

ESTIMULAÇÃO DIAFRAGMÁTICA ELÉTRICA TRANSCUTÂNEA MELHORA AS CONDIÇÕES METABÓLICAS DOS MÚSCULOS RESPIRATÓRIOS DE RATOS

CANCELLIERO KM¹, COSTA D^{1,2}, SILVA CA²

¹ PPG – Fisioterapia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP

² PPG – Fisioterapia, Universidade Metodista de Piracicaba, Piracicaba, SP

Correspondência para: Karina Maria Cancelliero, Rua Gomes Carneiro, 875, Centro, CEP 13400-530, Piracicaba, SP,
e-mail: karca@terra.com.br

Recebido: 31/01/2005 – Aceito: 05/09/2005

RESUMO

Objetivo: Avaliar o conteúdo de glicogênio dos músculos respiratórios e o registro eletrocardiográfico (ECG) de ratos submetidos à estimulação diafragmática elétrica transcutânea (EDET). **Método:** Ratos adultos *Wistar* foram divididos em 2 grupos (n=6): controle (C) e tratado com EDET (f=50Hz; T_{ON}/T_{OFF}= 2/2 seg.; T= 400µs, i= 5mA com acréscimo de 1mA a cada 3 min.; t= 20 minutos) durante 5 dias. Após o período experimental, a análise do ECG foi realizada seguida do sacrifício dos animais para a obtenção das amostras dos músculos peitoral, intercostal, diafragma e abdominal, que foram encaminhadas para a análise do conteúdo de glicogênio. A análise estatística foi feita através do teste de normalidade e teste *t de Student* (p<0,05). **Resultados:** A EDET promoveu elevação no conteúdo de glicogênio em 42,85% no diafragma (C: 0,21 ± 0,008 x EDET: 0,30 ± 0,04, p>0,05), 81,2% no intercostal (C: 0,32 ± 0,08 x EDET: 0,58 ± 0,17, p>0,05), 96,7% no peitoral (C: 0,30 ± 0,05 x EDET: 0,59 ± 0,06, p<0,05) e 104,5% no abdominal (C: 0,22 ± 0,01 x EDET: 0,45 ± 0,03, p<0,05) quando comparado ao C. Os resultados da análise do ECG mostraram que não houve alteração nos parâmetros analisados (frequência cardíaca, intervalos QR, QT e QTc) no grupo que recebeu a EDET. **Conclusão:** Além do trabalho sugerir um protocolo de EDET em animais, os resultados mostraram sua eficácia na melhora das condições energéticas da musculatura respiratória sem interferir na dinâmica elétrica cardíaca.

Palavras-chave: estimulação elétrica, glicogênio, diafragma, ECG.

ABSTRACT

Transcutaneous Electrical Stimulation of the Diaphragm Improves the Metabolic Conditions of Respiratory Muscles in Rats

Objective: To evaluate the respiratory muscle glycogen content and electrocardiogram (ECG) records of rats subjected to transcutaneous electric stimulation of the diaphragm (TESD). **Method:** Two groups (n=6) of male adult *Wistar* rats were utilized over a five-day period: controls (C) and TESD treatment (f = 50Hz; T_{ON}/T_{OFF} = 2/2 sec.; T = 400µs, i = 5mA with 1mA increase every three min.; t = 20 minutes). After this period, ECG analysis was done, followed by sacrificing the animals to obtain samples of the pectoral, intercostal, diaphragm and abdominal (A) muscles, which were used for glycogen content analysis. Statistical analysis was performed using the normality and Student t tests (p<0.05). **Results:** In comparison with the C group, TESD presented 42.85% glycogen increase in the diaphragm muscle (C: 0.21 ± 0.008 vs. TESD: 0.30 ± 0.04, p>0.05); 81.2% in the intercostal muscle (C: 0.32 ± 0.08 vs. TESD: 0.58 ± 0.17, p>0.05); 96.7% in the pectoral muscle (C: 0.30 ± 0.05 vs. TESD: 0.59 ± 0.06, p<0.05); and 104.5% in the abdominal muscles (C: 0.22 ± 0.01 vs. TESD: 0.45 ± 0.03, p<0.05). The ECG analysis showed that there were no alterations in the parameters analyzed (heart rate and QR, QT and QTc intervals) in the TESD group. **Conclusion:** This study suggests a protocol for TESD using an animal model. The results showed the efficacy of the protocol for improving the energy conditions in the respiratory musculature without interfering in cardiac electric dynamics.

Key words: electrical stimulation, glycogen, diaphragm, ECG.

INTRODUÇÃO

Historicamente, há um grande interesse em estimular eletricamente o músculo diafragma, havendo relatos da aplicação de estímulos elétricos em vítima apnéica que apresentava asfixia tóxica por carvão¹. Assim, frente à falta de recursos técnicos para determinar parâmetros da corrente elétrica utilizada, houve uma busca por localizar os pontos ideais para a aplicação da estimulação diafragmática elétrica transcutânea (EDET) em humanos. Foi proposto que o estímulo deveria ser aplicado entre os músculos escaleno e esternocleidomastóideo de cada lado do pescoço por representar o melhor ponto para estímulo do nervo frênico e conseqüente estimulação do diafragma. Esta técnica já foi estudada em humanos neonatos e portadores de poliomielite, com o objetivo de promover a contração muscular diafragmática^{2,3}.

Na década de 80, foi realizado um trabalho pioneiro com pacientes portadores de disfunções musculares diafragmáticas onde se implantou cirurgicamente um microestimulador elétrico nas proximidades do nervo frênico gerando um marcapasso frênico, cuja aplicação teve objetivo de induzir contrações diafragmáticas e melhorar a ventilação de pacientes apresentando diferentes estados patológicos, como por exemplo, disfunções neuromusculares ou portadores de traumatismo raquimedular alto^{4,5}.

Concomitante à utilização do marcapasso frênico tornou-se necessário a investigação de diferentes parâmetros elétricos, os quais não provocassem degeneração neural. Neste contexto experimentos foram realizados com cães monitorados eletroneuromiograficamente sendo proposto três pontos motores para o nervo frênico, assim definidos: região do sexto, sétimo e oitavo espaços intercostais da linha média axilar, região paraxifóidea e a base do pescoço entre o escaleno e o esternocleidomastóideo de cada lado⁶. Deste experimento ficou o consenso de que impulsos de baixa intensidade de corrente estimulam o diafragma no ponto da região paraxifóidea e o nervo torácico longo na região do sexto, sétimo e oitavo espaços intercostais da linha média axilar, por outro lado, impulsos de alta intensidade estimulam os músculos abdominais no ponto paraxifóideo e o diafragma nos pontos do sexto, sétimo e oitavo espaços intercostais da linha média axilar.

Uma vez que se trata de corrente elétrica aplicada na caixa torácica o procedimento não deve repercutir em alterações na hemodinâmica ou no ritmo cardíaco. Para dirimir esta dúvida foram realizados experimentos com cães, sendo determinado que o valor seguro da largura do pulso da corrente para contrair o diafragma deveria estar entre 0.1ms - 10ms^{7,8}. O passo seguinte foi avaliar sua aplicabilidade em humanos portadores de disfunção diafragmática variada utilizando-se análise via eletroneuromiografia respiratória e pressão transdiafragmática com balões intraesofágicos. Para tal, foram

escolhidos os pontos situados na base lateral do pescoço esquerdo e direito e a frequência utilizada foi de 1 Hertz (Hz) e a largura de pulso de 0,1 milissegundo (ms). O estudo revelou que o procedimento foi eficaz no condicionamento muscular diafragmático beneficiando 95% dos pacientes com disfunções diafragmáticas^{9,10}.

Na década de 90, foi publicado um protocolo de estimulação diafragmática elétrica transcutânea aplicado a humanos, que consistia dos seguintes parâmetros: corrente modulável para ajuste do tempo de subida igual a 1 segundo, tempo de sustentação da contração igual a 1 segundo, e tempo de relaxamento igual a 2 segundos; a frequência da corrente seria em torno de 25Hz-30Hz; a largura de pulso da corrente deveria estar entre 0,1ms-10ms; os eletrodos devem estar fixados em pontos paraxifóideos ou intercostais na linha média axilar; a intensidade deveria ser a mínima para obter contração; o tempo de estimulação seria de 20 minutos. Segundo alguns autores, a eletroneuromiografia pode ser um método efetivo para avaliar o procedimento, uma vez que somente seriam candidatos para estimulação, pacientes que possuíssem nervos frênicos íntegros^{11,12,13}.

No mesmo período, o protocolo foi utilizado enquanto recurso fisioterapêutico no tratamento de cinco pacientes, sendo quatro com injúria frênica de pós-cirurgia cardíaca e um com seqüelas respiratórias de poliomielite^{14,15}. A estimulação foi realizada com eletrodos posicionados bilateralmente no sexto, sétimo, oitavo espaços intercostais da linha média axilar durante vinte minutos, quatro vezes ao dia sendo utilizado na avaliação (antes e depois do procedimento) radioscopia e avaliação espirométrica (Volume Corrente, Capacidade Vital, Ventilação Máxima Voluntária, Capacidade Pulmonar Total e de força muscular (Pressão Máxima Inspiratória)) e os resultados demonstraram ganho de excursão diafragmática na radioscopia, bem como incrementos nos valores espirométricos dos pacientes tratados^{16,17}.

A EDET também foi utilizada positivamente como recurso fisioterapêutico em paciente portador de paralisia de hemicúpula diafragmática esquerda no pós-cirurgia cardíaca por injúria frênica e em paciente portador de traumatismo raquimedular cervical, promovendo a contração diafragmática nessas situações^{18,19,20,21}.

Assim, tais estudos mostram a importância da utilização da estimulação elétrica diafragmática e sua evolução em diversas patologias e em situações nas quais há a disfunção ou o desuso muscular.

Nesse contexto, nos estágios atuais da evolução das ciências da saúde surgiu a necessidade de uma maior dedicação de cientistas em estudos ligados à fisioterapia respiratória experimental, que na sua essência, busca aprimorar o conhecimento e a aplicabilidade dos métodos fisioterapêuticos. Nesta linha experimental, foram testados em ratos alguns

protocolos obedecendo a uma ampla variação nos parâmetros funcionais como frequência e intensidade. A maior eficácia quimiometabólica (aumento do conteúdo muscular de glicogênio) foi conseguida com o seguinte protocolo: frequência de 50Hz ($T_{ON}/T_{OFF} = 2$ segundos, largura de fase de 0,4ms, intensidade de 5mA e 20 minutos de aplicação).

É bastante conhecido na literatura que a homeostasia energética do tecido muscular depende de inúmeros fatores como a integridade da junção neuromuscular, o estado funcional das fibras musculares, a sensibilidade à insulina e o suprimento adequado de substratos metabolizáveis²². Recentemente, demonstramos que o musculoesquelético desnervado apresenta uma melhora significativa nas reservas energéticas quando submetido à estimulação elétrica de baixa frequência²³. Isso mostra a importância da contração muscular no aporte energético, seja a contração realizada de forma ativa ou passiva (estimulação elétrica neuromuscular).

Para saber se a estimulação diafragmática elétrica transcutânea atinge estruturas diretamente na região, ou indiretamente via inervação, esse protocolo destinado a animais se mostra importante devido ao acesso às estruturas internas e análises que não são viáveis ao ser humano. Vale ressaltar, que na literatura os poucos estudos de estimulação diafragmática elétrica transcutânea existentes são relacionados a seres humanos e suas análises se limitam, principalmente, à espirometria e força muscular respiratória.

A partir do exposto, a proposta deste trabalho foi avaliar as reservas energéticas representadas pela análise do conteúdo de glicogênio dos músculos respiratórios bem como o comportamento eletrocardiográfico de ratos submetidos à estimulação diafragmática elétrica transcutânea.

METODOLOGIA

Foram utilizados ratos albinos *Wistar*, com idade variando de 3 a 4 meses, os quais foram alimentados com ração e água *ad libitum*, sendo submetidos a ciclo fotoperiódico de 12h claro/escuro e divididos em dois grupos experimentais (n=6): controle e tratado com estimulação diafragmática elétrica transcutânea. Os animais foram tratados de acordo com o *Guide for Care Use of Laboratory Animals* e aprovado pelo comitê de ética animal (Comissão de ética na experimentação animal - CEEA-IB-UNICAMP, protocolo nº 754-2).

Para a aplicação da estimulação diafragmática elétrica transcutânea, os animais foram anestesiados e a região do tórax anterior tricotomizada para garantir uma maior efetividade da estimulação e do posicionamento dos eletrodos. A estimulação elétrica foi realizada diariamente por 20 minutos durante 5 dias, sendo a frequência de 50 Hertz (ciclos por segundo), T_{ON} de 2 segundos (tempo de contração), T_{OFF} de 2 segundos (tempo de relaxamento) e a largura de fase (duração do pulso) de 0,4 milisegundos (ms). A intensidade

(amplitude do pulso) foi padronizada em 5.0 miliampères (mA), a partir da visualização da contração muscular, sendo que a cada 3 minutos foi aplicado um acréscimo de 1.0 mA à corrente minimizando a acomodação do diafragma.

O equipamento utilizado para a estimulação elétrica foi o Dualpex 961 (QUARK®), além de dois eletrodos de silicone-carbono com área de 1,5x2,0 centímetros cada e gel de acoplamento. Os dois eletrodos foram posicionados bilateralmente na região lateral do tórax entre a 4ª e a 6ª costela, no ponto médio entre o cotovelo e a última costela do animal, como mostra a figura 1. Essa região é próxima aos ramos laterais do nervo frênico, que terminam na região lateral do diafragma.

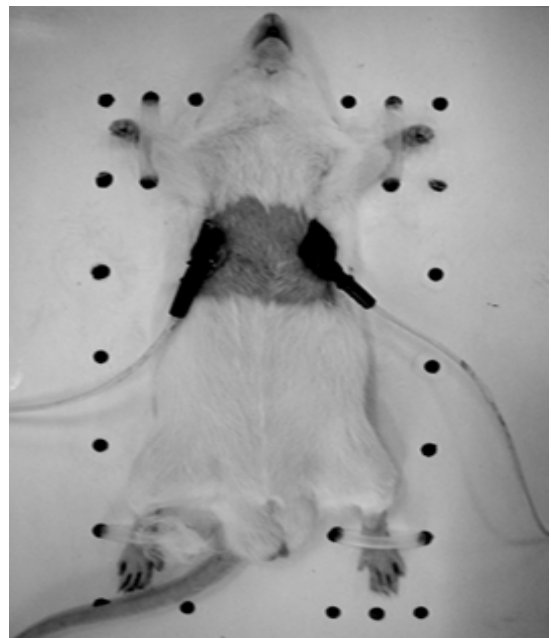


Figura 1. Estimulação elétrica realizada no animal através de dois eletrodos de superfície (1 e 2) acoplados com gel na região lateral do gradil costal, entre a 4ª e a 6ª costela.

Para a determinação do ECG, a análise eletrocardiográfica foi realizada no Laboratório de Fisiologia cardiovascular do Departamento de Fisiologia e Biofísica da UNICAMP através de um eletrocardiógrafo FUMBEC acoplado a um *software* adaptado para avaliação em roedores.

Os eletrodos foram conectados por meio de agulhas hipodérmicas às patas do animal anestesiado (pentobarbital sódico, 40mg/kg de peso corporal) (figura 2). Os registros das ondas do ECG foram utilizados para as medidas da frequência cardíaca, para mediar a intensidade e os intervalos entre as ondas e o estabelecimentos do eixo cardíaco. O intervalo QT foi corrigido pela fórmula de Bazzer's²⁴.

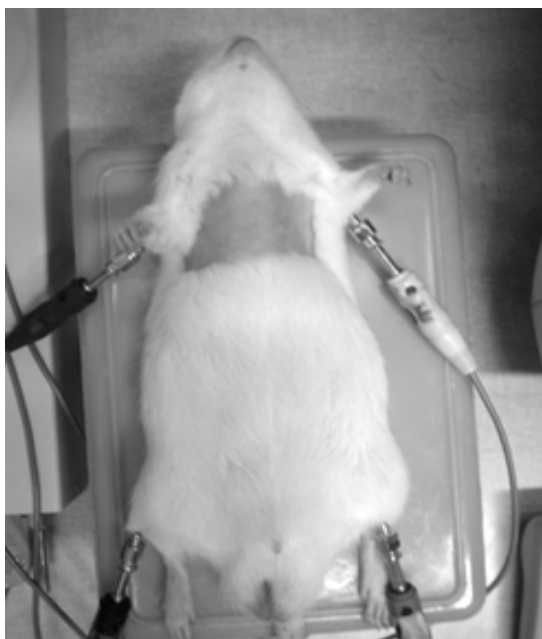


Figura 2. Animal com quatro eletrodos posicionados bilateralmente nas patas inferiores e superiores para a análise do registro

Para a determinação do conteúdo de glicogênio, após o sacrifício dos animais, amostras dos músculos peitoral, intercostal, diafragma e abdominal foram isoladas, retiradas e encaminhadas para a avaliação segundo a metodologia proposta por Siu et al.²⁵

Para a análise estatística, o teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov foi inicialmente aplicado e, como os dados apresentaram distribuição normal, o teste t foi aplicado, mantendo o nível de significância em 5% ($p < 0,05$).

RESULTADOS

O foco inicial do trabalho esteve direcionado na avaliação do conteúdo de glicogênio dos músculos respiratórios do grupo controle (C) e submetidos a 5 sessões subsequentes de estimulação diafragmática elétrica transcutânea (EDET). Nesta fase do estudo, foi observado que o recurso fisioterapêutico promoveu uma expressiva elevação na concentração muscular de glicogênio atingindo 42,85% no diafragma (C: $0,21 \pm 0,008$ x EDET: $0,30 \pm 0,04$, $p > 0,05$), 81,2% no intercostal (C: $0,32 \pm 0,08$ x EDET: $0,58 \pm 0,17$, $p > 0,05$), 96,7% no peitoral (C: $0,30 \pm 0,05$ x EDET: $0,59 \pm 0,06$,

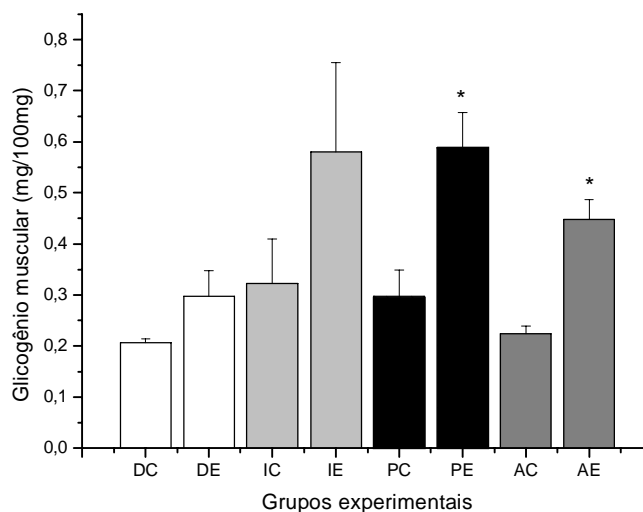


Figura 3. Média \pm epm da concentração do glicogênio (mg/100mg) dos músculos diafragma (D), intercostal (I), peitoral (P) e abdominal (A) dos grupos controle (C) e tratado com estimulação diafragmática elétrica transcutânea (E). $n=6$, $p < 0,05$, * comparado ao controle.

$p < 0,05$) e 104,5% no abdominal (C: $0,22 \pm 0,01$ x EDET: $0,45 \pm 0,03$, $p < 0,05$) quando comparado ao grupo controle (figura 3).

A partir da constatação de alterações metabólicas musculares induzidas pelo estímulo elétrico, e pautados no fato da terapia basear-se na aplicação de corrente elétrica na região torácica, o trabalho foi redirecionado para a análise do padrão eletrocardiográfico, tentando dirimir a dúvida se o tratamento estaria interferindo na atividade elétrica cardíaca. Os resultados mostraram que não houve alteração na frequência cardíaca (batimentos/minuto) dos animais submetidos à EDET, uma vez que, não diferiram do grupo controle (C: $380,8 \pm 11,2$ x EDET: $369,7 \pm 18,1$, $p < 0,05$) conforme mostra a figura 4. Outras análises merecedoras de destaque estão vinculadas às amplitudes (mm) dos intervalos que se mantiveram similar ao observado no grupo controle e assim representados: QR (C: $99,2 \pm 19,2$ x EDET: $72 \pm 21,9$, $p < 0,05$), QT (C: $199,2 \pm 8,03$ x EDET: $198 \pm 15,4$, $p < 0,05$) e QTc (C: $353,4 \pm 9,7$ x EDET: $345 \pm 18,6$, $p < 0,05$) (figura 5).

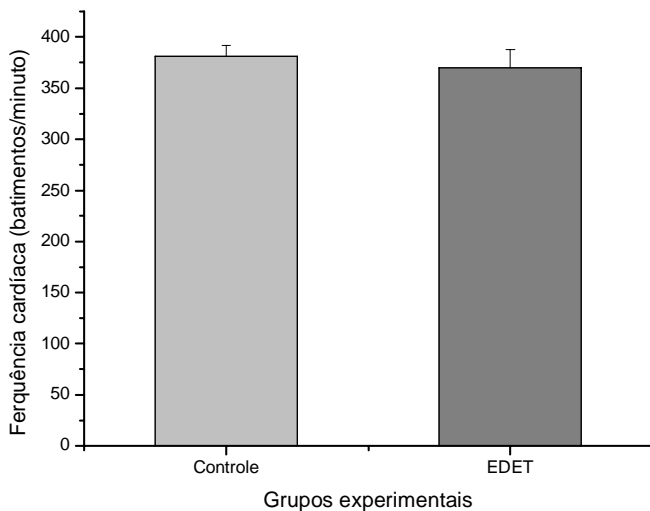


Figura 4. Média±epm da frequência cardíaca (batimentos/minuto) dos grupos controle e tratado com estimulação diafragmática elétrica transcutânea (EDET). n=6, p<0,05, * comparado ao controle.

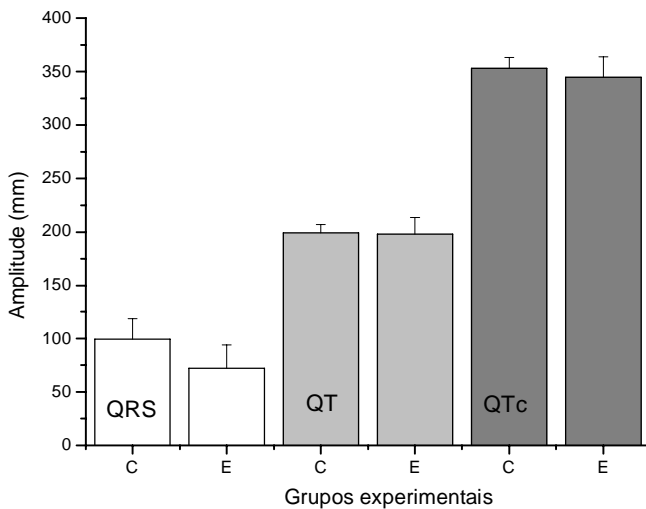


Figura 5. Média±epm da amplitude (mm) dos intervalos QRS, QT e QTc dos grupos controle (C) e tratado com estimulação diafragmática elétrica transcutânea (E). n=6, p<0,05, * comparado ao controle.

DISCUSSÃO

A fisioterapia respiratória tem buscado constantemente o aprimoramento de técnicas e métodos de análise que dêem uma maior aplicabilidade para avaliar parâmetros respiratórios, melhorando a efetividade da reabilitação de pacientes com patologias pulmonares, intervenções periódicas em pacientes

hospitalizados e na prevenção de alterações pulmonares, com objetivo de proporcionar a melhor qualidade de vida possível a cada condição.

Dentre os recursos fisioterapêuticos utilizados rotineiramente na clínica, a estimulação elétrica neuromuscular é merecedora de destaque frente aos inúmeros benefícios inerentes à aplicação de estímulo elétrico, tendo sido observado elevação na captação de substratos metabolizáveis, ativação enzimática, redução no processo de fibrose, além de promover o fortalecimento muscular^{26,27,28}.

Neste sentido, tem sido sugerido que concomitante à elevação na atividade contrátil, induzida pela estimulação elétrica, as fibras musculares apresentam aumento na sensibilidade à insulina bem como ativação dos processos ligados à elevação na captação de glicose e síntese de glicogênio²⁹.

No que tange ao conteúdo muscular de glicogênio destaca-se que se trata de uma reserva de glicose importante que reflete o *status* nutricional da fibra muscular, visto que a hexose é o substrato energético preferencialmente metabolizado, assim, quando as reservas glicogênicas apresentam-se reduzidas tem início o desenvolvimento de fadiga e conseqüente comprometimento na atividade contrátil³⁰. Assim, a manutenção das reservas glicogênicas dentro da normalidade proporciona o equilíbrio na homeostasia energética.

A fisioterapia respiratória experimental é uma área em expansão que merece atenção especial por parte da comunidade científica, principalmente no que se refere ao desenvolvimento/teste/validação de protocolos experimentais que contribuam para o progresso desta área.

Dentro da proposta em tela, a mobilização de glicogênio foi avaliada na musculatura respiratória submetida ao recurso fisioterapêutico EDET durante 5 dias e verificou-se que houve uma expressiva e generalizada elevação nas reservas, similar ao observado nos musculoesqueléticos estimulados eletricamente.

Isto reitera a existência de relações funcionais na rede de informações delimitadas pela estimulação elétrica, a captação de substratos, o metabolismo e a formação de reservatórios^{31,32}. Cabe ressaltar que, recentemente demonstramos os benefícios metabólicos da estimulação elétrica neuromuscular em músculos desnervados e imobilizados^{23,28,33}.

Destacam-se ainda que, além da ausência de estudos experimentais com animais relacionados à estimulação diafragmática elétrica transcutânea e à abordagem metabólica muscular respiratória, os estudos em seres humanos são escassos, limitando, assim, a discussão dos resultados encontrados.

O eletrocardiograma é um dos métodos mais importantes no diagnóstico de alterações cardíacas e dependendo do comprometimento, a propagação do potencial de ação no músculo cardíaco altera as ondas do ECG e seus intervalos. O conhecimento desta propriedade de condução através dos fluídos corporais permitem registrar, de modo não invasivo, eventos que ocorrem no coração. As ondas do ECG decorrem

da somatória temporal de despolarizações e repolarizações em grupos de fibras cardíacas e permitem distinguir intervalos que correspondem ao tempo para ativar as regiões do músculo cardíaco³⁴.

O fundamento/princípio que foi utilizado no estudo para avaliar o registro do ECG segue o padrão fisiológico rotineiramente utilizado e assim definido: desde o início da onda P até o início do complexo ventricular que é chamado de intervalo P-R, e corresponde ao tempo desde o início da ativação sinusal ao início da despolarização ventricular. A duração do complexo QRS, que corresponde ao tempo total para a despolarização ventricular, iniciada no feixe de His se alastra pelo tecido condutor His-Purkinge e a toda massa ventricular contrátil. O intervalo S-T inicia-se no final do complexo QRS e vai até o início da onda T. Este intervalo corresponde ao tempo que decorre desde o fim da despolarização completa até o início da repolarização do ventrículo, ou seja, a fase de platô do potencial de ação. Para determinar a frequência cardíaca o intervalo R-R foi utilizado, o que determina o tempo entre duas ondas R sucessivas. O intervalo entre o início do complexo QRS e o fim da onda T é chamado de intervalo Q-T, que corresponde ao tempo necessário para a completa excitação elétrica e a recuperação dos ventrículos, sendo, portanto, a medida da duração da sístole “elétrica”, a qual inclui a despolarização e a repolarização ventricular³⁵.

Como explicitado no bojo do trabalho, a estimulação diafragmática elétrica transcutânea consiste na aplicação de corrente elétrica na caixa torácica produzindo a contração diafragmática. Foi baseado neste contexto, que optamos por realizar um estudo das ondas eletrocardiográficas e seus intervalos em ratos submetidos ao procedimento fisioterapêutico. Os resultados desse estudo mostraram que não há diferença no eixo elétrico do coração que se manteve entre 60-90°, angulação classicamente constatada em ratos, acompanhando a normalidade para a espécie. A frequência cardíaca e a relação amplitude/duração das ondas eletrocardiográficas e seus segmentos, também não apresentaram alterações, em comparação ao grupo controle.

CONCLUSÃO

Este trabalho sugere um protocolo, aplicado em ratos, que pode ser utilizado no desenvolvimento de estudos em fisioterapia respiratória experimental. Nossos resultados reiteram a eficácia do método fisioterapêutico enquanto promotor de melhora nas condições energéticas da musculatura respiratória sem interferir na dinâmica elétrica cardíaca corroborando e acrescentando informações importantes que podem nortear sua aplicabilidade.

Vale ressaltar que, além da escassez de estudos relacionados à estimulação diafragmática elétrica transcutânea

na área da fisioterapia, esses são realizados em humanos, o que limita as análises. Tal fato nos instiga a continuidade desse estudo pelo fato do recurso poder estar gerando estímulo a outros órgãos pela geração da corrente elétrica no tórax, lembrando que a busca pela qualidade de vida do paciente é objetivo da fisioterapia.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Sarnoff SJ, Maloney JV, Sarnoff LC. Electrophrenic respiration in acute bulbar poliomyelitis. *Jour Am Med Ass* 1950; 143: 1383-1390.
2. Sarnoff SJ, Sarnoff CS, Whittenberger JL. Electrophrenic Respiration. *Surg Gyn Obst* 1951; 93: 190-196.
3. Goldenthal S. Bilateral and unilateral activation of the diaphragm in the: intact human external electrical stimulation by capacitive coupling as recorded by cineradiographs. *Conn Med* 1961; 25: 236-238.
4. Glenn WWL, Gee JBL, Schachter EN. Diaphragm pacing: application to a patient with chronic obstructive pulmonary disease. *Thorac Cardiovas Surg* 1978; 75: 273-281.
5. Glenn WWL, Phelps ML. Diaphragm pacing by electrical stimulation of the phrenic nerve. *Neurosurgery* 1985; 17: 974-984.
6. Glenn WWL, Phelps ML, Elefteriades JA, Dents B, Hogan JF. Twenty years of experience in phrenic nerve stimulation to pace the diaphragm. *PACE* 1986; 9: 780-784.
7. Riscili CE, Foster KS, Voorhees WD. Electroventilation in the baboon. *Amer Journ Emerg Med* 1988; 6: 561-565.
8. Riscili CE, Hinds M, Voorhees WD. The safety factor for electroventilation measured by production of cardiac ectopy in the anesthetized dog. *Chest* 1989; 95: 214-217.
9. Mier A, Brophy C, Moscham J. Phrenic nerve stimulation in normal Subjects and in patients with diaphragmatic weakness. *Thorax* 1987; 42(11): 885-888.
10. Bolton CS. Needle electromyography of the diaphragm. *Muscle and Nerve* 1992; 15: 678- 681.
11. Geddes LA, Voorhees WD, Babbs CF. Electroventilation, *Proc. 5th Purdue Conf. CPR & Defibrillation. Amer Journ Emer Med* 1985; 3(4): 337-339.
12. Geddes LA, Voorhees WD, Bouland JD. Optimum stimulus frequency for contracting the inspiratory muscle with chest-surface electrodes to produce artificial respiration. *Ann Biomed Eng* 1990; 18: 103-108.
13. Geddes LA, Simmons A. Artificial respiration in the dog by percutaneous bilateral phrenic nerve stimulation. *Amer Journ Emerg Med* 1991; 9: 527-529.
14. Cuello AF, Masciantonio L, Mendoza SM. Estimulation Diafragmatica Eletrica Transcutanea. *Med Inten* 1991; 8: 194-202.
15. Saadeh PWE. Needle electromyography of the diaphragm: A new technique. *Muscle and Nerve* 1993; 16: 15-20.
16. Geddes LA, Voorhees WD, Lagler R. Electrically produced artificial venlation. *Med Instrum* 1988; 22(5): 263-271.

17. Hon EH, Hulme GW. An electronic resuscitator for possible use in asphyxia in the neonate. *Yale Journ Biol Med* 1958; 29: 1540-1551.
18. Aquim EE, Abry AG, Motter AA. Eletroestimulação em disfunção diafragmática: relato de um caso. *Anais do Simpósio Internacional Fisioterapia Respiratória*. Curitiba: Centro Convenções do Paraná, 1992, p. 117.
19. Wetzel JL, Lunsford BR, Peterson MJ. Reabilitação respiratória do paciente com lesão da medula espinhal. In: Tecklin, J.S., Irwin, S. *Fisioterapia cardiopulmonar*. 2ª ed., São Paulo: Manole; 1994.
20. Wheeler TJ, Fell RD, Hauck MA. Translocation of two glucose transporters in heart: effects of rotenone, uncouplers, workload, palmitate, insulin and anoxia. *Biochim Biophys Acta* 1994; 1196: 191-200.
21. Damasceno M, Vega JM, Cavalheiro LV, Knobel E. Aplicação de estimulação elétrica na musculatura diafragmática para auxílio de desmame em lesão medular: relato de um caso. *Anais do Congresso Brasileiro de Terapia Intensiva Adulto e Pediátrico*. Salvador: Centro de Convenções da Bahia; 1997, p. 98.
22. Zheng D, Mclean P, Pohnert SC, Knight JB, Olson AL, Winder WW. et al. Regulation of muscle GLUT-4 transcription by AMP-activated protein kinase. *J Appl Physiol* 2001; 91: 1073-1083.
23. Guirro RRJ, Silva CA, Forti F, Cancelliero KM. Análise do musculoesquelético desnervado tratado com metformina e/ou estimulação elétrica de baixa frequência. *Revista Brasileira de Fisioterapia* 2004; 8(1): 21-27.
24. Sgoifo A, Stilli D, Medici D, Gallo P, Aimi B, Musso E. Electrode positioning for reliable telemetry ECG recordings during social stress in unrestrained rats. *Physiol Behav* 1996; 60(6): 1397-1401.
25. Siu LO, Russeau JC, Taylor AW. Determination of glycogen in small tissue samples. *J Appl Physiol* 1970; 28(2): 234-236.
26. Guirro RRJ, Nunes CV, Davini R. Comparação dos efeitos de dois protocolos de estimulação elétrica neuromuscular sobre a força muscular isométrica do quadríceps. *Rev Fisioter Univ São Paulo* 2000; 7(1/2):10-15.
27. Kitchen S, Bazin S. *Eletroterapia: prática baseada em evidências*. 2ª ed. São Paulo: Manole; 2003.
28. Cancelliero KM. Estimulação elétrica associada ao clembuterol melhora o perfil metabólico muscular de membro imobilizado de ratos. [Dissertação]. Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia – UNIMEP, 2004; 100p.
29. Wojtaszewski JPF, Higaki Y, Hirshmann MF, Michael MD, Dufresne SD, Kahn CR. et al. Exercise modulates postreceptor insulin signaling and glucose transport in muscle-specific insulin receptor knockout mice. *J Clin Invest* 1999; 104(9): 1257-1264.
30. Shulman RG, Rothman DL. The “glycogen shunt” in exercise muscle: A role for glycogen in muscle energetics and fatigue. *PNAS* 2000; 98(2): 457-461.
31. Radda GK. Control of energy metabolism during muscle contraction. *Diabetes* 1996; 45(1): 88-92.
32. Dupont SAC, Richmond FJ, Loeb GE. Prevention of muscle disuse atrophy by low-frequency electrical stimulation in rats. *IEEE Trans Neural Syst Rehabil Eng* 2003; 3: 218-26.
33. Forti F, Cancelliero KM, Guirro RRJ, Silva CA. Estimulação elétrica associada à Glutamina minimiza a perda de peso muscular de ratos desnervados. XVIII Reunião Anual da FeSBE, Curitiba – PR; 2003, p. 115.
34. Lengyel L. *Eletrocardiografia Clínica*. São Paulo: Ed Sarvier; 1974. p. 1-24.
35. Rocha E, Silva M. As bases fisiológicas da eletrocardiografia. In: AIREs, M. M. *Fisiologia*. 2ª ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1999.