada animal.

Outra diferença a partir da individualidade dos animais é a quantidade de fibras tipo I e tipo II (BROOKS, 1998; MCARDLE et al., 2010). Os animais são geneticamente diferentes e o

gastrocnêmio de cada animal, por ser um músculo misto (predominância dos dois tipos de fibras musculares), possui uma quantidade maior de um determinado tipo de fibra. O aumento de fibras do tipo I (lentas) potencializaria o sistema oxidativo, assim como as do tipo II poderia potencializar o sistema glicolítico.

Além da individualidade biológica, podemos apontar algumas questões do ponto de vista metodológico que também podem ser fontes de erro e dificultar a reprodução dos dados, como por exemplo, o local de posicionamento dos eletrodos. É possível que os eletrodos estejam mais próximos à diferentes tipos de fibras e essas fibras acabariam influenciando o sinal de impedância. Mesmo assim, é importante lembrar que tentou-se posicionar os eletrodos no meio do músculo, justamente para que o comportamento do sinal não fosse referente a um tipo de fibra.

6.2.3 EIM dinâmica como avaliador metabólico

Apesar dos dados terem sido adquiridos em ratos e muitos artigos que discutem as vias metabólicas serem a partir de dados de outros mamíferos e humanos, todos, por serem mamíferos, preservam semelhanças nos seus processos metabólicos mesmo com grandes diferenças de tamanho e massa entre as espécies (BROOKS, 1998). Assim pode-se dizer que os resultados deste estudo podem ser extrapolados para os seres humanos.

Sendo assim, a técnica de EIM dinâmica mostrou-se potencialmente útil para avaliação do metabolismo. Atualmente a técnica de espectroscopia de ressonância magnética com marcador fósforo 31 (P^{31} MRS) é a mais utilizada na literatura para análise do metabolismo durante atividade física (FIEDLER et al., 2016). Apesar dos resultados associados às concentrações de metabólitos com PCr e Pi, além do pH, esta técnica exige um processamento para estimativa dos dados brutos que não permite um resultado rápido. O processamento utilizado neste estudo, a partir da técnica de EIM dinâmica, não é de grande complexidade e os parâmetros poderiam ser extraídos rapidamente. Além disso, a técnica utiliza um sinal que pode ser visto em tempo real, processamentos de dados que podem também serem realizados em tempo real e resultados que apresentaram comportamento que podem estar associados as características do metabolismo em atividade submáxima (BAKER; GRANT; ROBERGS, 2010). Então, pode-se dizer que a técnica utilizada neste estudo tem um grande potencial como método alternativo para avaliação do metabolismo durante exercício físico.

Buscando trazer um exemplo prático da utilização da EIM na avaliação do exercício, vamos pegar como exemplo a região do círculo preto na Figura 64. Uma vez que o platô visto em ΔR rep parece indicar o predomínio do sistema glicolítico, e o aumento dos valores de ΔR rep uma

transição para o sistema oxidativo, um avaliador (treinador, fisiologista) poderia orientar a intensidade de um determinado treinamento observando a manutenção desse platô o ou aumento do parâmetro ΔR_{rep} e passar o feedback de forma imediata para o atleta ou aluno, de forma a manter a intensidade da atividade alinhada com o objetivo do treinamento (treinar um determinado sistema energético). Ainda, poderia ser utilizado como avaliação após um período de treinamento, por exemplo: após um período de treinamento com estímulos de altas intensidades com curta duração, um atleta tenderia a deslocar o platô para a direita, indicando que o treinamento de força aprimorou e otimizou o sistema ATP-CP, fazendo com que a [PCr] reduza um pouco mais devagar ao longo do tempo e o atleta passaria a conseguir realizar mais atividades mais intensas por um intervalo de tempo maior.

7 Conclusão

A técnica EIM se mostrou capaz de avaliar músculos saudáveis, principalmente no que se refere as alterações das características elétricas do músculo quando este se encontra em atividade. Deste modo podemos dizer que a técnica possui grande potencial para ser um método auxiliar para os profissionais de saúde e atividade física na busca da melhoria da qualidade do seu trabalho. Mais especificamente, este trabalho fornece algumas contribuições para o estudo da EIM dinâmica. Primeiramente, o protocolo de coleta de dados foi capaz de adquirir a EIM de modo invasivo, minimizando algumas fontes de erro como a interface eletrodo-pele e pele-gordura. O uso da eletroestimulação foi eficaz em evocar contrações musculares com diferentes intensidades de forma controlada para provocar os efeitos bioquímicos e fisiológicos desejados, nos músculos dos animais, por meio da variação dos parâmetros de estimulação como frequência de pulso e frequência dos trens de pulsos. A instrumentação desenvolvida foi capaz de fornecer os sinais com qualidade em tempo real, permitindo uma fácil visualização dos dados brutos, o que permitiu um acompanhamento imediato de toda a coleta de dados e ainda, a identificação de problemas experimentais a tempo de serem eliminados, evitando o armazenamento de dados mal coletados. Ainda, o sistema de impedância mostrou-se com sensibilidade e resolução temporal suficientes para observar pequenas variações de EIM de forma quase instantânea.

Nossos achados da Fase I mostraram que a componente da impedância R foi mais influenciada pelas variações de intensidades de contração muscular, sendo que 58% das variações de impedância podem ser explicados pelas alterações de força produzidas pelo músculo. Os parâmetros analisados foram mais influenciados pelas alterações morfológicas (comprimento, forma e volume) nas contrações menos intensas, ou seja, em baixos percentuais da força máxima, sendo que ao deixar a condição de repouso as alterações de R , X e ϑ dos músculos já sofriam uma alteração entorno de 50%. Também discutimos como os processos bioquímicos e fisiológicos, principalmente os associados ao sistema ATP-CP, como aumento rápido de H^+ e P_i , foram importantes na interpretação dos dados nesta fase, principalmente nas alterações de resistência.

Na fase II pode-se dizer que o protocolo experimental alcançou o objetivo de gerar uma contração submáxima com intensidade moderada que não levasse o músculo rapidamente aos processos de fadiga. Com isso, foi possível provocar uma série de contrações que, em diferentes momentos, foram sustentadas energeticamente por diferentes vias de ATP. Os resultados de EIM foram associados com os sistemas de fornecimento de ATP e parecem apresentar um comportamento onde pode-se identificar a predominância desses sistemas nos diferentes

momentos da atividade muscular. Ainda, calculou-se parâmetros de EIM (ΔZ_{inst} e ΔZ_{rep}) que são possíveis de serem estimados rapidamente (durante a aquisição dos dados) permitindo que a identificação de momentos importantes do metabolismo do exercício seja feita de forma imediata. O parâmetro ΔZ_{inst} apresentou comportamento similar aos dados da Fase I, isto é, aumento de ΔZ_{inst} conforme aumento da força. Além disso, esse parâmetro, assim como na Fase I, avaliou a contração com dados que envolvia somente o próprio ciclo de contração. Também, a partir do processamento de dados realizado, foi possível simplificar a curva de impedância, transformando todo o ciclo de contração em um único dado (ΔZ_{inst} ou ΔZ_{rep}) e a partir do conjunto de dados de ΔZ_{inst} fomos capazes de identificar quatro instantes associados aos sistemas metabólicos. O parâmetro ΔZ_{rep} possui um processamento ainda mais simples, o que facilitaria um processamento em tempo real, com uma interpretação análoga aos sistemas e aos seus processos químicos que variam desde o início da atividade muscular.

As interpretações bioquímicas e fisiológicas abordando como cada via metabólica pode estar influenciando as alterações de EIM são inéditas na literatura e contribuem sensivelmente para o desenvolvimento da interpretação biológica da técnica. No entanto, trabalhos futuros que façam a associação dos resultados com a concentração de metabólitos, enzimas e parâmetros bioquímicos como Lactato, LDH, PCr, pH, podem dar maior robustez aos resultados deste estudo e confirmar a influência dos processos químicos das vias metabólicas no sinal de EIM. Mesmo assim os resultados sugerem um grande potencial do sistema apresentado para fins de medições e avaliações do metabolismo do exercício; apesar de como dito acima, ainda serem necessárias mais pesquisas para verificar se as alterações de impedância estão relacionadas com as concentrações de alguns metabólitos, como faz a técnica de P^{31} MRS. De qualquer forma, o sistema apresentou alterações dos componentes de impedância em tempo real, o que é uma vantagem em relação ao sistema de MRS. Por fim, a relação apresentada neste estudo entre os sinais e parâmetros de EIM e os sistemas energéticos discutidos, mostram que a técnica pode evoluir para um futuro sistema de avaliação do metabolismo do exercício, com *biofeedback* em tempo real, sem a necessidade de procedimentos invasivos, isto é, utilizando- eletrodos de superfície, e independente de um sinal associado à força.

8 Referências Bibliográficas

AARON, R. et al. Effects of age on muscle as measured by electrical impedance myography. **Physiological Measurement**, v. 27, n. 10, p. 953–959, 1 out. 2006.

AHAD, M. A.; RUTKOVE, S. B. Electrical impedance myography at 50 kHz in the rat: Technique, reproducibility, and the effects of sciatic injury and recovery. **Clinical Neurophysiology**, v. 120, n. 8, p. 1534–1538, ago. 2009.

ALVARENGA, R. L. DE. **Estimativa não invasiva do limiar de lactato usando espectroscopia por impedância elétrica**. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2008.

ATHERTON, P. J. et al. Selective activation of AMPK-PGC-1alpha or PKB-TSC2-mTOR signaling can explain specific adaptive responses to endurance or resistance training-like electrical muscle stimulation. **FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 19, n. 7, p. 786–788, maio 2005.

BAKER, J.; (MCCORMICK) GRANT, M. C.; ROBERGS, R. Interaction among Skeletal Muscle Metabolic Energy Systems during Intense Exercise. **Journal of nutrition and metabolism**, v. 2010, p. 905612, 6 dez. 2010.

BARSOUKOV, E.; MACDONALD, J. R. **Impedance Spectroscopy: Theory, Experiment, and Applications**. [s.l.] John Wiley & Sons, 2005.

BERTUZZI, R. C. DE M. et al. Lactate metabolism: bioenergetics and muscle fatigue review. **Brazilian Journal of Kinanthropometry and Human Performance**, v. 11, n. 2, p. 226–234, 1 jan. 2009.

BROOKS, G. A. Mammalian fuel utilization during sustained exercise. **Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry & Molecular Biology**, v. 120, n. 1, p. 89–107, maio 1998.

BROOKS, G. A. Lactate as a fulcrum of metabolism. **Redox Biology**, p. 101454, 9 fev. 2020.

BROOKS, G. A.; FAHEY, T. D.; WHITE, T. P. **Exercise Physiology: Human Bioenergetics and Its Applications**. [s.l.] Mayfield Publishing Company, 1996.

BROWN, B. H.; WILSON, A. J.; BERTEMES-FILHO, P. Bipolar and tetrapolar transfer impedance measurements from volume conductor. **Electronics Letters**, v. 36, n. 25, p. 2060–2062, dez. 2000.

CHASIOTIS, D.; BERGSTRÖM, M.; HULTMAN, E. ATP utilization and force during intermittent and continuous muscle contractions. **Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)**, v. 63, n. 1, p. 167–174, jul. 1987.

CHIN, A. B. et al. OPTIMIZING MEASUREMENT OF THE ELECTRICAL ANISOTROPY OF MUSCLE. **Muscle & nerve**, v. 37, n. 5, p. 560–565, maio 2008.

CHING, C. T.-S. et al. Characterization of the muscle electrical properties in low back pain patients by electrical impedance myography. **PloS one**, v. 8, n. 4, p. e61639, 2013.

COUTINHO, A. B. B. et al. An Alternative Electrical Impedance Myography Technique for Assessment of Local Muscular Fatigue. **II Latin American BioImpedance Conference - II CLABIO**, v. 54, p. 24–27, 2015.

COUTINHO, A. B. B. et al. **Behavior of Electrical Resistance in Gastrocnemius Muscle of Rats During Contractions with Different Intensities**. (L. Lhotska et al., Eds.)World Congress on Medical Physics and Biomedical Engineering 2018. **Anais...: IFMBE Proceedings**.Singapore: Springer, 2019

COX, M.; NELSON, D. **Lehninger Principles of Biochemistry**. [s.l: s.n.]. v. 5

DANGELO, J. G.; FATTINI, C. A. **Anatomia Humana Básica**. 2. ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2010.

DE LORENZO, A. et al. Predicting body cell mass with bioimpedance by using theoretical methods: a technological review. **Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)**, v. 82, n. 5, p. 1542–1558, maio 1997.

DELAVAR, H. et al. Skeletal myofiber VEGF is essential for the exercise training response in adult mice. **American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 306, n. 8, p. R586-595, 15 abr. 2014.

EDMINSTER, J. A. **Circuitos Elétricos. Teoria e Problemas Resolvidos**. São Paulo: McGraw-Hill do Brasil Ltda, 1974.

ENOKA, R. M. **Neuromechanics of human movement**. Champaign, IL: Human Kinetics, 2008.

FAUDE, D. O.; KINDERMANN, W.; MEYER, T. Lactate Threshold Concepts. **Sports Medicine**, v. 39, n. 6, p. 469–490, 25 nov. 2012.

FIEDLER, G. B. et al. Skeletal muscle ATP synthesis and cellular H⁺ handling measured by localized 31 P-MRS during exercise and recovery. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 1–15, 26 ago. 2016.

GABRIEL, C.; PEYMAN, A.; GRANT, E. H. Electrical conductivity of tissue at frequencies below 1 MHz. **Physics in Medicine and Biology**, v. 54, n. 16, p. 4863, 21 ago. 2009.

GOBBO, M. et al. Muscle motor point identification is essential for optimizing neuromuscular electrical stimulation use. **Journal of Neuroengineering and Rehabilitation**, v. 11, p. 17, 25 fev. 2014.

GORGEY, A. S. et al. Effects of electrical stimulation parameters on fatigue in skeletal muscle. **The Journal of Orthopaedic and Sports Physical Therapy**, v. 39, n. 9, p. 684–692, set. 2009.

GRIMNES, S.; MARTINSEN, Ø. G. Sources of error in tetrapolar impedance measurements on biomaterials and other ionic conductors. **Journal of Physics D: Applied Physics**, v. 40, n. 1, p. 9, 7 jan. 2007.

GRIMNES, S.; MARTINSEN, Ø. G. **Bioimpedance and bioelectricity basics**. London: Academic, 2008.

GRIMNES, S.; MARTINSEN, Ø. G.; JOHNSEN, G. K. Mutual localization of electrode pairs in a 4-electrode measuring system. **Journal of Physics: Conference Series**, v. 224, n. 1, p. 012074, 1 abr. 2010.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Textbook of medical physiology**. Philadelphia: W.B. Saunders, 1996.

HODGES, P. W. et al. Measurement of muscle contraction with ultrasound imaging. **Muscle & Nerve**, v. 27, n. 6, p. 682–692, jun. 2003.

IKAI, T. et al. Dynamic Electrical Characteristics of the Muscle with the Fatigue during Exercise. In: MAGJAREVIC, R.; NAGEL, J. H. (Eds.). . **World Congress on Medical Physics and Biomedical Engineering 2006**. IFMBE Proceedings. [s.l.] Springer Berlin Heidelberg, 2007. p. 622–625.

IVORRA, A. Bioimpedance Monitoring for physicians: an overview. 2002.

JAFARPOOR, M. et al. Optimizing electrode configuration for electrical impedance measurements of muscle via the finite element method. **IEEE transactions on bio-medical engineering**, v. 60, n. 5, p. 1446–1452, maio 2013a.

JAFARPOOR, M. et al. Optimizing electrode configuration for electrical impedance measurements of muscle via the finite element method. **IEEE transactions on bio-medical engineering**, v. 60, n. 5, p. 1446–1452, maio 2013b.

JOTTA, B. et al. Miografia por impedância elétrica relacionada à fadiga causada por contrações isométricas sustentadas. **Anais do XXIII Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica**, v. 1, p. 1387–1390, 2012.

JOTTA, B. et al. Lactate threshold by muscle electrical impedance in professional rowers. **The Review of Scientific Instruments**, v. 88, n. 4, p. 045105, abr. 2017.

KERN, H. et al. Recovery of long-term denervated human muscles induced by electrical stimulation. **Muscle & Nerve**, v. 31, n. 1, p. 98–101, jan. 2005.

KITCHEN, S.; BAZIN, S. **Eletroterapia: Prática Baseada em Evidências**. 2. ed. Barueri, SP: Manole, 2001.

LI, J. et al. Electrical impedance myography for the in vivo and ex vivo assessment of muscular dystrophy (mdx) mouse muscle. **Muscle & Nerve**, v. 49, n. 6, p. 829–835, jun. 2014.

LI, J. et al. Electrical Impedance Myography to Detect the Effects of Electrical Muscle Stimulation in Wild Type and Mdx Mice. **PLoS One**, v. 11, n. 3, p. e0151415, 2016.

LIAO, T. J.; NISHIKAWA, H. The variation of action potential and impedance in human skeletal muscle during voluntary contraction. **The Tohoku journal of experimental medicine**, v. 173, n. 3, p. 303–309, jul. 1994.

LIMONI, E. L.; ARRUDA, E. J. DE. Effect of neuromuscular electrical stimulation in glycogen muscle reserves because of ingestion of ethanol: a study in rats. **Einstein (São Paulo)**, v. 11, n. 1, p. 83–87, mar. 2013.

MCARDLE, W. D.; KATCH, F. I.; KATCH, V. L. **Exercise Physiology: Nutrition, Energy, and Human Performance**. [s.l.] Lippincott Williams & Wilkins, 2010.

MIN, M. et al. Broadband excitation for short-time impedance spectroscopy. **Physiological Measurement**, v. 29, n. 6, p. S185-192, jun. 2008.

MRÓWCZYŃSKI, W. et al. Changes of the force-frequency relationship in the rat medial gastrocnemius muscle after total transection and hemisection of the spinal cord. **Journal of Neurophysiology**, v. 105, n. 6, p. 2943–2950, jun. 2011a.

MRÓWCZYŃSKI, W. et al. Changes of the force-frequency relationship in the rat medial gastrocnemius muscle after total transection and hemisection of the spinal cord. **Journal of Neurophysiology**, v. 105, n. 6, p. 2943–2950, jun. 2011b.

MUNKVIK, M.; LUNDE, P. K.; SEJERSTED, O. M. Causes of fatigue in slow-twitch rat skeletal muscle during dynamic activity. **American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 297, n. 3, p. R900-910, set. 2009.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Principles of Biochemistry, Fourth Edition with CDROM**. Fourth Edition edition ed. [s.l.] W. H. Freeman, 2004.

NETTER, F. H. **Atlas of Human Anatomy: Including Student Consult Interactive Ancillaries and Guides**. Edição: 6 ed. Philadelphia, PA: Saunders, 2014.

NEVES, C. E.; SOUZA, M. N. A method for bio-electrical impedance analysis based on a step-voltage response. **Physiological measurement**, v. 21, n. 3, p. 395–408, ago. 2000.

PLATONOV, V. N.; BULATOVA, M. M. **A Preparação Física**. Rio de Janeiro: Sprint, 2003.

PUTMAN, C. T. et al. Effects of short-term submaximal training in humans on muscle metabolism in exercise. **The American Journal of Physiology**, v. 275, n. 1, p. E132-139, 1998.

R CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. 2015.

RUTKOVE, S. B. et al. Reference values for 50-kHZ electrical impedance myography. **Muscle & nerve**, v. 38, n. 3, p. 1128–1132, set. 2008.

RUTKOVE, S. B. Electrical Impedance Myography: Background, Current State, and Future Directions. **Muscle & nerve**, v. 40, n. 6, p. 936–946, dez. 2009a.

RUTKOVE, S. B. Electrical impedance myography: Background, current state, and future directions. **Muscle & nerve**, v. 40, n. 6, p. 936–946, dez. 2009b.

RUTKOVE, S. B.; SANCHEZ, B. Electrical Impedance Methods in Neuromuscular Assessment: An Overview. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 9, n. 10, 1 out. 2019.

SANCHEZ, B. et al. Impedance alterations in healthy and diseased mice during electrically-induced muscle contraction. **IEEE transactions on bio-medical engineering**, 24 abr. 2014.

SHIFFMAN, C. A. Adverse effects of near current-electrode placement in non-invasive bio-impedance measurements. **Physiological Measurement**, v. 34, n. 11, p. 1513–1529, nov. 2013.

SHIFFMAN, C. A.; AARON, R.; RUTKOVE, S. B. Electrical impedance of muscle during isometric contraction. **Physiological measurement**, v. 24, n. 1, p. 213–234, fev. 2003.

SHIFFMAN, C. A.; RUTKOVE, S. B. Circuit Modeling of the Electrical Impedance Part I: Neuromuscular Disease. **Physiological measurement**, v. 34, n. 2, p. 203–221, fev. 2013a.

SHIFFMAN, C. A.; RUTKOVE, S. B. Circuit modeling of the electrical impedance: I. Neuromuscular disease. **Physiological measurement**, v. 34, n. 2, p. 203–221, fev. 2013b.

TARULLI, A. et al. Electrical impedance myography in the bedside assessment of inflammatory myopathy. **Neurology**, v. 65, n. 3, p. 451–452, 9 ago. 2005.

TARULLI, A. W. et al. Electrical impedance in bovine skeletal muscle as a model for the study of neuromuscular disease. **Physiological measurement**, v. 27, n. 12, p. 1269–1279, dez. 2006.

TARULLI, A. W. et al. Impact of skin-subcutaneous fat layer thickness on electrical impedance myography measurements: an initial assessment. **Clinical Neurophysiology: Official Journal of the International Federation of Clinical Neurophysiology**, v. 118, n. 11, p. 2393–2397, nov. 2007.

THEOFILIDIS, G. et al. Monitoring Exercise-Induced Muscle Fatigue and Adaptations: Making Sense of Popular or Emerging Indices and Biomarkers. **Sports**, v. 6, n. 4, 26 nov. 2018.

THYFAULT, J. P. et al. Physiology of Sedentary Behavior and Its Relationship to Health Outcomes. **Medicine and science in sports and exercise**, v. 47, n. 6, p. 1301–1305, jun. 2015.

WAN, J. et al. Muscle fatigue: general understanding and treatment. **Experimental & Molecular Medicine**, v. 49, n. 10, p. e384, out. 2017.

WANG, L. L. et al. Electrical impedance myography for monitoring motor neuron loss in the SOD1 G93A amyotrophic lateral sclerosis rat. **Clinical Neurophysiology**, v. 122, n. 12, p. 2505–2511, dez. 2011.

WESTERBLAD, H.; BRUTON, J. D.; KATZ, A. Skeletal muscle: Energy metabolism, fiber types, fatigue and adaptability. **Experimental Cell Research**, Special Issue: Myogenesis. v. 316, n. 18, p. 3093–3099, 1 nov. 2010.

WILMORE, J. H.; COSTILL, DAVID L; DREWS, C. M. **Physiology of sport and exercise**. Champaign, Ill.: Human Kinetics, 1999.

ZAGAR, T.; KRIZAJ, D. Multivariate analysis of electrical impedance spectra for relaxed and contracted skeletal muscle. **Physiological measurement**, v. 29, n. 6, p. S365-372, jun. 2008a.

ZAGAR, T.; KRIZAJ, D. Multivariate analysis of electrical impedance spectra for relaxed and contracted skeletal muscle. **Physiological measurement**, v. 29, n. 6, p. S365-372, jun. 2008b.

Anexo I – Figuras de Calibração

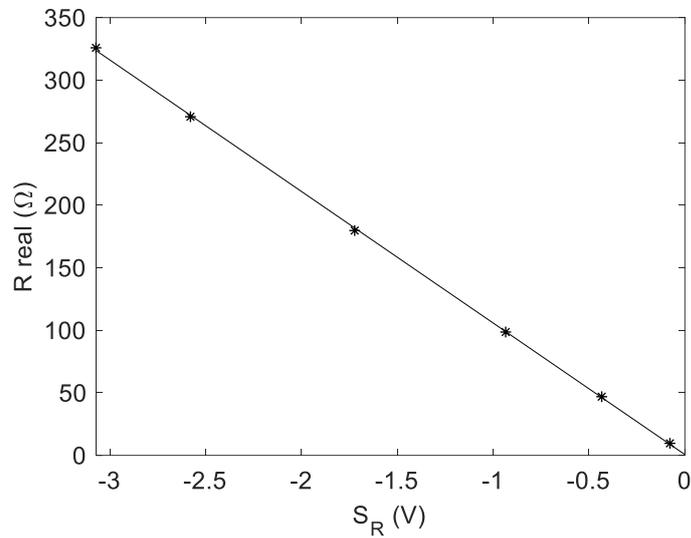


Figura 65. Reta de calibração do sinal S_R . Onde o eixo y é a resistência real e o eixo x o valor de tensão medido na saída do hardware de EIM.

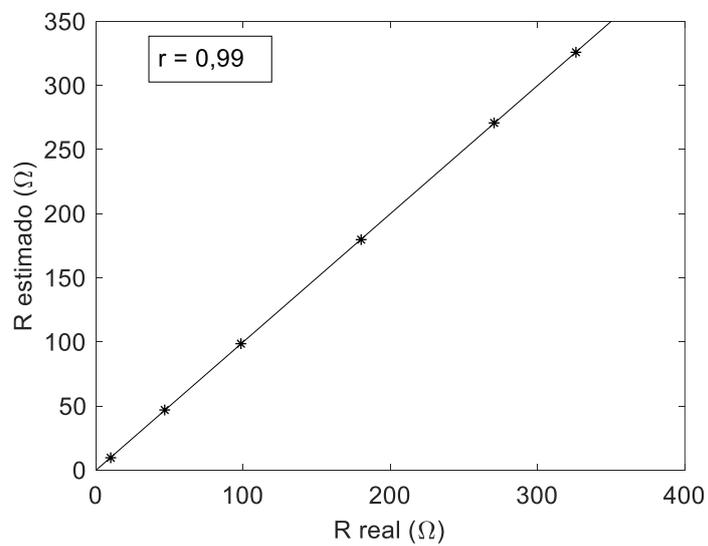


Figura 66. Reta de regressão entre os valores de resistência estimados (eixo y) e os valores reais (eixo x). Acima a esquerda o valor do coeficiente de correlação de Pearson (r), entre os valores estimados e os valores reais.

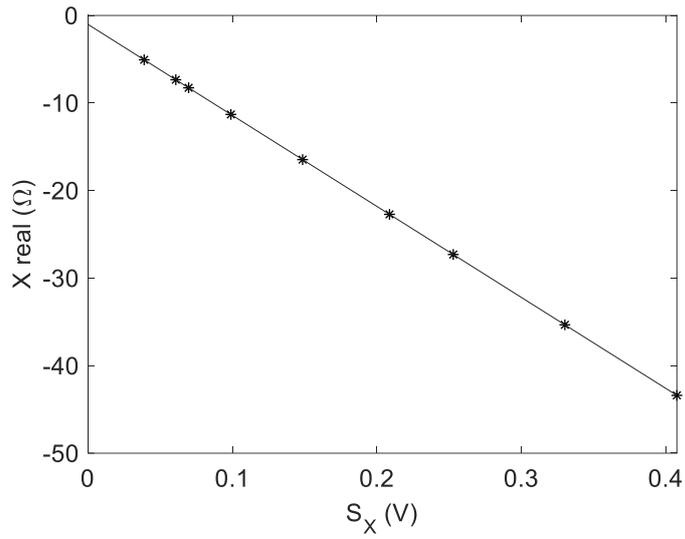


Figura 67. Reta de calibração do sinal S_x . Onde o eixo y é a reatância real e o eixo x o valor de tensão medido na saída do hardware de EIM.

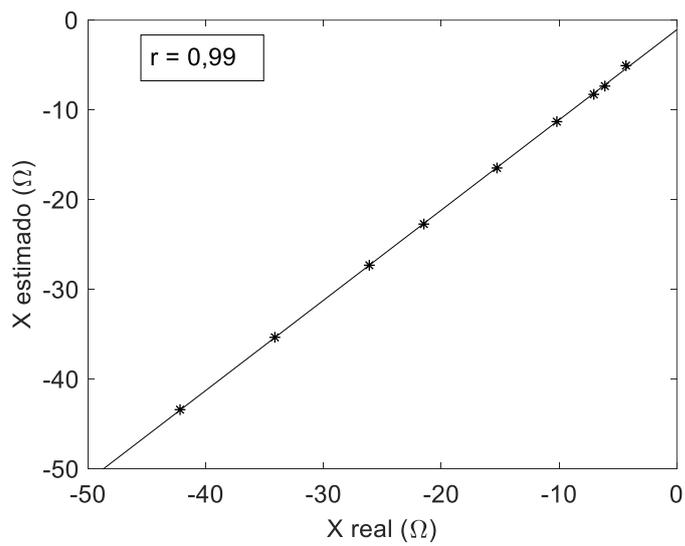


Figura 68. Reta de regressão entre os valores de reatância estimados (eixo y) e os valores reais (eixo x). Acima a esquerda o valor do coeficiente de correlação de Pearson (r), entre os valores estimados e os valores reais.

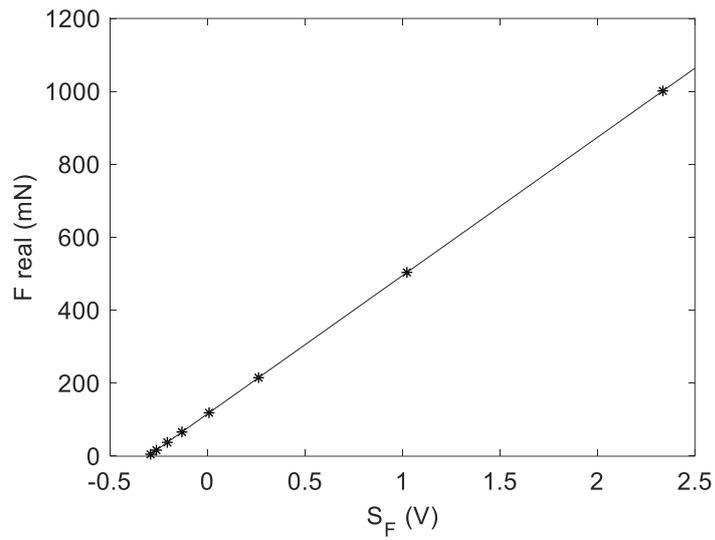


Figura 69. Reta de calibração do sinal S_F . Onde o eixo y é a força real e o eixo x o valor de tensão medido na célula de carga.

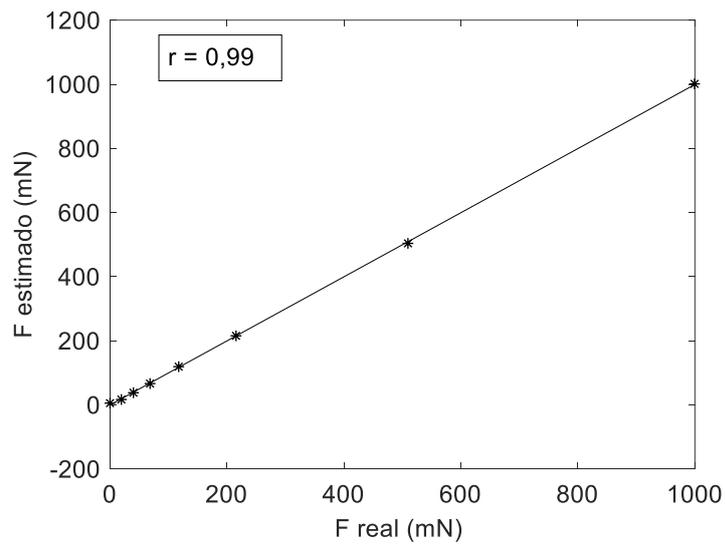


Figura 70. Reta de regressão entre os valores de força estimados (eixo y) e os valores reais (eixo x). Acima a esquerda o valor do coeficiente de correlação de Pearson (r), entre os valores estimados e os valores reais.

Anexo II – Esquemático do hardware de análise de EIM e aquisição de sinais.

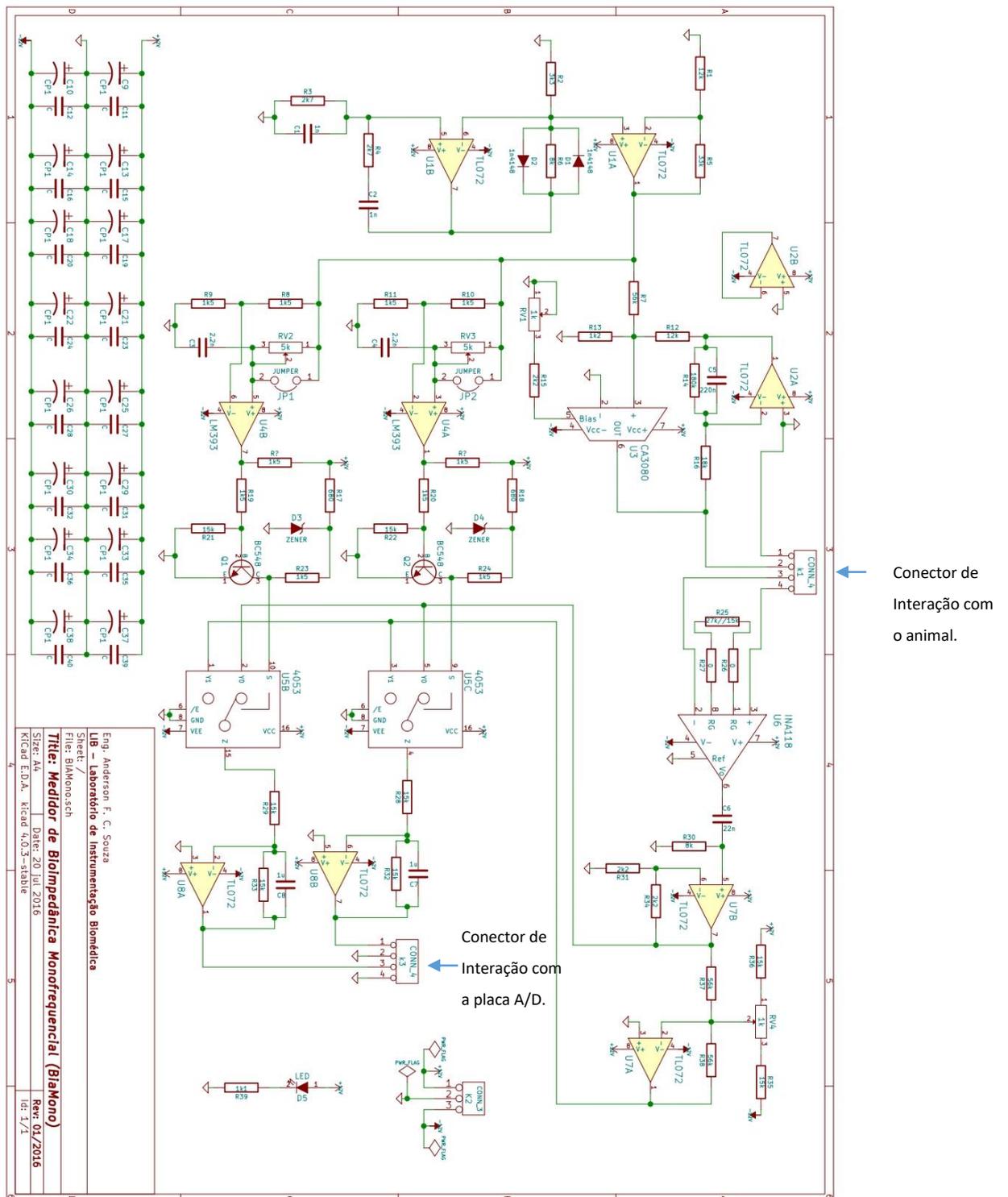


Figura 71. Esquemático elétrico contendo: sistema de análise de EIM e o sistema de aquisição de sinais.

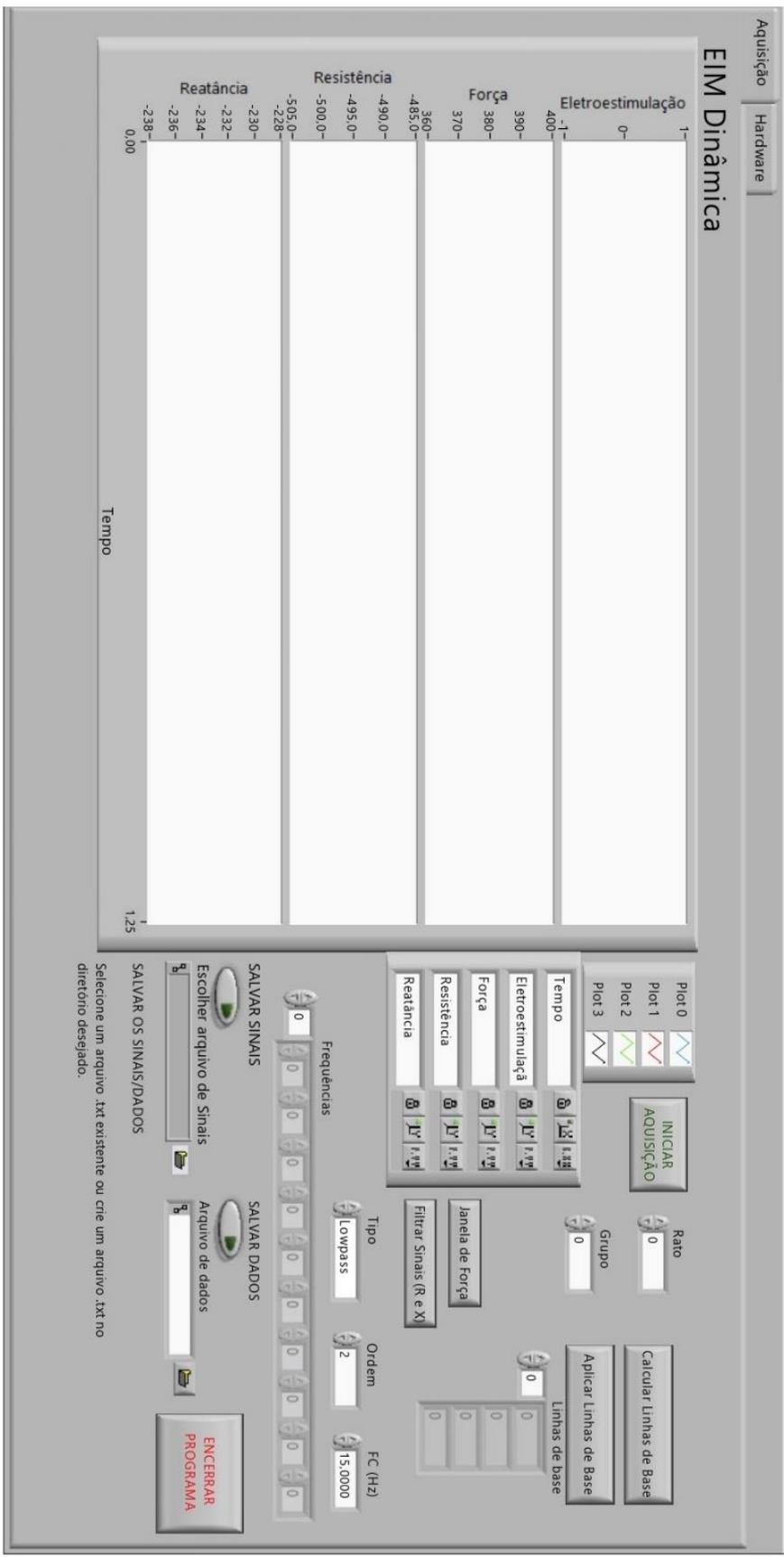


Figura 73. Painel Frontal do Programa de aquisição de sinais.

Anexo IV – Esquemático elétrico do condicionador de sinal conectado à célula de carga.

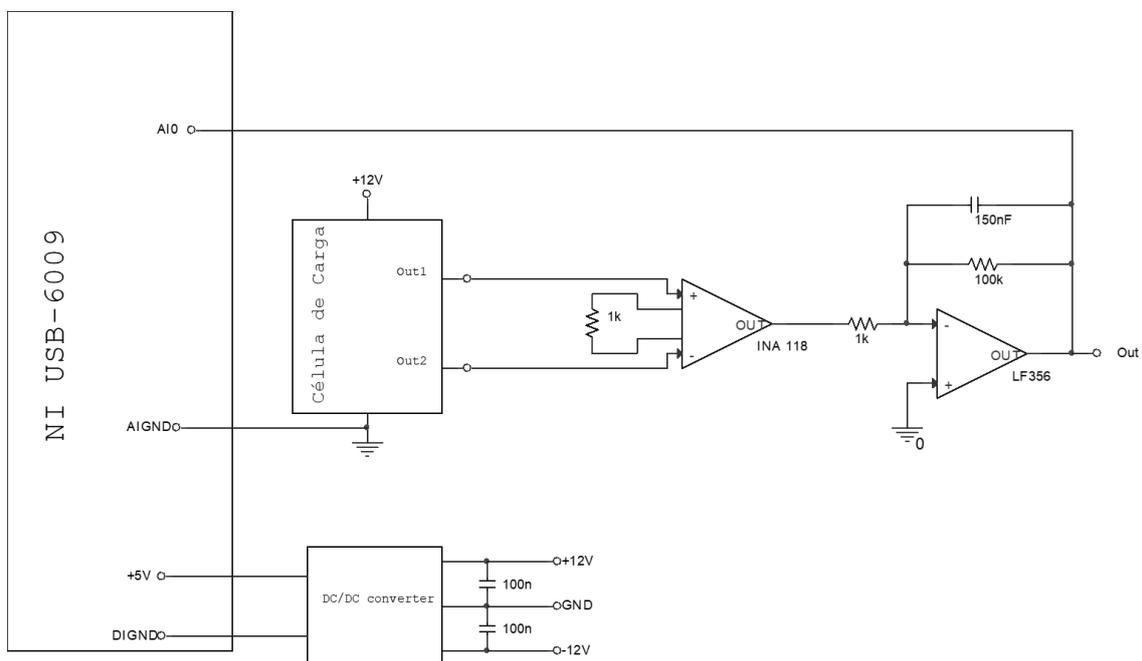


Figura 74. Esquemático elétrico do condicionador de sinal conectado à célula carga.

Anexo V – Esquemático do *buffer* do sistema de eletroestimulação

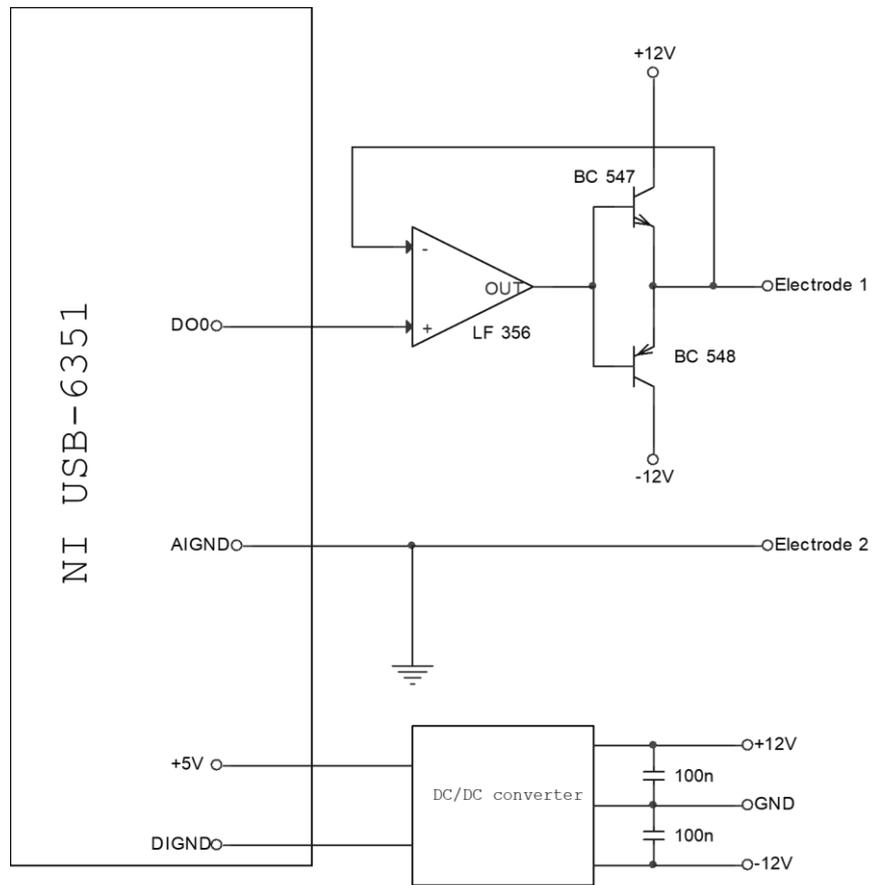


Figura 75. Esquemático elétrico do *buffer* do sistema de eletroestimulação.

Anexo VI – Rotina do programa de controle do sinal D/A da placa NI 6252 (Programa de eletroestimulação) e painel frontal do programa.

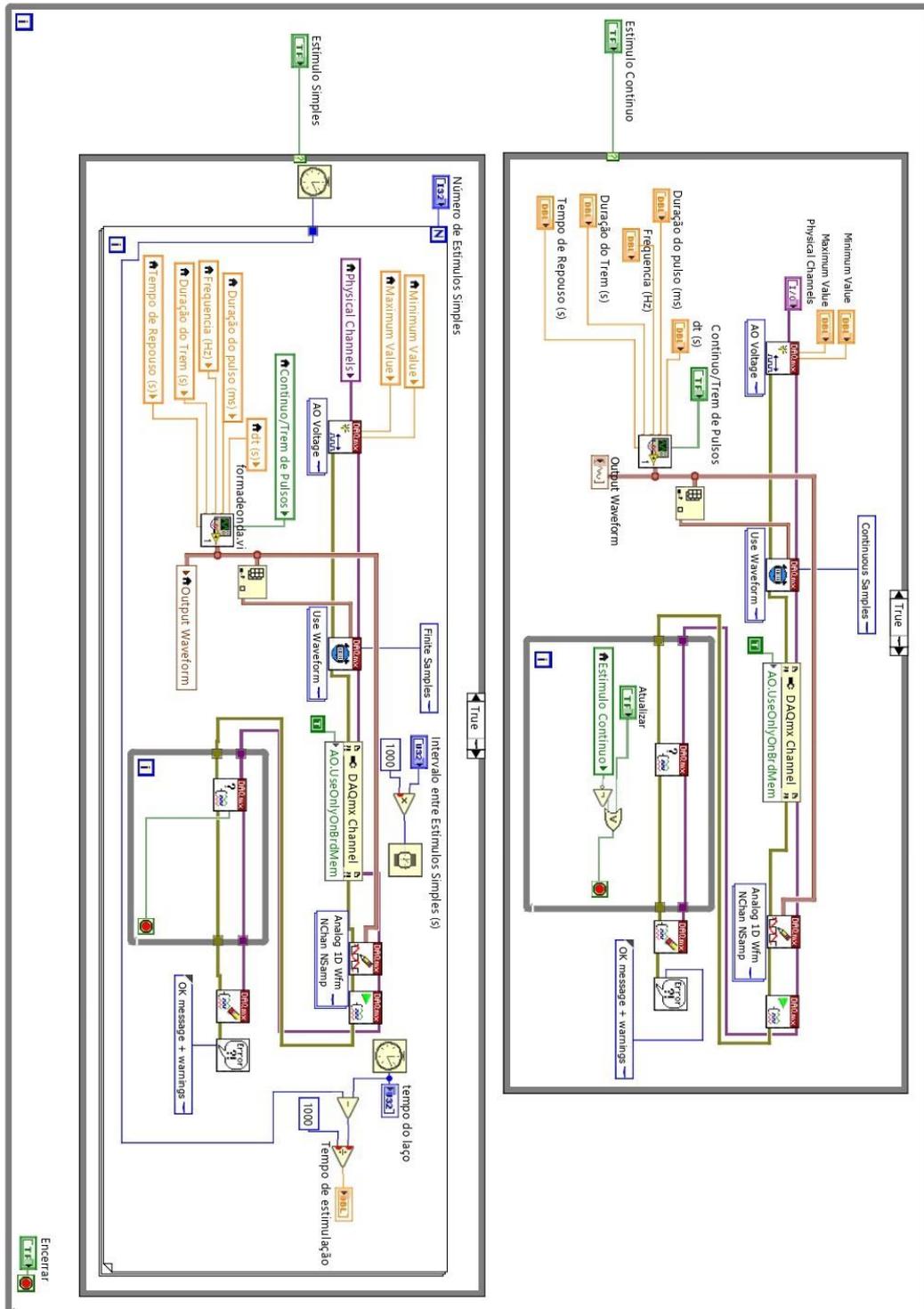


Figura 76. Diagrama de Blocos do programa de controle do sinal D/A da placa NI 6252 (Programa de eletroestimulação)

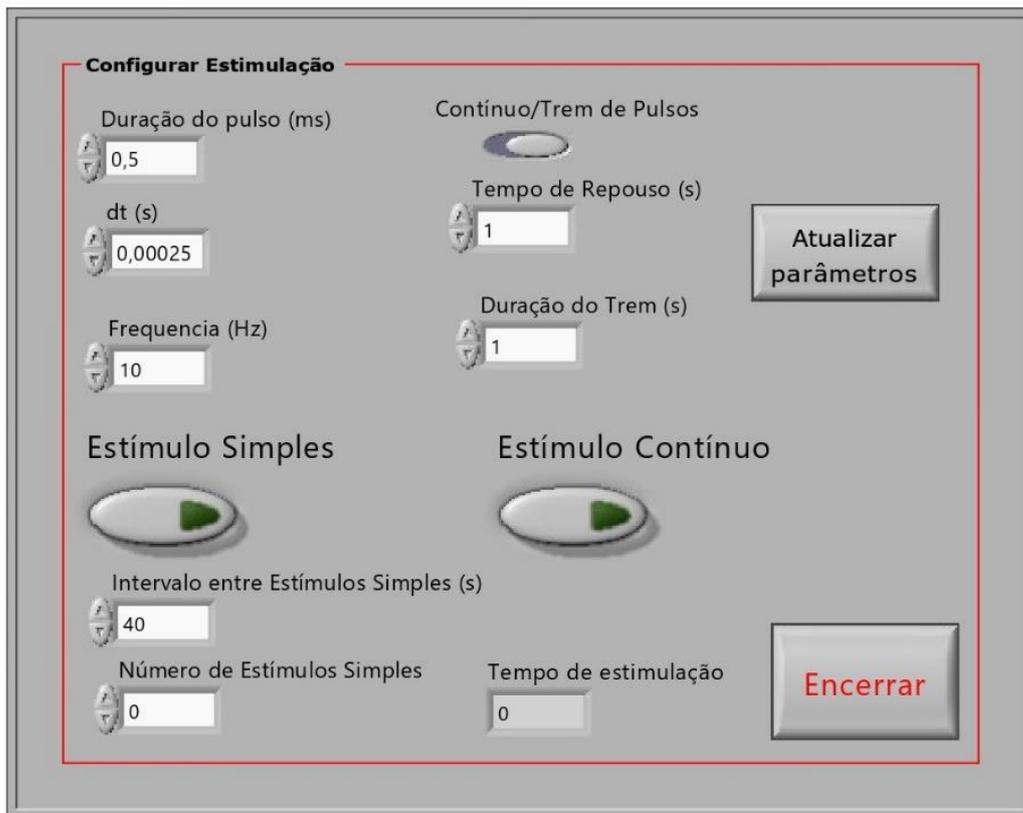
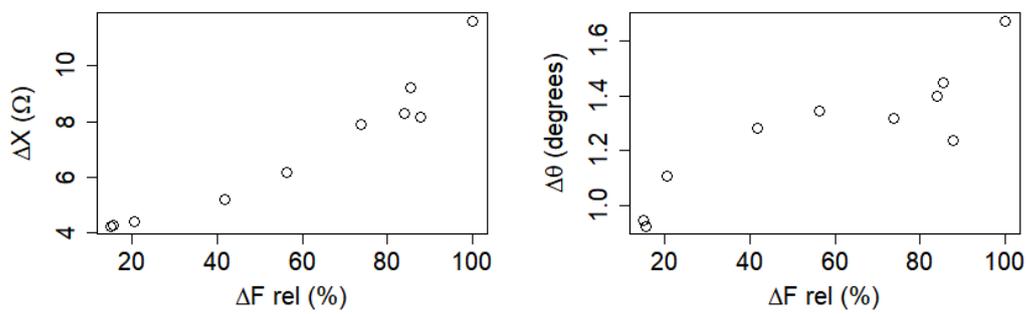
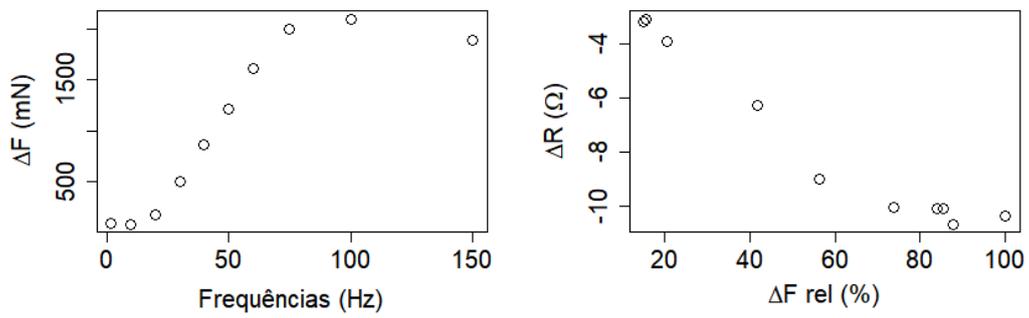
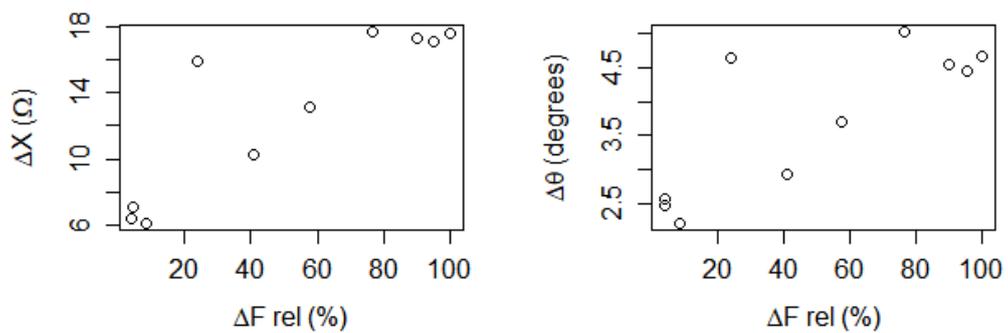
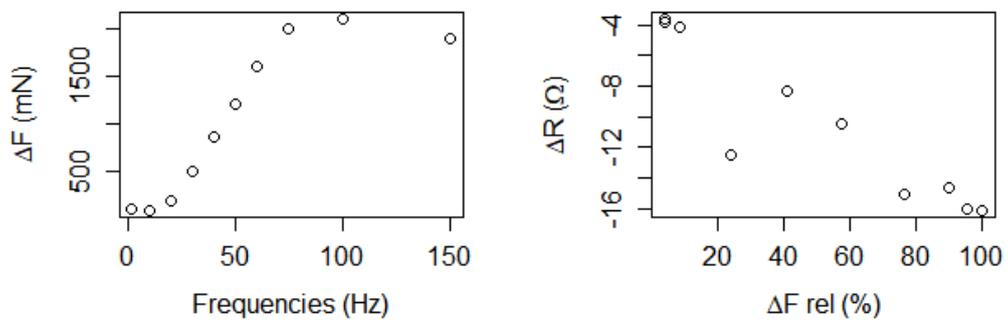


Figura 77. Painel frontal com os parâmetros de controle do sinal de eletroestimulação.

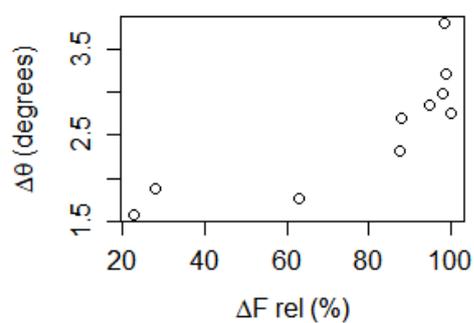
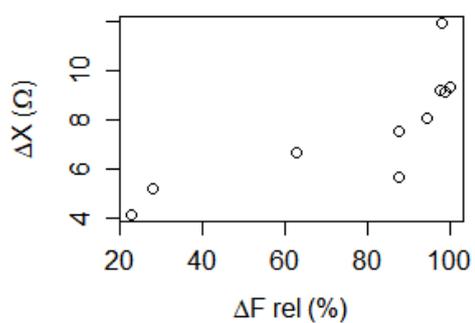
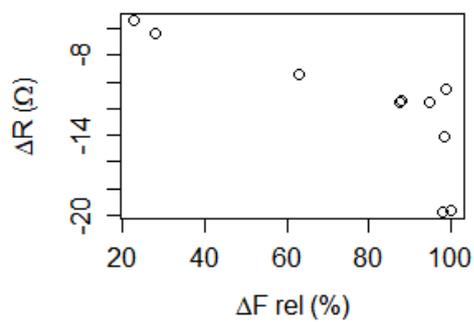
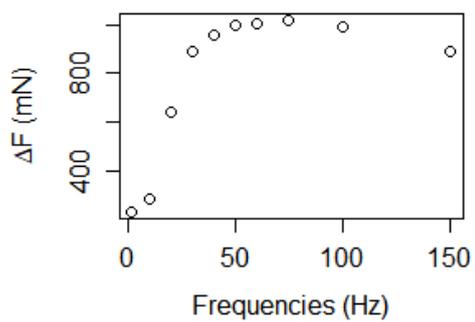
Anexo VII – Resultados individuais da Fase I



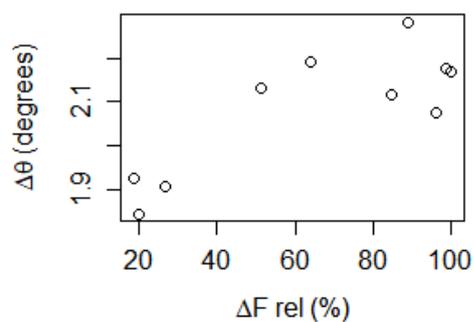
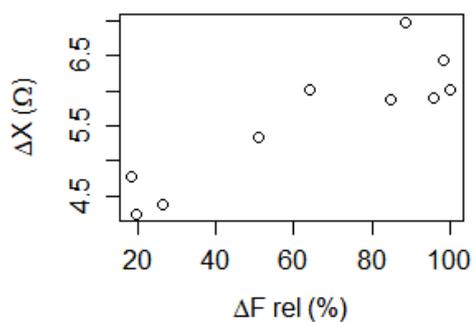
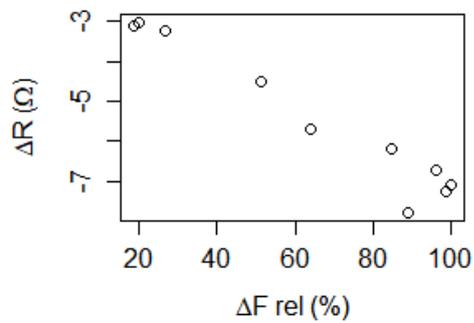
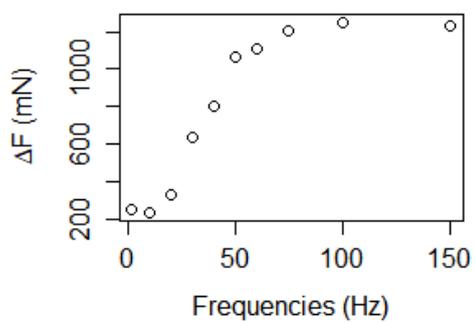
Rato 2



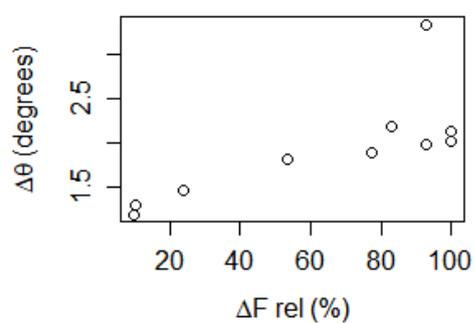
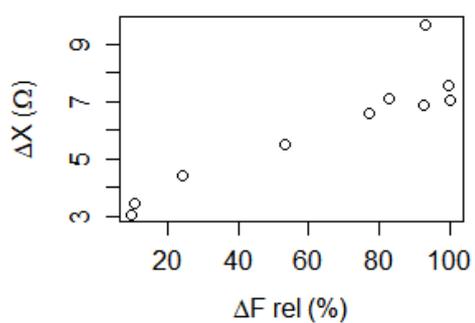
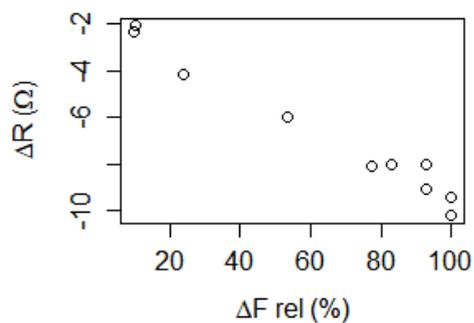
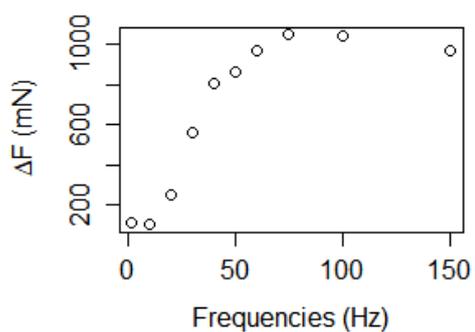
Rato 7



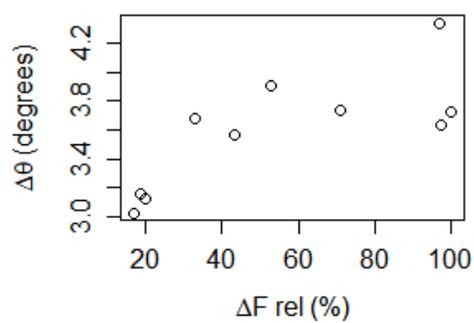
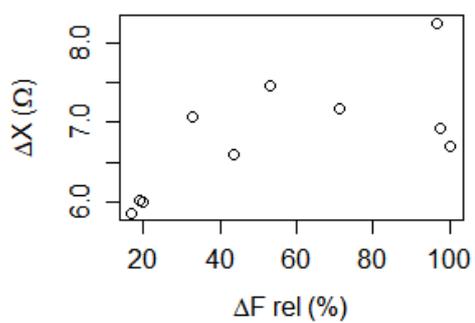
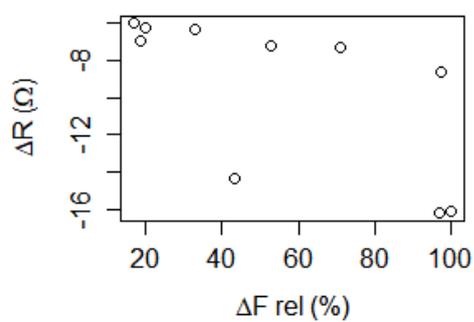
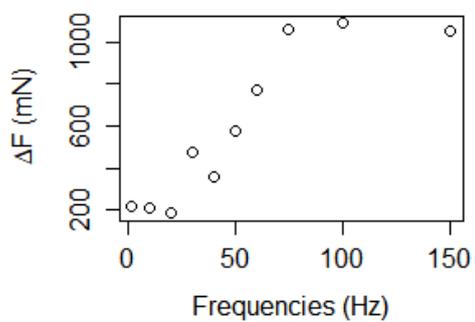
Rato 8



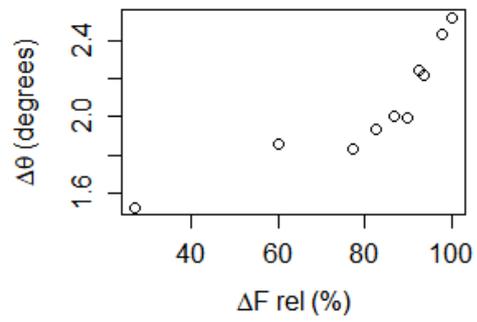
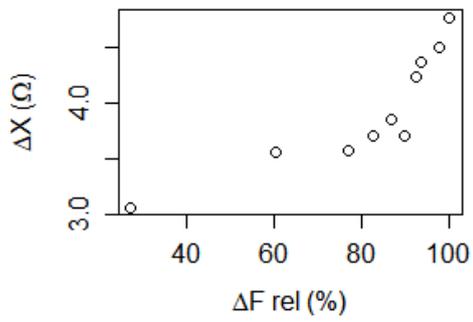
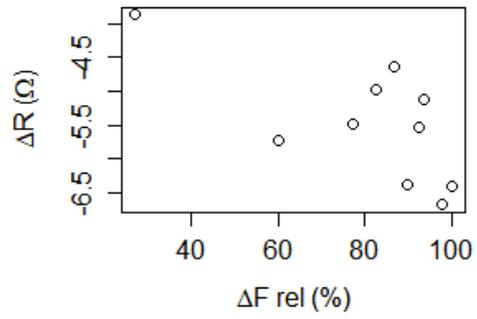
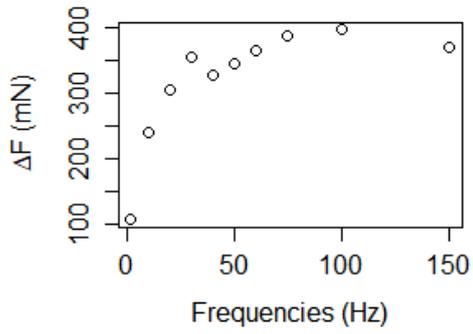
Rato 9



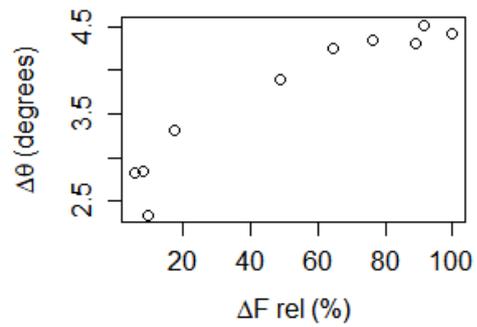
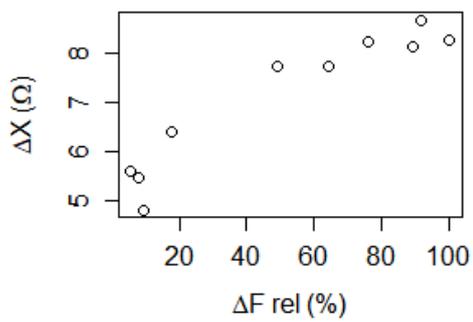
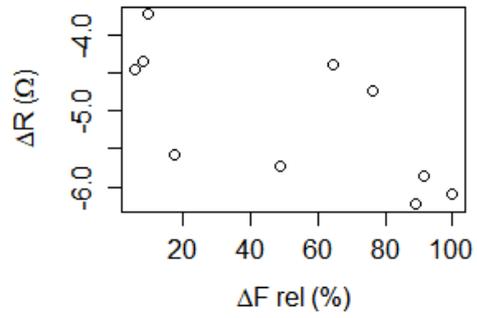
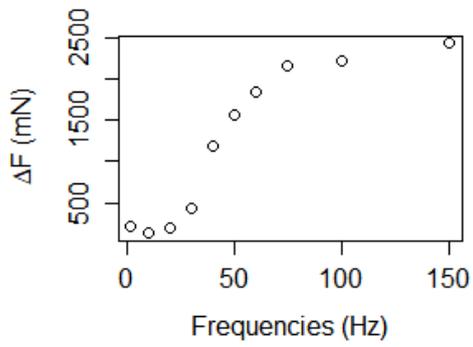
Rato 11



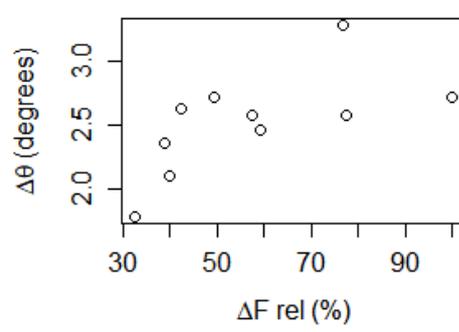
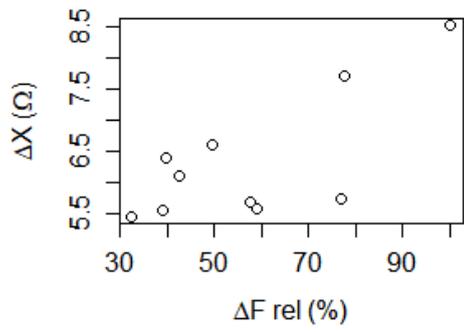
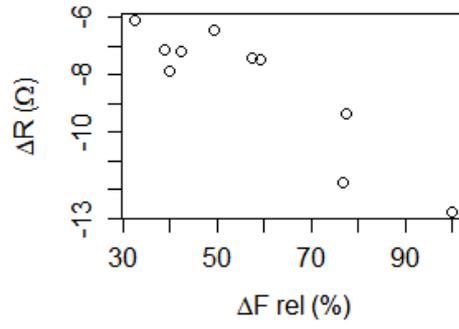
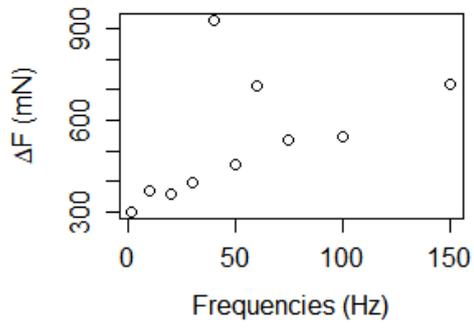
Rato 12



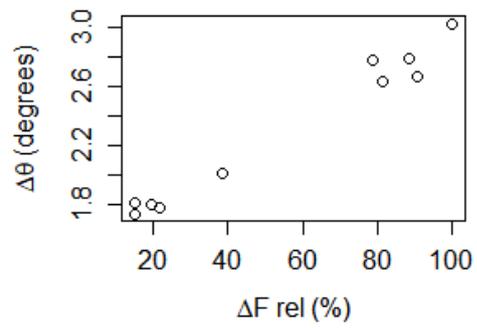
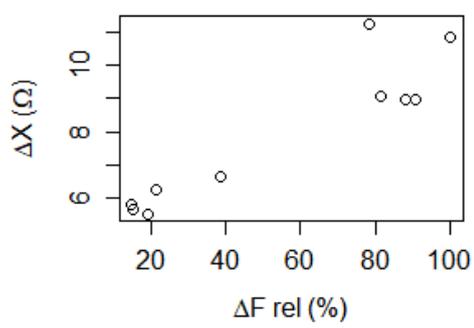
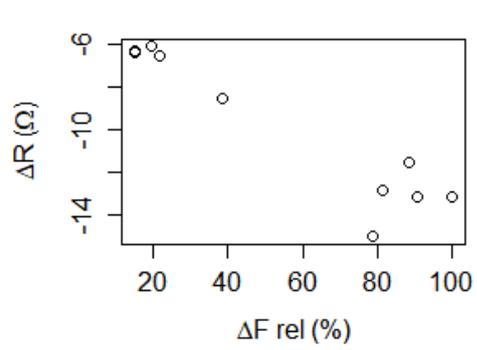
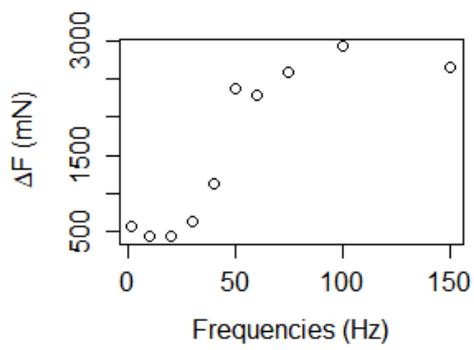
Rato 15



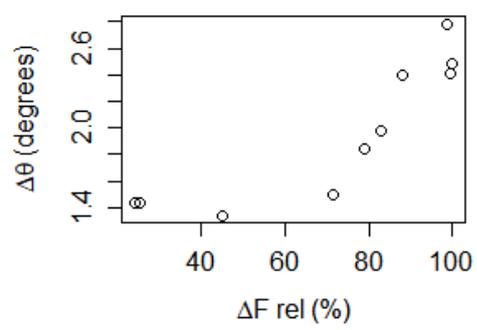
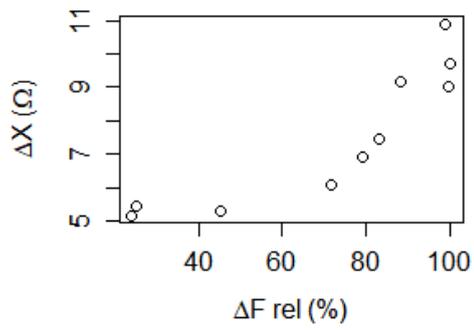
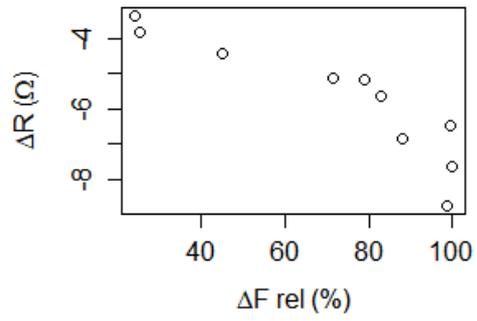
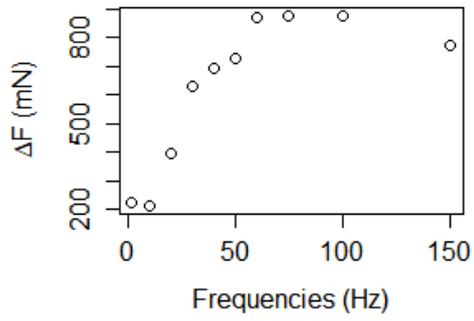
Rato 16



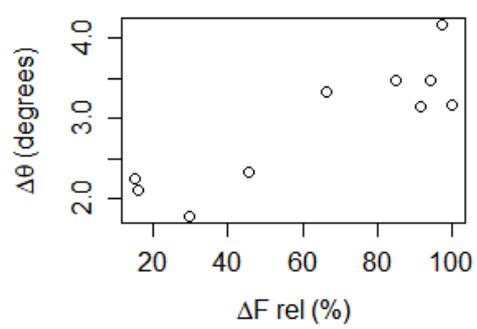
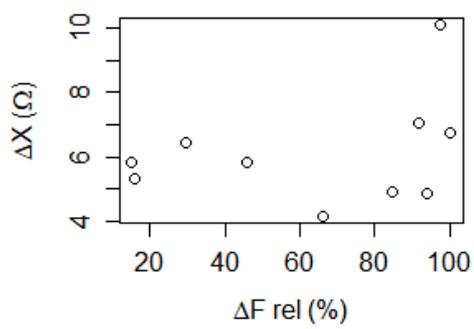
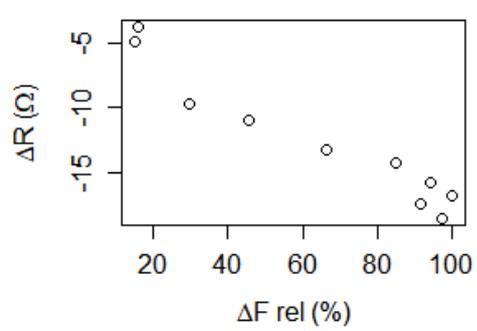
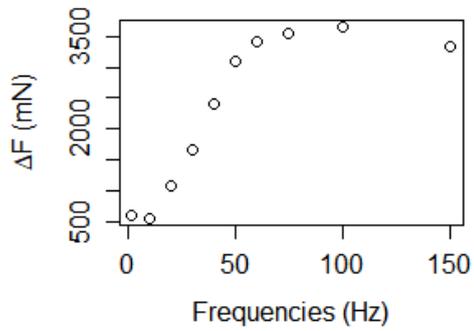
Rato 18



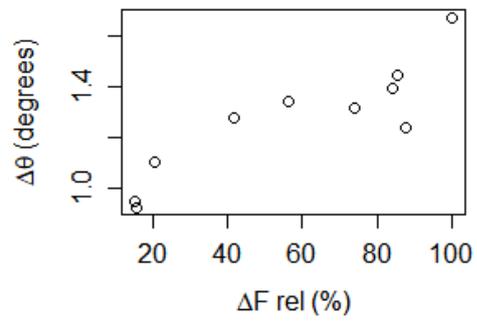
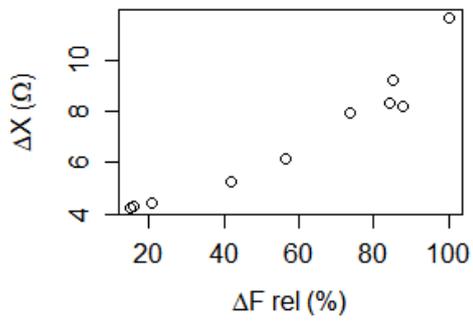
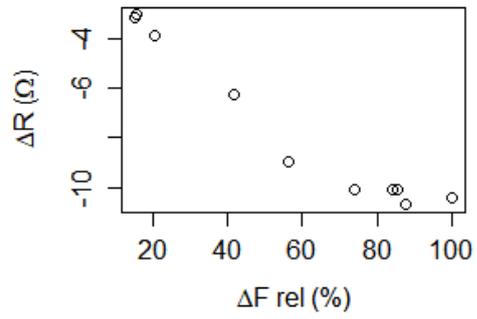
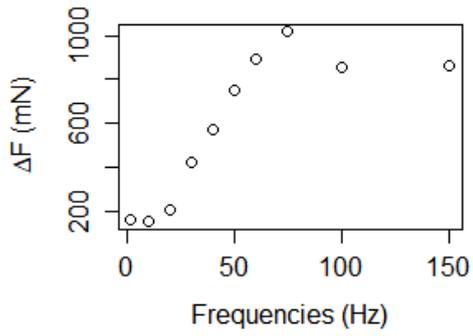
Rato 19



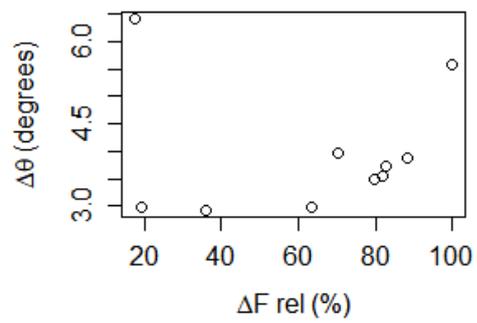
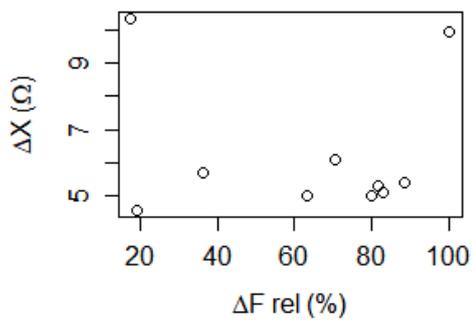
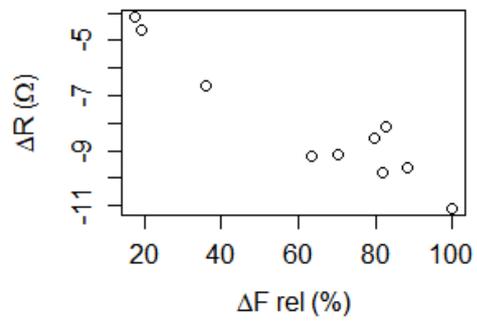
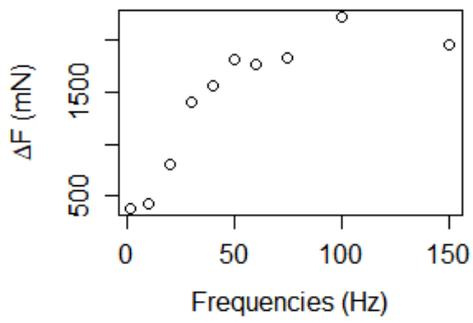
Rato 20



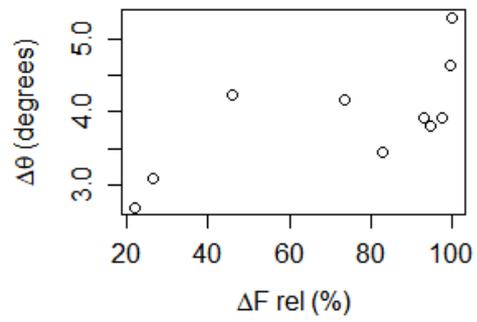
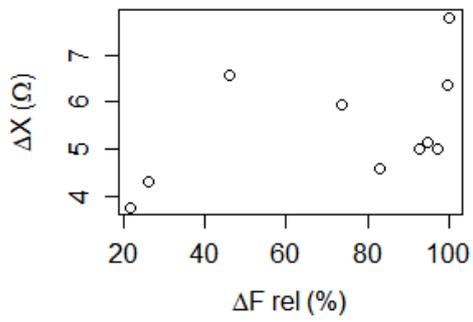
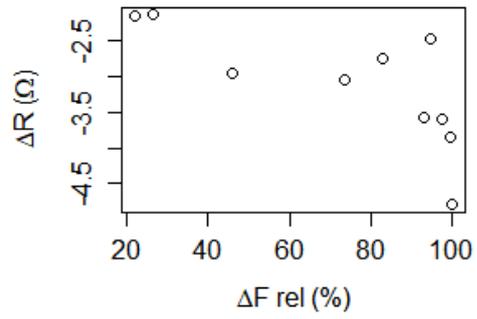
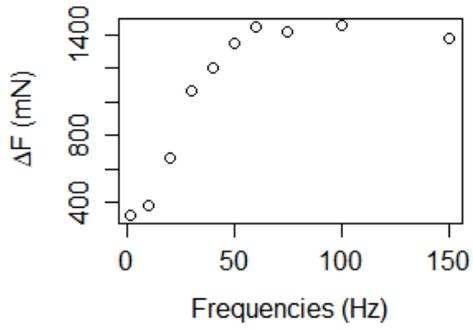
Rato 22



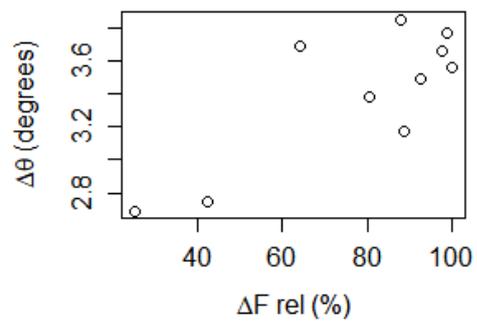
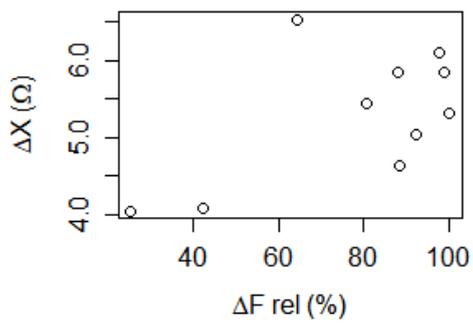
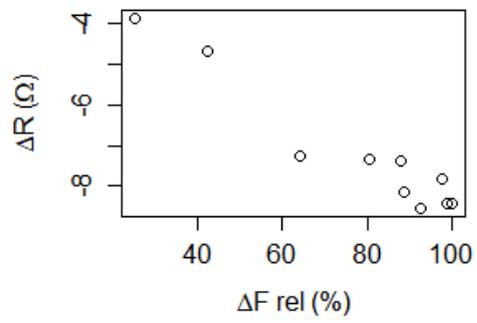
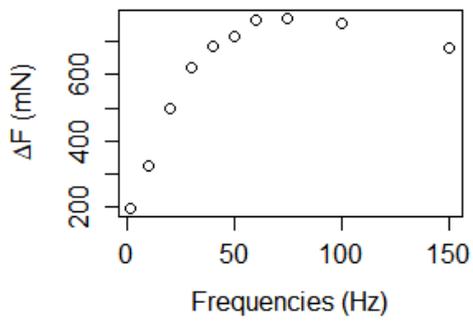
Rato 24



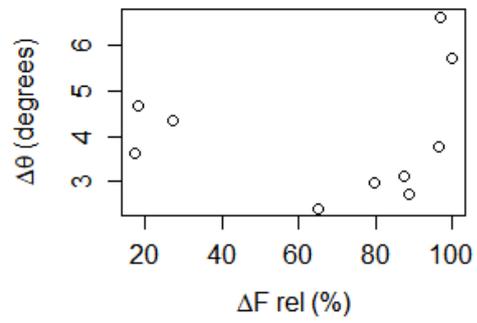
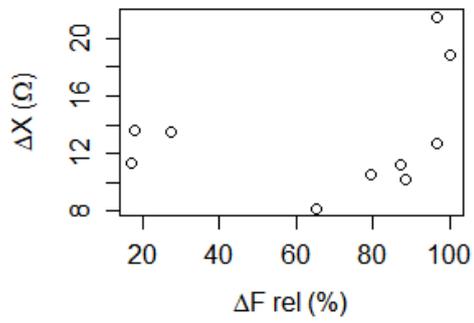
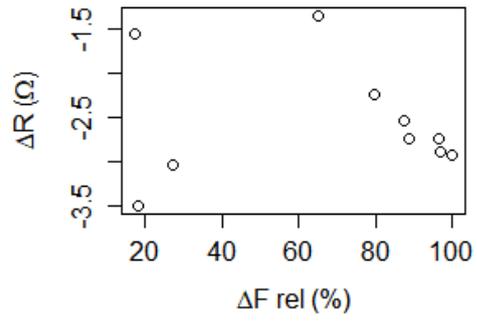
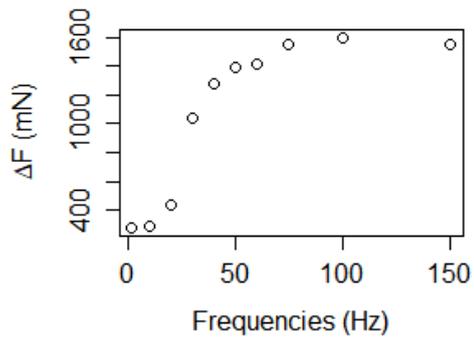
Rato 25



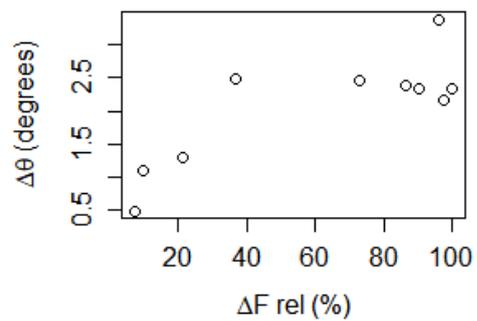
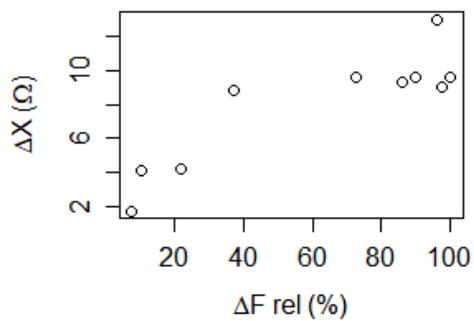
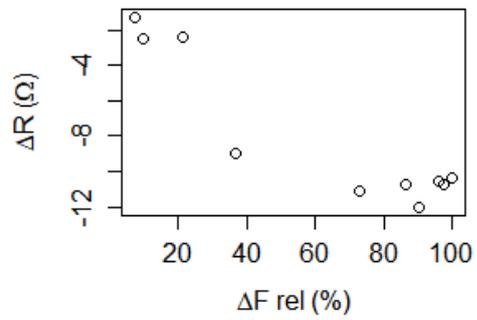
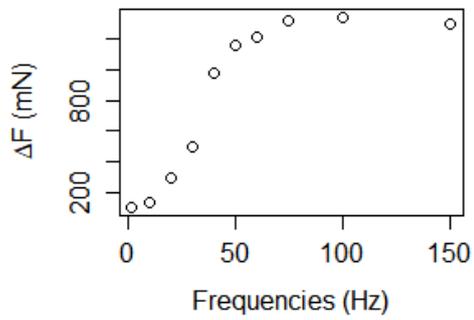
Rato 26



Rato 30



Rato 31



Rato 34

