

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:  
BIOQUÍMICA TOXICOLÓGICA**

**EFEITO DA CORRENTE DE KOTS EM ENZIMAS COLINÉRGICAS,  
PURINÉRGICAS E ESTRESSE OXIDATIVO DE MULHERES SEDENTÁRIAS**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**JORDANA DE BONA**

**SANTA MARIA, RS, BRASIL**

**2016**

**EFEITO DA CORRENTE DE KOTS EM ENZIMAS COLINÉRGICAS,  
PURINÉRGICAS E ESTRESSE OXIDATIVO DE MULHERES SEDENTÁRIAS**

**JORDANA DE BONA**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica do Centro de Ciências Naturais e Exatas, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica**

**Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Rosa Chitolina**

**Co-orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Vera Maria Melchiors Morsch**

**Santa Maria, RS, Brasil  
2016**

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

De Bona, Jordana  
EFEITO DA CORRENTE DE KOTS EM ENZIMAS COLINÉRGICAS,  
PURINÉRGICAS E ESTRESSE OXIDATIVO DE MULHERES SEDENTÁRIAS  
/ Jordana De Bona.-2016.  
71 p.; 30cm

Orientador: Maria Rosa Chitolina Schetinger  
Coorientador: Vera Maria Morsch  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de  
Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica  
Toxicológica, RS, 2016

1. Corrente de Kots/Corrente Russa (CR) 2. Estimulação  
elétrica 3. Sistema Colinérgico 4. Sistema Purinérgico  
5. Estresse oxidativo I. Chitolina Schetinger, Maria  
Rosa II. Morsch, Vera Maria III. Título.

**Universidade Federal de Santa Maria  
Centro de Ciências Naturais e Exatas  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas:  
Bioquímica Toxicológica**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,  
aprova a Dissertação de Mestrado

**EFEITO DA CORRENTE DE KOTS EM ENZIMAS COLINÉRGICAS,  
PURINÉRGICAS E ESTRESSE OXIDATIVO DE MULHERES SEDENTÁRIAS**

elaborada por

**JORDANA DE BONA**

como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Mestre em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica**

**COMISSÃO EXAMINADORA**

\_\_\_\_\_  
**Maria Rosa Chitolina, Dr<sup>a</sup>** (Presidente/Orientadora)

\_\_\_\_\_  
**Jamile Fabbrin Gonçalves, Dr<sup>a</sup>** (1<sup>o</sup> membro da banca)

\_\_\_\_\_  
**Cinthia Melazzo De Andrade, Dr<sup>a</sup>** (2<sup>o</sup> membro da banca)

**Santa Maria, 28 de abril de 2016**

Dedico esta dissertação as pessoas que sempre estiveram ao meu lado, familiares, amigos, colegas, professores e pacientes que acreditam em minha capacidade tanto profissional como pessoal. Em especial aos meus pais João Carlos e Lígia, a minha irmã Elisa pelo carinho e apoio na conclusão de mais uma etapa de minha vida e ao meu namorado Marcos pelo carinho, companheirismo e incentivo na finalização deste ciclo.

## AGRADECIMENTOS

A Deus por me amparar nos momentos difíceis, por me dar força para superar as dificuldades, mostrar os caminho nas horas incertas e me suprir em todas as necessidades.

Aos meus pais - João Carlos e Lígia, a minha irmã - ao meu namorado - Marcos, enfim, toda a família e amigos pelo carinho, paciência, incentivo, compreensão nos momentos de ausência... vocês são o melhor que a vida me trouxe.

À minha orientadora, Maria Rosa Chitolina, por me aceitar como orientada, pelos ensinamentos, dedicação, atenção e confiança em mim depositada.

À minha co-orientadora Vera Maria Morsch, pela oportunidade em assistir suas aulas como aluna ouvinte, contribuindo na construção de meu conhecimento e preparação para seleção de mestrado.

Aos professores membros desta banca de dissertação, Jamile Fabbrin Gonçalves e Cinthia Melazzo De Andrade, pela disponibilidade em avaliar este trabalho e pelas contribuições fundamentais para o aprimoramento do mesmo. E a professora Vania Lucia Loro como membro suplente desta banca de dissertação, pela disponibilidade em aceitar o convite.

Ao corpo docente do curso de Pós-graduação em Bioquímica Toxicológica, pelos ensinamentos passados em aula e a disponibilidade quando solicitados fora dos horários de aula.

Aos colegas do laboratório EnzitoX, pelo apoio e ajuda nos experimentos.

As participantes voluntárias que fizeram parte deste estudo.

A Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação, pela possibilidade de realização deste curso e disponibilização de todos os equipamentos.

Ao CNPq pela bolsa de estudos e pelos recursos financeiros concedidos. Enfim, agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste estudo.

## **RESUMO**

Dissertação de Mestrado  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica  
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

### **EFEITO DA CORRENTE DE KOTS EM ENZIMAS COLINÉRGICAS, PURINÉRGICAS E ESTRESSE OXIDATIVO DE MULHERES SEDENTÁRIAS**

Autora: Jordana de Bona  
Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Rosa Chitolina  
Co-orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Vera Maria Melchiors Morsch  
Data e Local da Defesa: Santa Maria, 28 de abril de 2016.

A Corrente de Kots ou Corrente Russa (CR) (2500 Hz) é uma forma de estimulação elétrica, que causa uma contração muscular. Fisioterapeutas utilizam a CR na área de Dermato-Funcional, para ativar músculos ou grupos musculares pouco tonificados, oriundo do sedentarismo. O objetivo do estudo foi analisar se a aplicação da CR altera a atividade das enzimas acetilcolinesterase (AChE), Ecto-Nucleosídeo Trifosfato Difosfoidrolase (E-NTPDases), Ecto-5'-nucleotidase, adenosina deaminase (ADA), superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT), bem como os níveis de TBARS. O grupo de estudo foi composto por 15 pacientes do sexo feminino sedentárias, submetidos a 10 sessões da CR por 30 minutos cada. Usou-se eletrodos auto-adesivos, colocados sobre o reto abdominal e a intensidade (mA) foi aumentada conforme a tolerância de cada paciente. O sangue foi coletado antes e após a aplicação da CR nas sessões 1, 5 e 10. Os resultados mostraram que ocorreu um aumento na atividade da AChE nas aplicações agudas 1, 5 e 10. A NTPDase apresentou aumento na hidrólise de ATP a ADP nas aplicações agudas 1 e 5. A enzima Ecto-5'-nucleotidase apresentou aumento na hidrólise de AMP na aplicação aguda 1. Não apresentaram diferença em nenhuma das aplicações, a atividade da enzima ADA, a atividade dos antioxidantes SOD e CAT e os níveis de TBARS. Sendo assim, a CR exerce uma notável mudança na atividade de enzimas que hidrolisam ACh e ATP, ADP e AMP quando aplicada de forma aguda. Estes resultados sugerem que as vias colinérgica e purinérgica estão relacionadas aos efeitos benéficos da CR. Uma vez que a CR promove a contração muscular e aumento da circulação sanguínea local.

Palavras-chave: Corrente de Kots; Corrente Russa (CR); Estimulação elétrica; Sistema purinérgico; Sistema colinérgicos; Estresse oxidativo.

## **ABSTRACT**

Dissertation of Master's Degree  
Post-Graduating Program in Biological Sciences (Toxicological Biochemistry)  
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

### **EFFECTS OF THE KOTS CURRENT ON THE OXIDATIVE STRESS, PURINERGIC AND CHOLINERGIC ENZYMES IN SEDENTARY WOMEN**

Author: Jordana De Bona

Advisor: Maria Rosa Chitolina

Co-advisor: Vera Maria Melchiors Morsch

Place and Date: Santa Maria, april 28, 2016.

The Current Kots or Russian current (RC) (2500 Hz) is a form of electrical stimulation, which causes muscle contraction. Physiotherapists use CR in Dermato-Functional area, to activate muscles or muscle groups little toned, arising from inactivity. The aim of the study was to analyze whether the application of CR alters the activity of the enzyme acetylcholinesterase (AChE), Ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase (E-NTPDase), Ecto-5'-nucleotidase, adenosine deaminase (ADA), superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT), as well as TBARS. The study group consisted of 15 patients of sedentary female, underwent 10 sessions of CR for 30 minutes each. He used self-adhesive electrodes placed on the rectus abdominis and the intensity (mA) was increased as tolerance of each patient. Blood was collected before and after the application of RC in sessions 1, 5 and 10. The results showed that there was an increase in the activity of AChE in acute applications 1, 5 and 10. The NTPDase showed an increase in the hydrolysis of ATP to ADP in acute applications 1 and 5. the Ecto-5'-nucleotidase enzyme showed an increase in AMP hydrolysis in acute application 1. Do not show differences in any of the applications, the activity of ADA, the activity of antioxidants SOD and CAT and levels of TBARS. Thus, the CR exerts a remarkable change in activity of enzymes that hydrolyze ACh and ATP, ADP and AMP when acutely applied. These results suggest that cholinergic and purinergic pathways are related to the beneficial effects of CR. Since the CR promotes muscle contraction and increase local blood flow.

**Keywords:** Kots Current; Russian Current (RC); Electrical Stimulation; Purinergic System; Cholinergic System; Oxidative Stress.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### INTRODUÇÃO

<b>Figura 1</b> - Esquema representativo do mecanismo de ativação do estímulo elétrico para desencadear a contração muscular.....	21
<b>Figura 2</b> - Esquema de uma sinapse colinérgica.....	23
<b>Figura 3</b> - Enzimas envolvidas na degradação extracelular de nucleotídeos e nucleosídeos de adenina.....	25
<b>Figura 4</b> - Produção mitocondrial de EROs.....	27

**MANUSCRITO**

**Design of the Study 01..... 50**

## LISTA DE TABELAS

### MANUSCRITO

<b>Table 1</b> - Patient Characteristics.....	50
<b>Table 2:</b> Effect of Acute RC application on SOD, CAT and TBARS activity in blood and serum of sedentary women.....	61
<b>Table 3:</b> Effect of Chronic RC application on SOD, CAT and TBARS activity in blood and serum samples of sedentary women.....	61

## LISTA DE GRÁFICOS

### MANUSCRITO

<b>Graphic 1:</b> Effect of Acute RC application on AChE activity in blood of sedentary women.....	51
<b>Graphic 2:</b> Effect of Chronicle RC application on AChE activity in the blood in sedentary women.....	52
<b>Graphic 3:</b> Effect of Acute RC application on NTPDase activity for hydrolyses of ATP in platelets of sedentary women.....	53
<b>Graphic 4:</b> Effect of Chronicle RC application on NTPDase activity for hydrolyses of ATP in platelets of sedentary women.....	54
<b>Graphic 5:</b> Effect of Acute RC application on NTPDase activity for hydrolyses of ADP in platelets of sedentary women.....	55
<b>Graphic 6:</b> Effect of Chronicle RC application on NTPDase activity for hydrolyses of ADP in platelets of sedentary women.....	56
<b>Graphic 7:</b> Effect of Acute RC application on 5´nucleotidase activity for hydrolyses of AMP in platelets of sedentary women.....	57
<b>Graphic 8:</b> Effect of Chronicle RC application on 5´nucleotidase activity for hydrolyses of AMP in platelets of sedentary women.....	58
<b>Graphic 9:</b> Effect of Acute RC application on Adenosine Desaminase (ADA) activity for hydrolyses of Adenosine in platelets of sedentary women.....	59
<b>Graphic 10:</b> Effect of Chronicle RC application on Adenosine Deaminase (ADA) activity for hydrolyses of Adenosine in platelets of sedentary women.....	60

## **LISTA DE ABREVIações E SIGLAS**

<b>AChE</b>	- Acetilcolinesterase
<b>BChE</b>	- Butirilcolinesterase
<b>ACh</b>	- Acetilcolina
<b>ADA</b>	- Adenosina Desaminase
<b>AMP</b>	- Adenosina Monofosfato
<b>ADP</b>	- Adenosina Difosfato
<b>ATP</b>	- Adenosina Trifosfato
<b>CAT</b>	- Catalase
<b>CR</b>	- Corrente Russa
<b>E-NTPDases</b>	- Ecto-Nucleosídeo Trifosfato Difosfoidrolase
<b>EROs</b>	- Espécies Reativas de Oxigênio
<b>ES</b>	- Eletroestimulação
<b>GPI</b>	- Glicosil Fosfatidilinositol
<b>JNM</b>	- Junção Neuromuscular
<b>LCA</b>	- Ligamento Cruzado Anterior
<b>NACHRs</b>	- Receptores Nicotínicos
<b>NMES</b>	- Eletroestimulação Neuromuscular
<b>O<sub>2</sub><sup>o-</sup></b>	- Ânion Superóxido
<b>PA</b>	- Potencial de Ação
<b>RM</b>	- Receptores Muscarínicos
<b>RN</b>	- Receptores Nicotínicos
<b>SNC</b>	- Sistema Nervoso Central

- SNP** - Sistema Nervoso Periférico
- SOD** - Superóxido Dismutase
- TBARS** - Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico

## LISTA DE ANEXOS

<b>ANEXO A – Carta de Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo seres humanos - UFSM .....</b>	<b>71</b>
--	-----------

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>18</b>
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>30</b>
<b>2.1 Objetivo geral .....</b>	<b>30</b>
<b>2.2 Objetivos específicos.....</b>	<b>30</b>
<b>3. MANUSCRITO .....</b>	<b>31</b>
<b>4. CONCLUSÕES .....</b>	<b>62</b>
<b>5. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>63</b>
<b>ANEXO .....</b>	<b>70</b>



## **APRESENTAÇÃO**

Os resultados que compõem esta dissertação são apresentados sob a forma de um manuscrito, o qual se encontra no item Manuscrito. As seções Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências estão presentes no próprio manuscrito e representam a íntegra deste estudo.

O item Conclusões encontra-se no final desta dissertação e apresenta interpretações e comentários gerais sobre o manuscrito contido neste trabalho.

As Referências equivalem somente às citações que aparecem no item Introdução desta dissertação.

O manuscrito está disposto de acordo com as normas da revista científica para o qual será submetido: *Biomedicine & Pharmacotherapy*.

## 1. INTRODUÇÃO

A Corrente de Kots ou Corrente Russa (CR) é uma forma de eletroestimulação neuromuscular (NMES), que consiste em um estímulo de média frequência de 2.500 Hz modulada a 50 Hz. Essa forma de eletroestimulação neuromuscular leva um músculo ou um grupo muscular a contrair-se. Para Kots que descreveu o método da CR em 1976, ela poderia recrutar 100% das fibras de um músculo, o que em uma contração máxima voluntária não se alcança. Podendo assim, diminuir o déficit de força em torno de 10% (BOWEN, 1971; THOMSON; KOTS, 1977; SELKOWITZ, 1989; AGNE, 2004, WARD; SHKURATOVA, 2002; SOUZA; 2006).

A CR é aplicada por fisioterapeutas na prevenção da atrofia de músculos, onde se tem uma articulação imobilizada em consequência de trauma ou após intervenções cirúrgicas. Usada como facilitadora na reabilitação de transtornos músculos esqueléticos álgicos, os quais impedem o paciente de fazer um esforço máximo durante a contração muscular, e ainda na área de Dermato-Funcional, propondo ativação de músculos com baixo tônus (KRAMER; MENDRYK, 1982).

A CR pode aumentar a força muscular conforme estudos já bem documentados, tanto em grupos treinados como em grupos sedentários. Sendo que esse aumento ocorrerá conforme a carga do estímulo, ou seja, pelo aumento da intensidade e pelo tempo que o indivíduo é submetido ao estímulo (KOTS, 1977; SELKOWITZ, 1989; WARD; SHKURATOVA, 2002; AGNE, 2004).

Clinicamente a CR é aplicada no fortalecimento em casos que envolvem imobilização ou contra-indicação para o exercício dinâmico, como por exemplo: reparações e reconstruções do Ligamento Cruzado Anterior (LCA), ou quando existe uma incapacidade de um doente para exercer força muscular, como nos casos de reabilitação em fase aguda após lesão ou procedimento cirúrgico, onde a força muscular voluntária esta diminuída, e ainda como um complemento aos exercícios tradicionais voluntários, ao final de uma sessão, quando o esforço voluntário poderá estar diminuído (KRAMER; MENDRYK, 1982; MORRISSEY et al., 1985; SELKOWITZ, 1989).

Além disso, a eletroestimulação (ES) vem sendo aplicada como forma de co-contratação nos músculos abdominais oblíquos e grupos musculares multífidos, sugerindo maior estabilidade dos segmentos da coluna. Em pacientes que apresentam instabilidade funcional e biomecânica anormal, irá melhorar a postura

fisiológica da coluna e a aparência visual do abdômen (KRAMER; MENDRYK, 1982; SELKOWITZ, 1989).

Em estudo Fahey; Harvey; Svheder (1985) treinaram indivíduos com a CR, onde o músculo selecionado foi o quadríceps femoral, objetivando seu fortalecimento. Os indivíduos foram posicionados em decúbito dorsal, onde um grupo foi posicionado com joelho em extensão angulação de 0° e outro grupo com angulação de 60°, em nenhum grupo se relatou a angulação do quadril, após o período designado para o treinamento observou-se que ambos os grupos apresentaram aumento de força significativo. Já os pesquisadores Erikson; Haggmark; Kiessling (1981) também treinaram indivíduos estimulando o quadríceps femoral, mudando a angulação de flexão do joelho para 90°. O grupo apresentou um aumento de força, com uma variação de 7% a 48% superior a força pré-treinamento. Em outro estudo Soo; Currier; Threlkeld (1988) treinaram dois grupos sedentários com a CR, sendo um grupo composto por indivíduos do sexo masculino e outro do sexo feminino. A força aumentou significativamente tanto em ambos os grupos, porém ao comparar a força entre os grupos, a força foi significativamente maior no grupo feminino.

Dellito et al. (1988) ao analisar ganhos de força produzidos pela CR com ganhos de força produzidos pelo exercício voluntário após a cirurgia de ligamento cruzado anterior, concluiu que a CR produziu um maior ganho de força nesses indivíduos, do que os que foram submetidos ao exercício voluntário. Em outro estudo Dellito et al. em 1989 treinou levantadores de peso de elite com CR. Após o treinamento se observou um melhor desempenho no levantamento de peso, além de aumento de medidas antropométricas na musculatura submetida ao estímulo.

Kots; Xvilon (1971) defendem que a estimulação elétrica deve ser aplicada como complemento do exercício físico voluntário, no ganho de força. Relatam ainda a ocorrência de alterações fisiológicas como: aumento do volume das fibras musculares e conseqüentemente aumento na velocidade de contração muscular. Partindo do pressuposto que a contração muscular voluntária iria ativar as fibras lentas e a CR pelo protocolo 10/50/10 proposto por Kots iria ativar as fibras de contração rápida, melhorando assim a força muscular, agilidade e performance dos indivíduos pesquisados, no caso destes autores a ênfase ocorreu em atletas de elite.

Kots foi o responsável pela popularização da CR como complemento do reforço muscular na União Soviética, seus estudos foram analisados em atletas de

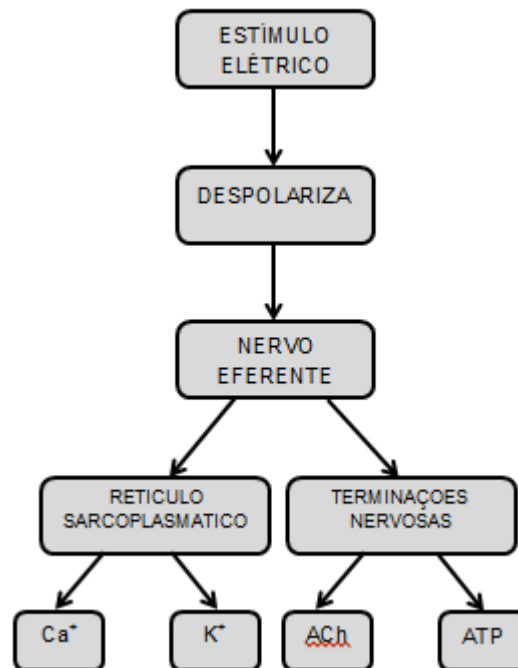
elite. Onde se pode observar um aumento de força muscular, o que refletiu diretamente na melhora do desempenho e performance desses atletas. Estas pesquisas não foram publicações em forma de artigo, apenas se tem dados das investigações disponíveis descrito em Russo, armazenados na Biblioteca Britânica do Reino Unido nos Estados Unidos (SELKOWITZ, 1989; WARD; SHKURATOVA, 2002; AGNE, 2004).

A aplicação da CR não apresenta desconforto, o mecanismo se dá pela colocação de eletrodos auto-adesivos sobre a pele. A CR irá desencadear uma contração muscular similar à contração muscular fisiológica voluntária de um grupo de músculos ou um músculo específico (KOTS; XVILON, 1971; AGNE, 2004). O estímulo elétrico ao ser disparado atingirá o nervo eferente responsável pelo músculo onde os eletrodos estão posicionados. Este nervo sofrerá despolarização pelo potencial de ação gerado pelo estímulo elétrico. Potencial este que será transmitido para as células que compõe músculo estimulado, despolarizando a membrana das mesmas (figura 1) (EVANGELISTA, 2003; ELTIT et al., 2004; CASAS et al., 2010; FOURE et al., 2014).

A membrana do retículo sarcoplasmático ao ser despolarizada irá liberar  $Ca^{2+}$  e  $K^+$  para o meio extracelular (figura 1). Estes íons participam do mecanismo de excitação muscular (contração). Quando estas células forem submetidas a um período longo de estimulação, ocorrerá uma inativação na liberação de  $Ca^+$  intracelular até que seu potencial de repouso seja recuperado (CSERNOCH et al., 2000; ELTIT et al., 2004; CASAS et al., 2010; FOURE et al., 2014).

Este potencial de ação irá atingir ainda, as terminações nervosas (placas motoras) do nervo estimulado, despolarizando-as e levando a liberação a acetilcolina (ACh) para o meio extracelular, ou seja, na junção neuromuscular (JNM) (figura 1). A ACh não será liberada sozinha na fenda sináptica, será acompanhada do adenosina trifosfato (ATP) (figura 2), o qual se encontra juntamente com este neurotransmissor encapsulados nas placas motoras (figura 1). (CORREIA-DE-SÁ; RIBEIRO, 1996; CORREIA-DE-SÁ; TIMÓTEO; RIBEIRO, 1996; CUNHA et al., 1996; CUNHA; RIBEIRO, 2000).

**Figura 1** - Esquema representativo do mecanismo de ativação do estímulo elétrico para desencadear a contração muscular.



Fonte: acervo dos autores

A estimulação de alta frequência e média frequência especificamente irão liberar a ACh através da ativação tônica dos receptores A2A, receptores estes que são ativados pela adenosina que se encontra em maior concentração no meio extracelular (CORREIA-DE-SÁ; RIBEIRO, 1996; CORREIA-DE-SÁ; TIMÓTEO; RIBEIRO, 1996; CUNHA et al., 1996).

Estando estes íons e neurotransmissores presentes na fenda sináptica, se dará o mecanismo de contração muscular, o qual consiste no movimento do encurtamento das fibras musculares. Este encurtamento nada mais é, do que o deslizamento das fibras de actina sobre as fibras de miosina (KOTS; XVILON, 1971).

O sistema Colinérgico é composto pelo neurotransmissor ACh, este neurotransmissor é endógeno e atua tanto no sistema nervoso central (SNC) como no sistema nervoso periférico (SNP). A acetilcolina ao ser liberada na JNM participará de uma sinapse química anatomicamente e funcionalmente diferenciada para a transmissão de um sinal do terminal nervoso para a fibra muscular, obtendo como resultado final a contração muscular (ENGEL, 2003).

A ACh ao ser liberada das células pré-sinápticas se difundem pela fenda sináptica que ativa nos receptores colinérgicos de acetilcolina (nAChRs) posicionados nas células pós-sinápticas (figura 2) e promove uma transmissão sináptica efetiva levando a contração muscular (WILLMANN; FUHRER, 2002).

Estes receptores colinérgicos são divididos em subgrupos: os muscarínicos pertencentes à família metabotrópica e os nicotínicos a família ionotrópica, que transmitem os sinais por mecanismos diferentes (WILLMANN; FUHRER, 2002).

Os receptores nicotínicos são canais iônicos moduladores de potenciais da membrana celular, enquanto receptores muscarínicos pertencem a uma imensa família de receptores acoplados à proteína-G ligada à membrana celular (figura 2) (GPCRs) ( $A_2A$ ) (FELDER et al., 2000; HUGHES; KUSNER; KAMINSKI, 2006; GALLACI; OLIVEIRA, 2007).

A estimulação de média frequência libera ACh a partir de terminações nervosas motoras, que estão inseridas nas fibras musculares (figura 3) pela ativação dos receptores  $A_2A$  (RIBEIRO et al., 1996). Assim como, desencadeia a liberação da adenosina endógena para o meio extracelular usando a mesma via (CORREIA-DE-SÁ; RIBEIRO, 1996).

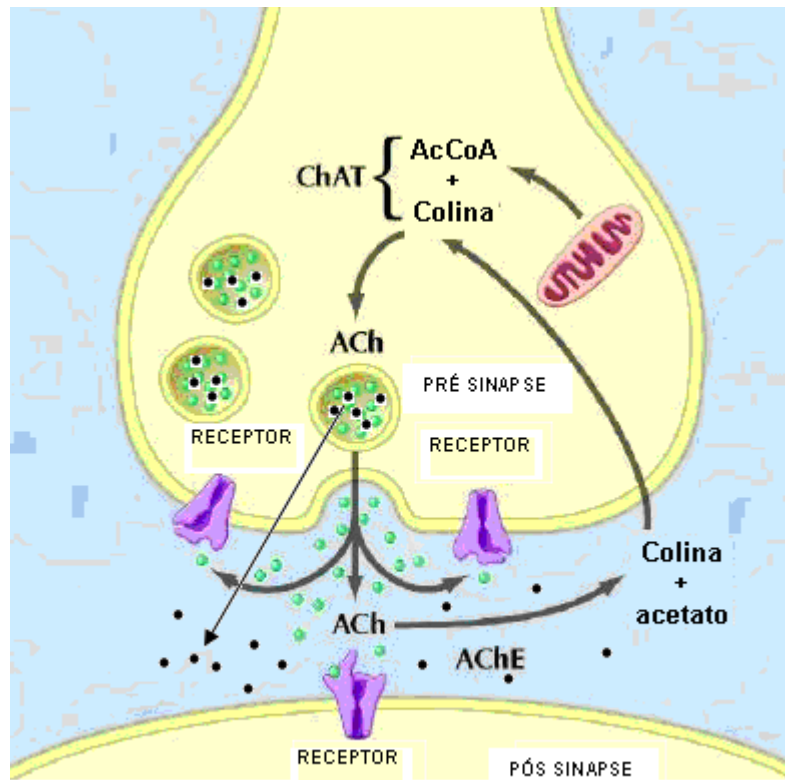
Concluído o mecanismo de contração muscular a ACh será hidrolisada pela enzima acetilcolinesterase (AChE) local. A AChE catalisará a reação da Acetilcolina na presença de água ( $H_2O$ ) tendo como produto desta hidrólise a colina e o acetato (figura 2). A colina é receptada pelas células pré-sinápticas e usada na síntese novamente de ACh, (figura 2). Já o acetato será transportado para os tecidos onde será metabolizado (figura 2) (SANES, 2003). A inibição da AChE produz acúmulo de acetilcolina na JNM, que irá sobrepujar a capacidade de despolarizar as membranas das células musculares, em consequência haverá uma paralisia do músculo (MARRS, 1993).

A enzima Acetilcolinesterase (AChE; E.C. 3.1.1.7) hidrolisa especificamente ésteres com grupamento acetil (MARRS, 1993; MESULAM et al., 2002). A AChE é encontrada ancorada à membrana plasmática através de um glicolípido, nos seguintes locais: no cérebro, na junção neuromuscular, nos eritrócitos e nos linfócitos (MESULAM et al., 2002; RINNE et al., 2003).

A colinesterase é enzima importante na neurotransmissão colinérgica, pois possui função como hidrólise e detoxificação de xenobióticos. A acetilcolinesterase ou colinesterase verdadeira é classificada de acordo com as suas propriedades

catalíticas e especificidade a substratos, sensibilidade a inibidores e distribuição tecidual (COKUGRAS, 2003).

**Figura 2** - Esquema de uma sinapse colinérgica; Receptor(receptores colinérgicos)



Fonte: Adaptado Gauthier (2002).

Para que ocorra uma contração muscular necessitamos de mais um componente associado ao neurotransmissor ACh, neste caso seria o ATP, que é liberado juntamente com a ACh a partir das vesículas colinérgicas (figura 2)(SILINSKY, 1975). Este nucleotídeo compõe o sistema purinérgico, juntamente com outros nucleotídeos e nucleosídeos extracelulares. Após participarem de reações químicas nos mecanismos como: a contração muscular serão hidrolisados por enzimas locais, as quais controlam seus níveis extracelulares (RIBEIRO; WALKER, 1975; KOLB; WAKELAM, 1983; SILINSKY et al., 1999; YEGUTKIN, 2008; BURNSTOCK, 2014).

A via purinérgica envolve três componentes principais: os nucleotídeos e o nucleosídeos extracelulares, os receptores por meio dos quais os nucleotídeos e nucleosídeos se ligam para executarem suas funções e as ecto-enzimas responsáveis pelo controle dos níveis extracelulares destas moléculas. Os

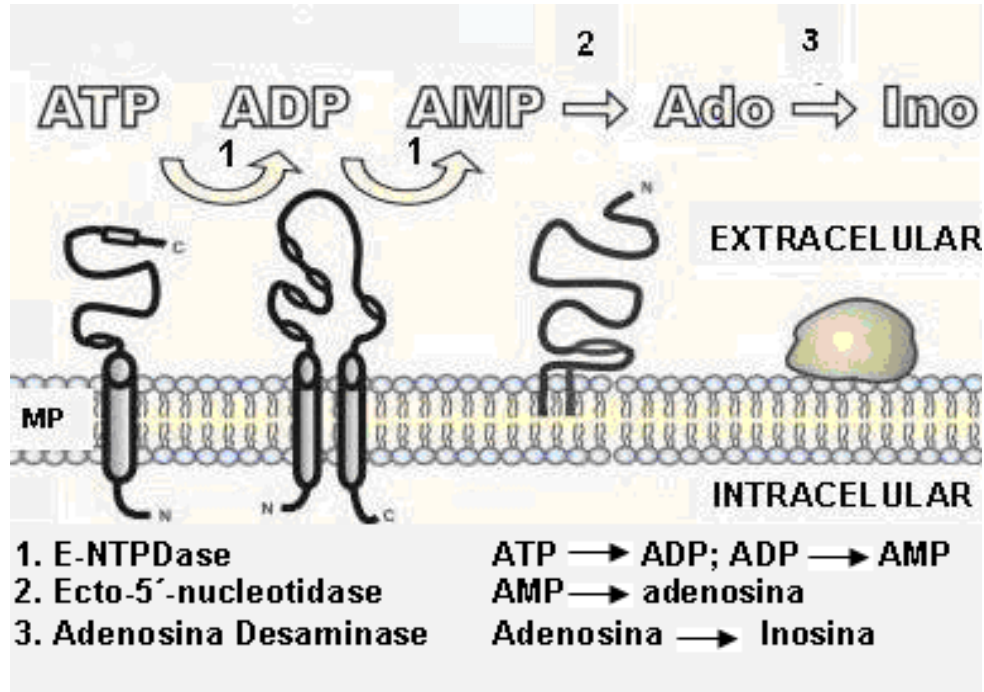
nucleotídeos de ATP (Adenosina Trifosfato), ADP (Adenosina Difosfato) e AMP (Adenosina Monofosfato), e o nucleosídeo adenosina presentes no meio extracelular atualmente têm sido classificados como moléculas sinalizadoras, devido a seu papel modulador de uma gama de processos biológicos. Os receptores em que as moléculas se ligam estão localizados na superfície celular, esses receptores são divididos em dois grupos os receptores P2X e os P2Y. A concentração extracelular dessas moléculas será controlada por alguns fatores como a quantidade liberada, mecanismo de recaptção, situações de lise celular e a presença de algumas enzimas como as ecto-nucleotidases (ILLES; RIBEIRO, 2004; YEGUTKIN, 2008; SCHETINGER et al., 2007; BURNSTOCK, 2014).

O ATP na JNM atuará como neurotransmissor e neuromodulador, sendo liberado juntamente com o neurotransmissor ACh, ambos oriundos das vesículas pré-sinápticas via estímulo elétrico, este nucleotídeo ao ser liberado para o meio extracelular se ligará aos receptores P2X, levando a um rápido aumento de cálcio extracelular associado com a contração muscular. O ATP irá controlar ou regular o grau de excitabilidade da membrana pós-sináptica, facilitando ou dificultando a abertura dos canais catiônicos, essa função dependerá diretamente do tipo de estímulo que as células estão sendo expostas, e a quantidade de nucleotídeos que se encontrarão na JNM (CEA et al., 2012; FUENTEALBA et al., 2013; TRANS, 1981; SANDONA et al., 2005; SILINSKY; HUBBARD, 1973; ABBACCHIO; BURNSTOCK, 1998; BURNSTOCK; VERKHRASKY, 2010; TRAMS, 1981; BUVINIC et al., 2009; TU et al., 2012). Subseqüentes estímulos elétricos irão acumular nucleotídeos de adenina no meio extracelular, os quais adentram a via sistêmica, onde serão hidrolisados pelas enzimas locais as ectonucleotidases, que compõem o sistema purinérgico (CUNHA, 2000; BREEN et al., 2013; CARDOSO, 2003).

Algumas das enzimas que se destacam na composição do sistema purinérgico são: as E-NTPDases (Ecto-Nucleosídeo Trifosfato Difosfoidrolase), que fazem a hidrólise dos nucleotídeos de ATP em ADP e do ADP em AMP, a enzima Ecto-5'-nucleotidase que hidrolisa o AMP em adenosina, e a enzima adenosina desaminase (ADA) que hidrolisa Adenosina em inosina (figura 3). Temos ainda, a E-NPPs (Ecto-Nucleotídeo Pirofosfatase/Fosfodiesterase) catalise o ATP em AMP (ZIMMERMANN et al., 2007; YEGUTKIN, 2008; CUNHA; RIBEIRO, 2000; ROBSON; SEVIGNY; ZIMMARMENN, 2006).



**Figura 3** - Enzimas envolvidas na degradação extracelular de nucleotídeos e nucleosídeo de adenina.



Fonte: Adaptado de Yegutkin (2008).

As NTPDases (E.C. 3.6.1.5, CD39) estão presentes na membrana celular com seus sítios catalíticos voltados para o meio extracelular (ROBSON et al., 2006). A enzima Ecto-5'-nucleotidase (E.C. 3.1.3.5 CD73) é um glicoproteína ligada à membrana celular por um glicosil fosfatidilinositol (GPI), com seu sítio catalítico voltado para o meio extracelular, onde irá catalisar a hidrólise do AMP (ZIMMERMANN, 2001; ZIMMERMANN et al., 2007; HUNSUCKER; MITCHELL; SPYCHALA, 2005).

A Adenosina que é o produto de degradação do ATP apresenta propriedades vasodilatadoras, sendo um modulador do tônus vascular e inibidor da agregação plaquetária. Este nucleotídeo no meio extracelular poderá ser removido por transportadores bidirecionais ou ainda ser degradada a inosina pela enzima ADA (ZIMMERMANN, 2001; FREDHOLM, 1997; CUNHA, 2001).

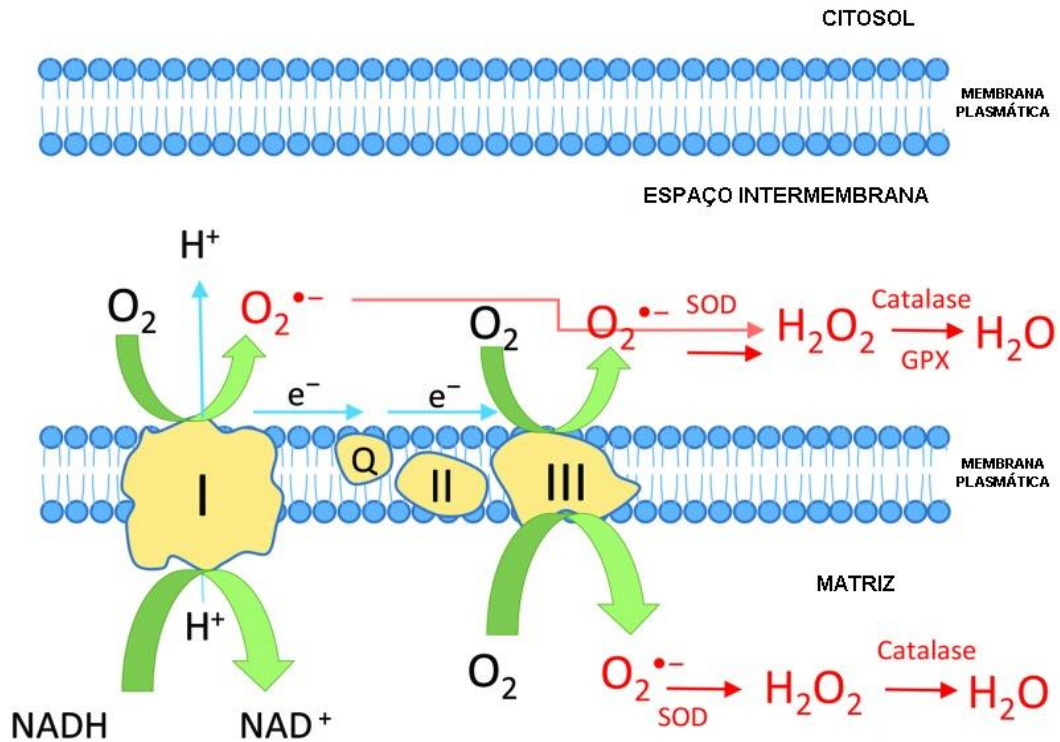
A Adenosina desaminase (ADA) (E.C. 3.5.4.4) tem como função regular os níveis de adenosina é encontrada na superfície das células, apresentando função importante nos sistemas imunológicos e processos inflamatórios (BOTA et al., 2001).

Um conjunto de contrações musculares resultará em um movimento do organismo, esse movimento pode ser desde um simples levantar-se de uma

poltrona, caminhar ou correr. O conjunto de contrações pode ser observado ainda, tanto em exercícios aeróbicos quanto em anaeróbicos, agudos ou crônicos. O organismo ao ser submetido aos movimentos repetitivos necessitará aumentar o consumo de  $O_2$ , frente a este evento o organismo dependendo do tempo exposto a estas repetições, produzirá substâncias chamadas de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs), as quais são produzidas pelo mecanismo de respiração celular nas mitocôndrias (figura 4) (KLISZCZEWICZ et al., 2015; BLOOMER et al., 2007).

Estas substâncias como não são benéficas em altas concentrações ao organismo serão neutralizadas por antioxidantes. Algumas das EROs que serão produzidas na respiração celular são superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) sofrerá dismutação catalisada pela enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD) em oxigênio ( $O_2$ ) e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), este  $H_2O_2$  por sua vez será catalisado pela ação da enzima antioxidante Catalase (CAT) até água ( $H_2O$ ) (figura 4), como se pode observar o sistema antioxidante trabalha em harmonia para evitar um desequilíbrio entre seu sistema de defesa. Quando a produção EROs superarem a produção de antioxidantes este desequilíbrio entre produção e neutralização é chamado de Estresse Oxidativo (KLISZCZEWICZ et al., 2015; BLOOMER et al., 2007).

**Figura 4** – Produção mitocondrial de EROs. A produção do ânion de superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) nos complexos I e III na matriz ou no espaço intermembrana sofrerá dismutação catalisada pela enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD) em oxigênio ( $O_2$ ) e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), este  $H_2O_2$  por sua vez será catalisado pela ação da enzima antioxidante Catalase (CAT) até água ( $H_2O$ ).



Fonte: Adaptado de Atashi; Modarressi; Pepper, 2015.

Na produção das EROs existem alguns íons importantes como: o ferro (Fe) e o cobre (Cu), que serão liberados durante exercício intenso pela destruição de eritrócitos e mioglobinas, em consequência a esta destruição ocorrerá liberação destes para o meio extracelular. Caso o exercício intenso seja prolongado aumentará a concentração intracelular de ferro (GOLDFARB, 1999).

O Fe ao difundir para fora da célula poderá interagir com o ácido ascórbico ou composto tiólico dando início a peroxidação lipídica. A peroxidação lipídica nada mais é do que um ataque de um oxidante forte a ácidos graxos poli-insaturados, para detectar a peroxidação lipídica pode-se utilizar ensaio de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (POLIDORI et al., 2000).

Para King; Claiton; Laitano (2015) a presença das EROs na circulação durante o exercício físico é exacerbado com o aumento da temperatura corporal e equilíbrio de fluidos corporais. Já Kiliszczewicz et al., (2015) em estudo relacionaram

o aumento do Estresse Oxidativo com alta intensidade aplicada no exercício aeróbico. Por outro lado, sabe-se que a atividade física moderada é um antioxidante, o prolongamento por um período maior desta atividade é chamada treinamento físico, o qual é capaz de causar adaptações em resposta a uma maior produção destas EROs. Estudos têm relacionado também a produção aumentada de EROs a um grande número de doenças crônicas como: enfisema pulmonar, doenças inflamatórias, aterosclerose, câncer e envelhecimento (MENEGUINI, 1987; SOUTHORN; POWIS, 1988; ZANINI et al., 2014).

O sedentarismo também está ligado a produção de EROs, pois o mesmo consiste em uma diminuição ou falta de atividade física. É considerada a principal causa no aumento da incidência de várias doenças crônicas a hipertensão arterial, diabetes, obesidade, ansiedade, depressão, aumento do colesterol, infarto do miocárdio são alguns dos exemplos das doenças às quais o indivíduo sedentário se expõe. Além de ser considerado o principal fator de risco para a morte súbita, estando na maioria das vezes associado direta ou indiretamente às causas ou ao agravamento da grande maioria das doenças crônicas (HALLGRENT et al., 2016; WULLEMS et al., 2016).

Do ponto de vista da Medicina Moderna, o sedentário é o indivíduo que gasta poucas calorias por semana com atividades ocupacionais. Para deixar de fazer parte do grupo dos sedentários o indivíduo precisa gastar no mínimo 2.200 calorias por semana em atividades físicas. A vida sedentária provoca literalmente o desuso dos sistemas funcionais. O aparelho locomotor e os demais órgãos e sistemas solicitados durante as diferentes formas de atividade física, gerando um processo de regressão funcional, caracterizado no caso dos músculos esqueléticos, um fenômeno associado à atrofia das fibras musculares, à perda da flexibilidade articular, assim como o comprometimento funcional de vários órgãos (HALLGRENT et al., 2016; WULLEMS et al., 2016).

Frente a este contexto, tomando como base que a CR desencadeia a contração muscular e leva ao aumento da força muscular, são necessárias pesquisas sobre os efeitos bioquímicos que a aplicação deste estímulo gera no organismo, uma vez que estes efeitos não estão bem esclarecidos. Tendo em vista os efeitos benéficos que a CR proporciona, é de grande valia analisar quais as alterações que este tipo de estímulo pode gerar nos eventos das vias purinérgicas,

vias colinérgicas e em nível de estresse oxidativo que estão envolvidos na contração muscular dessas mulheres sedentárias.

## **1. OBJETIVO**

### **2.1 Objetivo Geral**

O objetivo desse trabalho é investigar os efeitos da aplicação da Corrente Kots na atividade das enzimas dos sistemas colinérgico e purinérgico, assim como parâmetros do estresse oxidativo em mulheres sedentárias.

### **2.2 Objetivos Específicos em mulheres sedentárias submetidas à Corrente de Kots:**

- Analisar a atividade das enzimas AChE em sangue total.
- Verificar a atividade das enzimas NTPDase, Ecto-5'-nucleotidase e ADA em plaquetas.
- Analisar a atividade das enzimas SOD e CAT em sangue total.
- Determinar o nível de peroxidação lipídica em soro.

### **3. MANUSCRITO**

#### **3.1 Manuscrito 1:**

EFFECTS OF THE KOTS CURRENT ON OXIDATIVE STRESS, PURINERGIC AND  
CHOLINERGIC ENZYMES IN SEDENTARY WOMEN

EFFECTS OF THE KOTS CURRENT ON OXIDATIVE STRESS, PURINERGIC  
AND CHOLINERGIC ENZYMES IN SEDENTARY WOMEN

Jordana De Bona<sup>1\*</sup>, Daniela Zanini, <sup>1</sup> Andréia Machado Cardoso<sup>1</sup>, Diéssica Padilha Dalenogare<sup>1</sup>, Luana Paula Pelison<sup>1</sup>, Fátima Abdalla<sup>1</sup>, Pauline da Costa<sup>1</sup>, Vera Maria Morsch<sup>1</sup>, Maria Rosa Chitolina Schetinger<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Maria, Campus Universitário, Camobi, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil

\*Corresponding author:

Address correspondence and reprint requests to:

Maria Rosa Chitolina Schetinger ([mariachitolina@gmail.com](mailto:mariachitolina@gmail.com))

Tel: + 55-55-3220-9557; Fax: + 55 55 3220-8978



## ABSTRACT

The Russian Current (RC) or Kots Current (2500 Hz) is a form of electrical stimulation that causes the shortening of a muscle or muscle group similar to physiological contraction. The technique is used by physiotherapists in the area of Dermato-Functional Physiotherapy, to activate little-toned muscles or muscle groups, a result of inactivity. The aim of the study was to analyze whether the application of RC alters acetylcholinesterase (AChE), Ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase (E-NTPDase), Ecto-5'-nucleotidase, adenosine deaminase (ADA), as well as superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) activity and TBARS levels. The group consisted of 15 sedentary female patients, submitted to 10 sessions of RC for 30 minutes each. Using a Dualpex 961, 4 self-adhesive electrodes were placed on the rectus abdominis and intensity (mA) was increased until the patient's threshold of tolerance. Nine mL of blood were collected in vacutainer tubes with citrate anticoagulant, before and after the application, at sessions S1, S5 and S10. The results show increased activity of AChE in S1, S5 and S10 of acute RC application. NTPDase was increased in the hydrolysis from ATP to ADP and from ADP to AMP in acute S1 and S5 applications. Ecto-5'-nucleotidase increased in AMP hydrolysis to Adenosine in acute application S1. Showed no difference in any of the applications, the activity of ADA, the activity of antioxidants SOD and CAT and levels of TBARS. Thus, RC exerts a noticeable change in the activity of enzymes that hydrolyze ACh and ATP when acutely applied. These results suggest that RC generates muscle contraction and hence an improvement in local blood supply.

Keywords: Russian Current (RC); Kots Current; Electrical Stimulation; Purinergic System; Cholinergic System; Oxidative Stress.

## 1. INTRODUCTION

The Russian Current (RC) or Kots Current is an electrical stimulus with a medium frequency of 2500Hz, which promotes a muscle or muscle group to contract. This technique is used by professionals in the field of Dermato-Functional Physiotherapy, to activate little-toned muscle groups. This low tone is called muscle flaccidity within the Dermato-Functional approach and is caused by sedentarism. RC can also be used to activate atrophied muscles by immobilization of one or more segments of the body due to trauma immobilization or postoperative situations [1, 2].

Muscle contraction triggered by electrical stimulation is similar to physiological muscle contraction, where the electric stimulus is captured by the motor nerve responsible for the selected muscle, which may be composed of type I or II fibers. The stimulus to be picked up by the efferent nerve of the muscle, generating an action potential that depolarizes the membrane of cells participating in the muscle shortening mechanism. The synaptic vesicles to be depolarized release ACh, a precursor of muscle contraction, along with the release of  $\text{Ca}^{2+}$  coming from the Endoplasmic Reticulum, and other ions that are released into the extracellular means by depolarization of the membranes of cells in the selected muscle [3, 4, 5].

As already well documented in studies by Correia-De-Sá and Ribeiro [6], Correia-De-Sá and Timothy and Ribeiro [7], the release of adenine nucleotides is closely related to ACh release at the neuromuscular junction. The ACh released into the extracellular means, which lies within nerve endings, is part of the cholinergic system in humans and can be found in non-neural tissues such as the immune system and the blood. Ach is made up of muscarinic and nicotinic receptors. In the circulating peripheral blood, ACh has a physiological function of immune modulation, and in high concentrations in inflammatory processes, it exhibits an anti-inflammatory function. ACh is inactivated by the specific enzyme acetylcholinesterase (AChE) and the non-specific butyrylcholinesterase (BChE) [8, 9, 10, 11].

Another important neurotransmitter released with ACh is ATP and is degraded by local enzymes [12, 13] or may pass through the capillary endothelium into the vascular system, where large concentrations of enzymes, known as ecto-nucleotidases, degrade ATP to adenosine, forming the Purinergic System. These nucleotides and adenine nucleosides which are metabolized have different functions

depending on their concentrations, which may be neuromodulatory, neurotransmitter or vasodilatory [14, 7, 15, 12, 16].

Another mechanism present during excitation of a muscle or muscle group from repetitive exercise is increased oxygen consumption. While the muscles make greater use of O<sub>2</sub>, they start to produce some substances, which are not beneficial to the body called reactive oxygen species (ROS). These substances are neutralized by antioxidants that repair the damage that ROS can cause to the body. When ROS production exceeds that of antioxidants during the various muscle contractions performed in exercise, it is called Oxidative Stress [17, 18, 19].

Thus, in healthy tissues the effects of ROS are balanced by the action of antioxidant enzymes, such as superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT). These antioxidant defenses are important because they directly supply the formation of free radicals such as superoxide, hydrogen peroxide, providing protection for biological tissues. In tissues showing biological changes, the production of ROS is exacerbated and antioxidants are not sufficient to neutralize them, so that ROS can attack the lipid layer of the cells giving rise to the phenomenon we call lipid peroxidation, which can be identified by thiobarbituric acid active substance (TBARS) [18, 17, 19].

Sedentary lifestyle is also on the production of ROS, because it consists of a decrease or lack of physical activity. It is considered the main cause of increased incidence of several chronic hypertension, diabetes, obesity, anxiety, depression, increased cholesterol, myocardial infarction are a few examples of diseases to which the sedentary individual is exposed. In addition to being considered the main risk factor for sudden death and is most often associated directly or indirectly to cause or worsening of most chronic diseases. The locomotor system and other organs and systems required for the different forms of physical activity, generating a functional regression process characterized in the case of the skeletal muscles, one associated with atrophy phenomenon of muscle fibers, loss of joint flexibility, as well as the functional impairment of various organs [21, 22].

As mentioned above, electrical stimulus triggers muscle contraction and provides local beneficial changes such as improvement in the blood supply and may bring about biochemical alterations, as has been observed in other studies. Based on the assumption that electrical stimulus brings local benefits, our study aims to analyze whether the application of RC alters the activity of some enzymes on the systemic level, that is, away from the site of application.

Our hypothesis is that the application of RC alters the Purinergic, Cholinergic and Oxidative Stress enzyme activity, analyzed in whole blood, platelet and serum of sedentary women.

## 2. Materials and methods

### 2.1 Chemicals

Nucleotides, HEPES and Trizma base were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). All other reagents used in the experiments were of analytical grade and of the highest purity.

### 2.2 Patient selection

This study was approved by the Ethics Committee of the Federal University of Santa Maria (UFSM) under protocol number 0123.0.243.000-10 and all participants signed the Informed Consent (IC). This group consisted of 15 female volunteers aged 18 to 25 years, sedentary (not exercising three times a week for at least 6 months), with body mass index (BMI) <25, with no history of gestation or chronic diseases and that were using oral or injectable contraceptives. We chose sedentary women because they do not present any other specific activity in addition to their daily activities, which could interfere with the results.

Prior to application of the therapeutic procedure an assessment was carried out with data for each patient consisting of personal data and previous history of pathologies. These data are presented in Table 1.

The therapeutic procedure consists of applying RC by adapting surface electrodes (self-adhesive) to the abdominal area, specifically the rectus abdominis. A Dualpex 961, Quark brand, equipment was used for the application, properly calibrated, with two (2) channels, two electrodes per muscle bundle, with stimulation

ramped during 1 second for the ascent and the descent, in 5/2 mode. Intensity of the RC is controlled according to the tolerance of patient. The ten applications lasted for a period of 30 minutes each. 9 mL of blood were collected prior to and after application. This protocol was performed on the first, fifth and tenth days of RC application. Blood samples were collected in vacutainer tubes using citrate as anticoagulant, serum and plasma.

### 2.3 Group characteristics

Blood collection occurred before and after RC application (Pre- and Post-application) in the 1<sup>st</sup> (S1), 5<sup>th</sup> (S5) and 10<sup>th</sup> (S10) sessions. We emphasize that the Pre- and Post- session results were analyzed statistically in order to emphasize the acute action of the application procedure as well as a comparison of Pre-Pre results in order to highlight the chronic action of the application procedure (Study design 01).

### 2.4 Sample preparation for acetylcholinesterase (AChE) activity

Whole blood AChE activity was determined by the method of Ellmann et al. [22], modified by Worek et al. [23]. In order to achieve temperature equilibration and complete reaction of sample matrix sulfhydryl groups with DTNB, the mixture was incubated for 10 min prior to addition of substrate. Enzyme activity was corrected for spontaneous hydrolysis of the substrate and DTNB degradation. BChE was inhibited by ethopropazine. AChE activity was measured at 436 nm and 37°C using polystyrene cuvettes. The activity of whole blood AChE was calculated from the quotient between AChE activity and protein content and the results are expressed as  $\mu\text{mol/h/mg}$  of protein.

### 2.5 Platelet rich plasma preparation (PRP)

The PRP was prepared according to Pilla et al. [25], with minor modifications. Briefly, the blood was collected in 0.129 M citrated vacutainer tubes and centrifuged at 1000 rpm for 10 min. After this, the PRP was centrifuged at 3500 rpm for 30 min and washed twice with 3.5 mM HEPES buffer, pH 7.0, which contained 142 mM NaCl, 2.5 mM KCl and 5.5 mM glucose. The platelet pellets were resuspended in HEPES buffer and the protein was adjusted to 0.4–0.6 mg/mL for the determination of ectonucleotidase activities. The integrity of the platelet preparation was confirmed

by determining the lactate dehydrogenase (LDH) activity using the labtest kit (Labtest, Lagoa Santa, MG, Brasil).

## 2.6 NTPDase and Ecto-5'-nucleotidase activity determination in platelets

Ectonucleotidase activities were determined using a PRP preparation according to Pilla et al. [25]. Briefly, to determine NTPDase activity, 20 mL of PRP preparation were added to the system mixture, which contained 5 mM  $\text{CaCl}_2$ , 100 mM NaCl, 5 mM KCl, 6 mM glucose and 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4. The reaction was started by the addition of 20  $\mu\text{L}$  of ATP or ADP (1mM) as substrate. For AMP hydrolysis, 5'-nucleotidase activity was determined as described above, except that 5 mM  $\text{CaCl}_2$  was replaced by 10 mM  $\text{MgCl}_2$  and the nucleotide added was 2 mM AMP. Both reactions were stopped by the addition of 200  $\mu\text{L}$  of 10% trichloroacetic acid (TCA) to provide a final concentration of 5%. After this, the inorganic phosphate released by ATP, ADP and AMP hydrolysis was determined in triplicate by the method of Chan et al. [20] using  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  as standard. The same process was carried out in control tubes to exclude non-enzymatic hydrolysis, by adding 20  $\mu\text{L}$  of protein to the reaction medium after TCA. Results were expressed as nmol inorganic phosphate released/minute/milligram of protein (nmol Pi/min/mg protein).

## 2.7 Adenosine deaminase activity determination in platelets

ADA was determined according to Guisti & Galanti [26]. Briefly, 50 mL of serum or platelets reacted with 21 mmol/L of adenosine, pH 6.5, and was incubated at 37°C for 60 min. This method is based on the direct production of ammonia when ADA acts in excess of adenosine. The protein content used for the platelet experiment was adjusted to between 0.7-0.9 mg/mL. Results were expressed in units per liter (U/L). One unit (1 U) of ADA is defined as the amount of enzyme required to release 1 mmol of ammonia per minute from adenosine at standard assay conditions.

## 2.8 Superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) activities

Superoxide dismutase activity in whole blood was performed according to the method of Misra; Fridovich [27]. In this method, SOD present in the sample competes with the detection system for the radical superoxide. A unit of SOD is defined as the amount of enzyme that inhibits by 50 % the speed of oxidation of adrenalin. The oxidation of adrenalin leads to the formation of the colored product, adrenochrome,

which is detected by spectrophotometer. SOD activity is determined by measuring the speed of adrenochrome formation, observed at 480 nm, in a reaction medium containing glycine–NaOH (50 mM, pH 10) and adrenalin (1 mM). SOD activity was expressed in U SOD/mg protein.

The determination of CAT activity was carried out in accordance with a modified method of Nelson and Kiesow [28]. This assay involves the change in absorbance at 240 nm due to CAT-dependent decomposition of hydrogen peroxide. An aliquot (0.02 mL) of blood was homogenized in potassium phosphate buffer, pH 7.0. The spectrophotometric determination was initiated by the addition of 0.07 mL in an aqueous solution of 0.3 mol/L hydrogen peroxide. The change in absorbance at 240 nm was measured for 2 min. CAT activity was calculated using the molar extinction coefficient ( $0.0436 \text{ cm}^2/\mu\text{mol}$ ) and the results were expressed as nmol/mg protein.

## 2.9 Determination of lipid peroxidation

Lipid peroxidation was estimated by measuring TBARS in serum samples according to a modified method of Jentzsch [29]. Briefly, 200  $\mu\text{L}$  of serum was added to the reaction mixture containing 1 mL of 1 % ortho-phosphoric acid and 0.25 mL alkaline solution of thiobarbituric acid-TBA (final volume 2.0 mL) followed by 45 min heating at 95°C. The results were expressed as nanomole MDA per mL of serum (nmol/mL).

## 2.10 Protein determination

Protein was determined by the Coomassie blue method according to Bradford (1976) using bovine serum albumin as standard.

## 2.13 Statistical analysis

The results are presented as measures of position and variability in the data distribution. For each statistical analysis, normality tests were applied to verify whether the variables presented normal (Gaussian) distribution, taking into account the dispersion of the data, lack of distribution symmetry, the rejection of the normality assumption and / or the small size sample in some groups. We used the Shapiro-Wilk normality test at a 5% significance level. When data was not normal, in the analysis comparing the variables in the three evaluations, the Friedmann test was

performed, which is a nonparametric test used to compare linked sample data, that is, when the same subject is evaluated more than once. It should be used for a related design when the same subject (or paired subjects) are distributed over three or more experimental situations. When the variables followed a normal distribution, comparisons between assessments were made using analysis of variance with repeated measures over time. If significant differences were detected, the Bonferroni multiple comparison test was applied to identify which assessments were different.

To detect differences between pre and post treatments for each of the variables, we used a paired t test for normal distribution samples and the nonparametric Wilcoxon test for those samples for which the normality hypothesis was rejected. Significance was considered to be  $p < 0.05$ . Analyses were performed using SPSS 15.0 software.

### 3 RESULTS

#### 3.1 Characteristics of Patients

Table 1 presents the characteristics of patients.

#### 3.2 AChE

##### Acute Application Analysis

Graphic 1 presents the comparison of pre and post treatment results in each of the sessions (1, 5, 10) and the respective p values, taking into consideration the variables related to acetylcholinesterase (AChE).

Post-treatment values for AChE 1, AChE 5, AChE 10 were significantly increased when compared to pre-treatment. For the other variables there was no significant difference, despite all the variables presenting a higher mean after treatment in all evaluations (at a significance level of  $p < 0.05$ ).

##### Chronic Application Analysis

Graphic 2 shows a comparison of pre-application AChE values for S1, the S5 and S10, where no significant difference for AChE were found for the three pre-treatment sessions.



### 3.3 ATP, ADP, AMP and adenosine hydrolysis

#### Acute Application Analysis

NTPDase activity as well as 5'-nucleotidase and ADA activity are shown in Graphics 3, 5, 7 and 9. An increased NTPDase activity for ATP and ADP hydrolysis was observed in Sessions 1 and 5 (S1 and S5) by comparing the Pre- and Post-application values ( $P < 0.05$ ). On the other hand, in Session 10 (S10) there was no change in NTPDase activity for ATP or ADP hydrolysis.

An increase in the 5'-nucleotidase activity for the hydrolysis of AMP was observed in Session 1 (S1) ( $p < 0.05$ ). On the other hand, in Sessions 5 and 10 (S5 and S10) there was no change in 5'-nucleotidase to the AMP hydrolysis. No significant differences were found for ADA activity.

#### Chronic Application Analysis

NTPDase activity for both ATP and ADP hydrolysis in the pre-applications can be seen in Graphics 4 and 6. There was an increase in NTPDase activity for ATP and ADP hydrolysis from Pre-Session 1 to Pre-Session 5 ( $P < 0.001$ ). On the other hand, when comparing Pre-session values of Sessions 1 and 10, there was no significant difference in NTPDase activity for both ATP and ADP hydrolysis.

Ecto-5'-nucleotidase activity for AMP hydrolysis (Graphic 8) was increased from Pre-session 1 to Pre-sessão 5 ( $P < 0.05$ ), but there was no difference between Pre-Sessions 1 and 10.

In the chronic application, there was no significant difference in the ADA activity (Graphic 10).

### 3.4 SOD, CAT and TBARS

#### Acute Application Analysis

Table 2 shows the comparison of Pre- and Post-treatment in each of the sessions (1, 5, 10), for superoxide dismutase - SOD, catalase - CAT and thiobarbituric acid reactive substance - TBARS, where the only significant difference observed was reduction in CAT 10 activity.

## Chronic Application Analysis

Table 3 shows the comparison of the Pre- treatment in each of the sessions (1, 5, 10), for superoxide dismutase - SOD, catalase - CAT and thiobarbituric acid – TBARS, where the only significant difference observed was reduction in SOD activity.

## 4. DISCUSSION

Although RC is widely used as a form of treatment for increasing muscle tone in the new area of Dermato-Functional, little is known about the physiological bases in purinergic, cholinergic and Oxidative Stress events. Our results indicate that subcutaneous stimulation causes changes in extracellular concentrations of ACh and of purines.

In our study, there was an increase in AChE activity, which may indicate that acute application of RC triggered greater release of ACh substrate in the neuromuscular junction. Correia-de-Sá and Ribeiro [6] and Correia-De-Sá and Ribeiro and Timóteo [7] reported that high frequency of motor nerve stimulation increases the release of ACh derived from nerve endings by activation of nicotinic receptors, due to repetition of stimulus. We suggest therefore that there was an increase in ACh release found at the neuromuscular junction was due to increased AChE activity in the acute application.

We observed increased in the activity of enzymes that comprise the system of purines that hydrolyze ATP nucleotides in Pre- and Post values in the acute applications S1 and S5, as well as in the comparison between Pre-Session values in applications S1 and S5. In subsequent applications, there were no further changes in activity of enzymes that comprise the system of purines, possibly due to physiological adaptations in response to the stimulus. For Zimmermann and Whittaker [30], this decrease in purinergic system activity is due to prolonged stimulation of the nerve endings suffering an overload, thus leading to decreased release of ACh and ATP, which corroborates with the findings in our study.

Other treatments involving mechanical manipulation of joints and muscles, such as chiropractic and massage therapy, have also led to changes in the outflow of cytosolic ATP, bringing about an increase in extracellular adenosine [3, 31]. Burnstock [32] considers ATP to be released in response to any mechanical,

electrical or heat stimulus. Once released, ATP acts as a transmitter, which binds purinergic receptors. Bekar et al. [33] found deep brain stimulation to be associated with manifold increased of extracellular ATP and adenosine, corroborating other results using transcutaneous electrical nerve stimulation and electroacupuncture.

In our study, RC initially promoted an increase in 5'-nucleotidase activity, increasing release of adenosine in the blood stream, consequently suggesting the occurrence of vasodilation. These increases may indicate a response to acute cutaneous stimulation and subsequent adaptation to stimulus as previously described, where the muscle no longer responds to the stimulus.

Muscle contraction leads to release of ATP nucleotides, which is triggered by both the motor nerve or by activation of the sympathetic nerve [35]. In our study, transcutaneous stimulation was applied through motor nerve stimulation. However, our results for ectonucleotidases in platelets are in line with those of Agne [34] and Burnstock [35], where there was an increase in the release of ATP in the acute application. However, in the chronic application, NTPDase activity for hydrolysis of ATP only to compare the time Pre S1 to S5 Pre time, as we can see in Table 05.

ADP nucleotides are ATP degradation products that act on the purinergic receptors on the luminal surface of endothelial capillaries and cells to initiate a retrograde response that leads to dilation of arterioles due to the increased flow [36]. Furstenau et al., [37] reported a decrease in the levels of purines, suggesting a compensatory mechanism of endothelial NTPDase-1, explaining the depletion in levels of ADP and AMP, which is similar to our results for ecto-nucleotidases in platelets, when comparing the Pre- and post-application values of S5 and S10.

Adenosine is inactivated in the extracellular means by the action of ADA. In our study, there was no inactivation of adenosine in the form of inosine. Consequently, adenosine maintained its properties of platelet inhibition, vascular tone modulation and thromboregulation, all of which contribute to its role in reducing vascular diseases [38, 39]. It is possible that ADA showed no increase in its activity, because the patients in this study did not present any pre-disposition to diseases related to thrombus formation.

Some studies also claim that exercise induces a continuous modulation of the purinergic system, leading to changes in purinergic receptors, characterized by rapid

desensitization and sustained exposure of the agonist response. In addition, repeated transient episodes of chronic stimulation may be less efficient to induce modulation of the purinergic system, due to the lack of continual induction. On the other hand, exercise triggers joint movement but not the isolated muscle contraction as is the case with stimulation [18, 17, 40, 41].

Contractile activity also involves increased generation of ROS in muscle, depending on factors such as the nature of muscle contraction, duration of contraction, increased body temperature, intensity and duration of exercise and fatigue [42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50]. Takahashi et al., [51] and Cabrera, Domenech and Viña [50] affirm that moderate exercise increases the activity of antioxidants in human serum, such as SOD and CAT, leading us to believe that this way of exercise may be also considered to provide beneficial antioxidant effects. Ashton et al., [53] demonstrated that when an individual is exposed to intense exercise to the point of exhaustion, an increase of ROS in serum occurs.

In our study, SOD, CAT and TBARS did not increase at any time point. This may be related to the lack of an increase in O<sub>2</sub> consumption, due to the stimulus occurring without joint movement or an increase in temperature and with maintained intensity. Maughan et al., [54] reported increased serum concentrations of lipoperoxide observed 6 hours after 45 minutes of running with eccentric contraction. Thus, the lack of an increase in these antioxidants may be due to the fact that once the participants reached maximum intensity of the device, intensity remained constant and that they were lying down to receive the stimulus for no more than 30 minutes during each application.

## 5. CONCLUSION

We observed that acute electrical stimulation applied in the form of RC exerted a notable change in the activity of enzymes that hydrolyze ACh and ATP to adenosine. These results suggest that RC generates muscle contraction and hence an improvement in local blood supply. This is important for physiotherapists who work in rehabilitation contexts where it is not possible to carry out joint movement. In Dermato-Functional therapy, RC can be used to activate muscle fibers as a complement to exercise, since RC alone does not have any action on oxidative stress.

## REFERENCES

- [1] WILLIAMS, P. E. et al. The importance of stretch and contractile activity in the prevention of connective tissue accumulation in muscle. *J Anat* 1988; 158: 109-114.
- [2] MAFFIULETTI, N. A. et al. Effect of electromyostimulation training on soleus and gastrocnemii H- and T-reflex properties. *Eur J Appl Physiol* 2003; 90.5.6: 601-607.
- [3] HOOGLAND, R. Strengthening and Stretching of Muscles Using Electrical Current. *Enraf Nonius, Delf, Holand* 1988; 01-14.
- [4] EVANGELISTA, A. R. et al. Estudo Comparativo do Uso da Eletroestimulação na Mulher Associada com a Atividade Física Visando a Melhora da Performance Muscular e Redução do Perímetro Abdominal. *Rev Fisiot Brasil, São Paulo* 2003; 4.1: 49-59.
- [5] GONÇALVES, A. P. et al. Activation of a TRP-like channel and intracellular Ca<sup>2+</sup> dynamics during phospholipase-C-mediated cell death. *J Cell Scien* 2014; 127: 3817-3829.
- [6] CORREIA-DE-SÁ, P.; RIBEIRO, J. A. Potentiation by tonic A<sub>2a</sub>-adenosine receptor activation of CGRP-facilitated [<sup>3</sup>H]-ACh release from rat motor nerve endings. *J Pharmacol* 1994; 111: 582-588.
- [7] CORREIA-DE-SÁ, P.; TIMÓTEO, M. A.; RIBEIRO J. A. Presynaptic A<sub>1</sub> inhibitory/A<sub>2A</sub> facilitatory adenosine receptor activation balance depends on motor nerve stimulation paradigm at the rat hemidiaphragm. *J Neurophysiol* 1996; 76: 3910-3919.
- [8] FISCHER, D. et al. A role for adenosine deaminase in monocyte maturation. *J Clin Invest* 1976; 58: 399-407.
- [9] SPYCHALA, J. Tumor promoting functions of adenosine. *Pharmacol Ther* 2000; 87: 161-173.
- [10] MESULAM, M. M. et al. Acetylcholinesterase knockouts establish central cholinergic pathways and can use butyrylcholinesterase to hydrolyse acetylcholine. *Neurology* 2002; 110. 4: 627-639.
- [11] COKUGRAS, A. N. Butyrylcholinesterase: Structure and physiological importance. *T J Biochem* 2003; 28. 2: 54-61.

- [12] SILINSKY, E. M. On the association between transmitter secretion and the release of adenine nucleotides from mammalian motor nerve terminals. *J Physiol* 1975; 247: 145-162.
- [13] CARDOSO, et al. Ecto-AMP deaminase blunts the ATP-derived adenosine A2A receptor facilitation of acetylcholine release at rat motor nerve endings. *J Physiol* 2003; 549.2: 399-408.
- [14] ARAÚJO, M. D. et al. Relative contribution of ecto-ATPase and ecto-ATPDase pathways to the biphasic effect of ATP on acetylcholine release from myenteric motoneurons. *Brit J of Pharmacol* 2009; 156: 519-533.
- [15] BURNSTOCK, G. et al. Purinergic signalling in the musculoskeletal system *Purinergic Signalling. Physiology* 2013; 9: 541-572.
- [16] ZIMMERMANN, H. Ectonucleotidases: some recent developments and a note on nomenclature. *Drug develop Res* 2001; 52: 44-56.
- [17] KAROUI, H. et al. Characterization of sulfur-centered radical intermediates formed during the oxidation of thiols and sulfite by peroxynitrite- ESR-SPIN trapping and oxygen uptake studies. *J Biol Chem* 1996; 271: 6000-6009.
- [18] AL-GADANI, Y. et al. Metabolic biomarkers related to oxidative stress and antioxidant status in Saudi autistic children. *Clin Biochem* 2009; 42: 1032-1040.
- [19] MASSAAD, C. A.; KLANN, E. Reactive oxygen species in the regulation of synaptic plasticity and memory. *Antiox R Sign* 2011; 14: 2013-2054.
- [20] HALLGREN, M. P. et al. Exercise, physical Activity, and Sedentary Behavior in the Treatment of Depression: Broadening the Scientific perspectives and Clinical Opportunities. *Front Psych.* 2016.
- [21] WULLEMS, A. J. et al. A review of the assessment and prevalence of sedentarism in older adults, its physiology/health impact and non-exercise mobility counter-measures. *Biogerontology.* 2016.
- [22] ELLMAN, G. L. et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* 1961; 7: 88-95.
- [23] WOREK, F. Improved determination of acetylcholinesterase activity in human whole blood. *Clin Chim Act* 1999; 288: 73-90.

- [24] ROCHA, J. B. T.; EMANUELLI, T.; PEREIRA, M. E. Effects of early undernutrition on 15 kinetic parameters of brain acetylcholinesterase from adult rats. *Acta Neurobiol* 1993; 53: 431-437.
- [25] PILLA, C. et al. ATP diphosphohydrolase activity (apyrase, EC 3.6.1.5) in human blood platelets 1996; 7.4: 225-230.
- [26] GUISTI, G.; GALANTI, B. Colorimetric method. In: Bergmeyer HU, editor. *Methods of enzymatic analysis*. Verlag Chemie: Weinheim 1984; 315-323.
- [27] MISRA, H. P.; FRIDOVICH, I. The role of superoxide anion in autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *The J Biol Chem* 1972; 247: 3170-3175.
- [28] NELSON, D.P.; KIESOW, L. A. Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25-C (with molar extinction coefficients of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solutions in the UV). *Anal Biochem* 1972; 49: 474-478.
- [29] JENTZSCH, A.M. et al. Improved analysis of malondialdehyde in human body fluids. *F R Biol Med* 1996; 20.2: 251-256.
- [30] ZIMMERMAN, H.; WHITTAKER, V. P. Effect of electrical stimulation on the yield and composition of synaptic vesicles from the cholinergic synapses of the electric organ of torpedo: a combined biochemical, electrophysiological and morphological study. *J Neurochem* 1974; 22.3: 435-450.
- [31] GOLDMAN, J. A.; GARLICK, J. D.; KINGSTON, R. E. Chromatin remodeling by imitator switch (ISWI) class ATP- dependent remodelers is stimulated by histone variant H2A.Z. *J Biol Chem* 2010; 285.7: 4645-4651.
- [32] BURNSTOCK, G. et al. Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. *Physiology* 2007; 87: 659-797.
- [33] BEKAR, L. et al. Adenosine is crucial for deep brain stimulation-mediated attenuation of tremor. *Nat Med* 2008; 14: 75-80.
- [34] AGNE, J. E. *Eletroterapia: teoria e prática*. Santa Maria: Pallotti, 2004.
- [35] BURNSTOCK, G. Pathophysiology and therapeutic potential of purinergic signaling. *Pharm Rev* 2006; 58: 58-86.

- [36] ELLSWORTH, M. L. et al. Erythrocytes: oxygen sensors and modulators of vascular tone. *Physiology* 2007; 24: 107-116.
- [37] FURSTNAU, C. R., et al. Ecto-nucleotide pyrophosphatase/ phosphodiesterase as part of a multiple system for nucleotide hydrolysis by platelets from rats: kinetic characterization and biochemical properties. *Platelets* 2006; 17: 84-91.
- [38] BAKKER, et al. Platelets and ectonucleotidases. *Platelets* 1994; 5: 121-129.
- [39] ZYLKA, M.J. et al. Prostatic acid phosphatase is an ectonucleotidase and suppresses pain by generating adenosine. *Neurology* 2008; 60: 111-122.
- [40] BOYUM, A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 1968; 97: 77-89.
- [41] ATKINSON, B. et al. Ectonucleotidases of the CD39/NTPDase family modulate platelet activation and thrombus formation: potential as therapeutic targets. *Blood Cells Mol Dis* 2006; 36: 217-222.
- [42] POWERS, S. K.; JACKSON, M. J. Exercise-Induced Oxidative Stress: Cellular Mechanisms and Impact on Muscle Force Production. *Physiology* 2008; 88.4: 1243-1276.
- [43] LEVERS, K. et al. Effects of powdered Montmorency tart cherry supplementation on an acute bout of intense lower body strength exercise in resistance trained males. *J of the Intern Soc Sport Nutrit* 2015; 12-41.
- [44] BLOOMER, R. J. et al. Effects of acute aerobic and anaerobic exercise on blood markers of oxidative stress. *J Strength Cond Res* 2005; 19.2: 276-285.
- [45] BLOOMER, R. J. et al. Plasma protein carbonyl response to increasing exercise duration in aerobically trained men and women. *Int J Sport Med* 2007; 28.1: 21-25.
- [46] GOLDFARB, A. H. et al. Resistance exercise effects on blood glutathione status and plasma protein carbonyls: influence of partial vascular occlusion. *Europ J Appl Physiol* 2008; 104.5: 813-819.
- [47] MILLER, L. E. et al; Blood Oxidative Stress Markers During a High Altitude Trek. *Int J Sport Nutr Exerc Metab* 2012 ; 23.1: 65-72.



- [48] NIKOLAIDIS, M. G. et al. Acute exercise markedly increases blood oxidative stress in boys and girls. *Appl Physiol Nutr Metab* 2007; 32.2: 197-205.
- [49] KING, M. A. et al. Hyperthermia, dehydration and osmotic stress: unconventional sources of exercise-induced reactive oxygen species. *A J Physiol*. 2015.
- [50] DAVISON, G. W. et al. Exercise, free radicals, and lipid peroxidation in type 1 diabetes mellitus. *F R Biol Med* 2002; 33: 1543-1551.
- [51] TAKAHASHI, M. et al., Low-Volume Exercise Training and Vitamin E Supplementation Attenuates Oxidative Stress in Post menopausal Women. *J Nutrit Scien Vitam* 2013; 59: 375-383.
- [52] CABRERA, M. C.G.; DOMENECH, E.; VIÑA, J. Moderate exercise is an antioxidant: Upregulation of antioxidant genes by training. Original Research Article *F R Biol Med* 2008; 44: 126-131.
- [53] ASTHON, T. et al. Electron spin resonance spectroscopic detection of oxygen-centered radicals in human serum following exhaustive exercise. *Europ J Appl Physiol* 1998; 77: 498-502.
- [54] MAUGHAN, R. J. et al. Delayed-onset muscle damage and lipid peroxidation in man after a downhill run. *Muscl Nerv* 1989; 12: 332-336.

## Study design 1

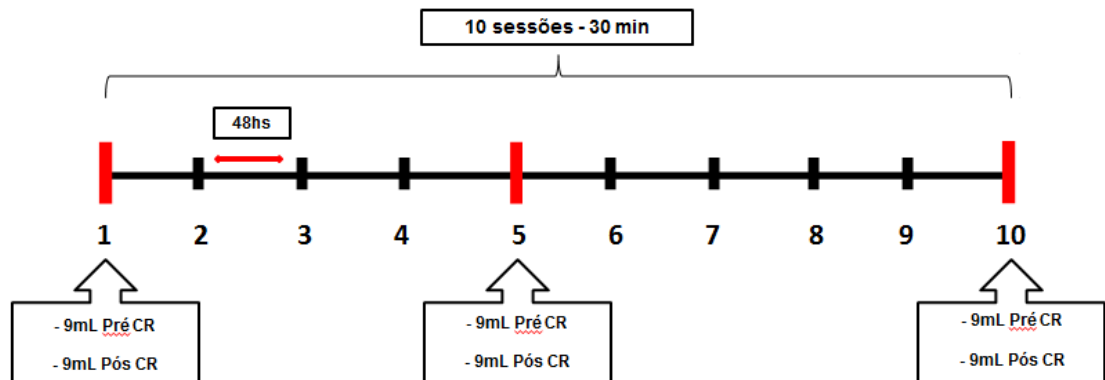
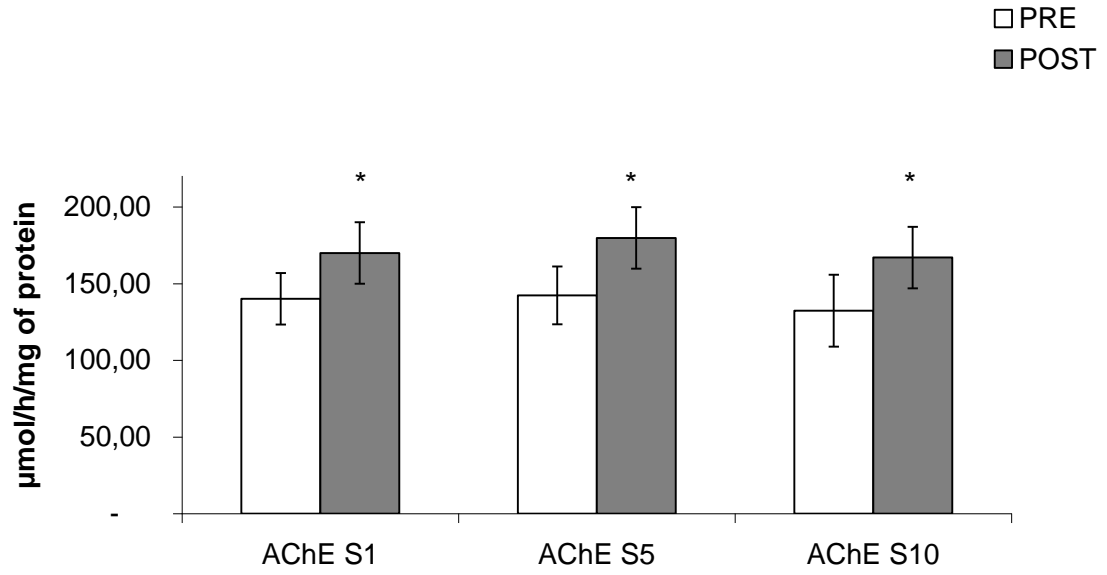


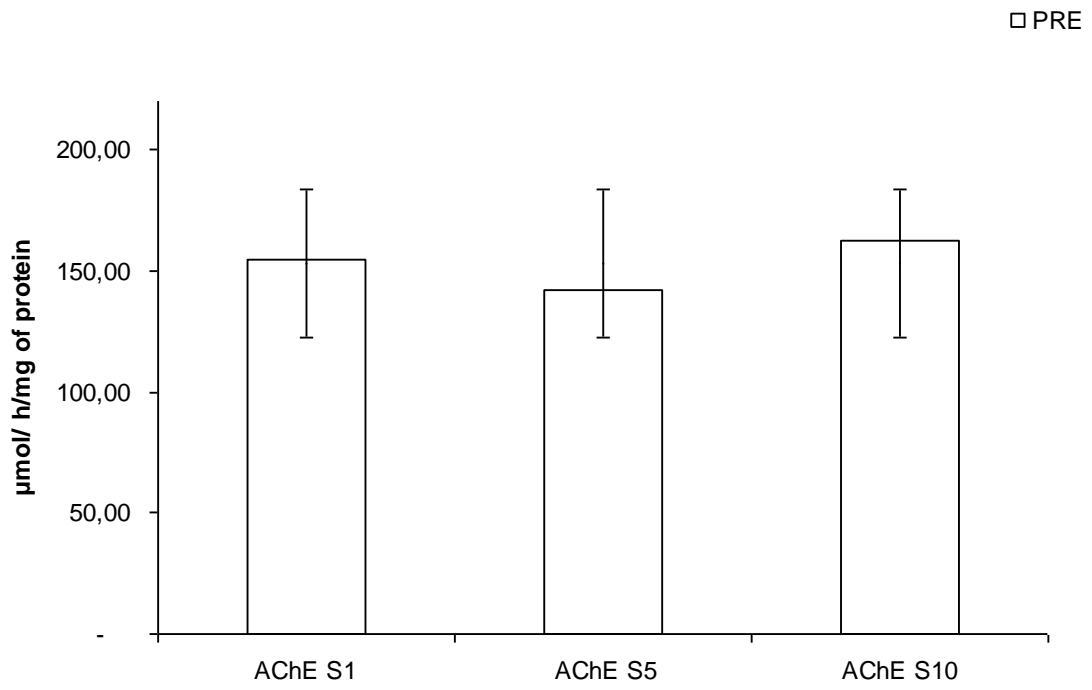
Table 1 - Patient Characteristics

CHARACTERISTICS	PARTICIPANTS
NUMBER OF PARTICIPANTS	15
WEIGHT KG (GROUP MEAN)	60.32 ( $\pm$ 1.624)
BMI (BODY MASS INDEX)	22.21 ( $\pm$ 0.4715)
AGE	21.87 ( $\pm$ 0.6005)
HEIGHT cm	1.649 ( $\pm$ 0.02182)

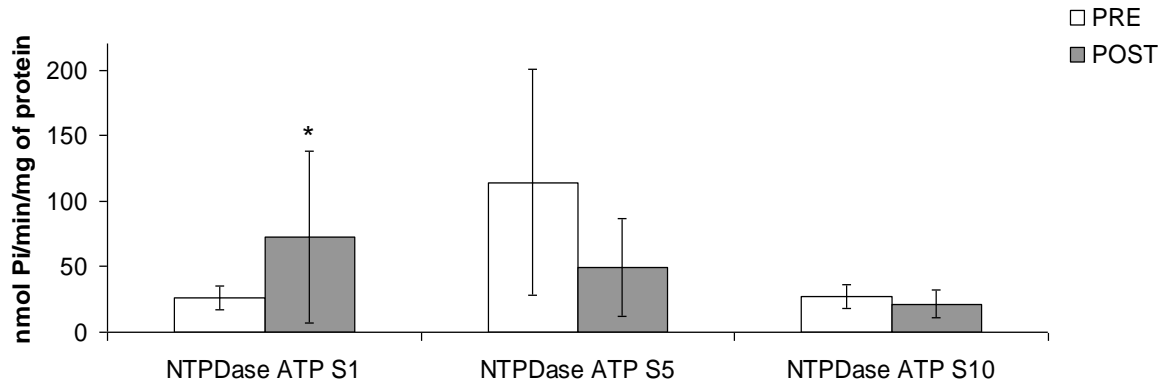
Graphic 1: Effect of Acute RC application on AChE activity in blood of sedentary women



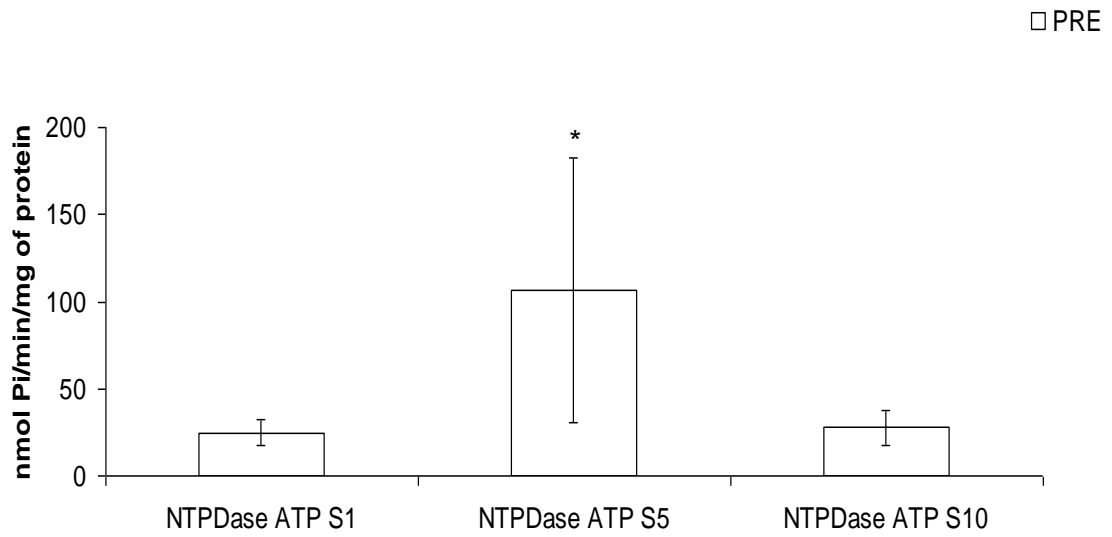
Graphic 2: Effect of Chronicle RC application on AChE activity in the blood in sedentary women



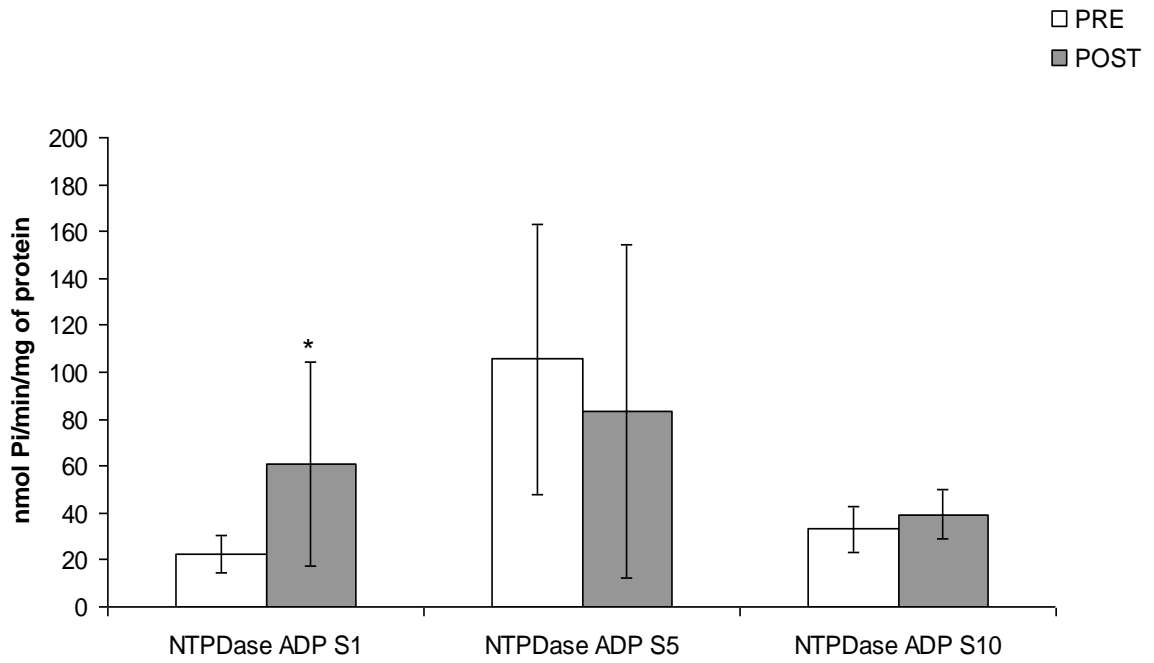
Graphic 3: Effect of Acute RC application on NTPDase activity for Hydrolyses of ATP in platelets of sedentary women



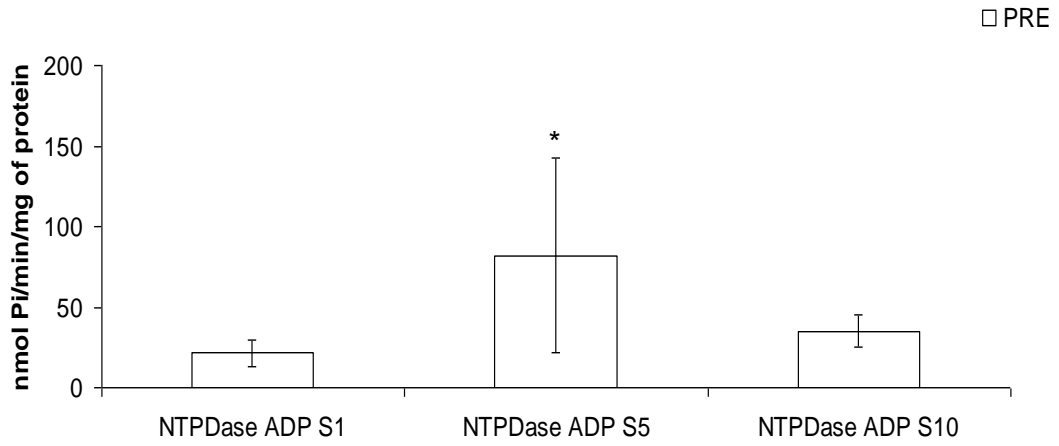
Graphic 4: Effect of Chronicle RC application on NTPDase activity for Hydrolyses of ATP in platelets of sedentary women



Graphic 5: Effect of Acute RC application on NTPDase activity for Hydrolyses of ADP in platelets of sedentary women

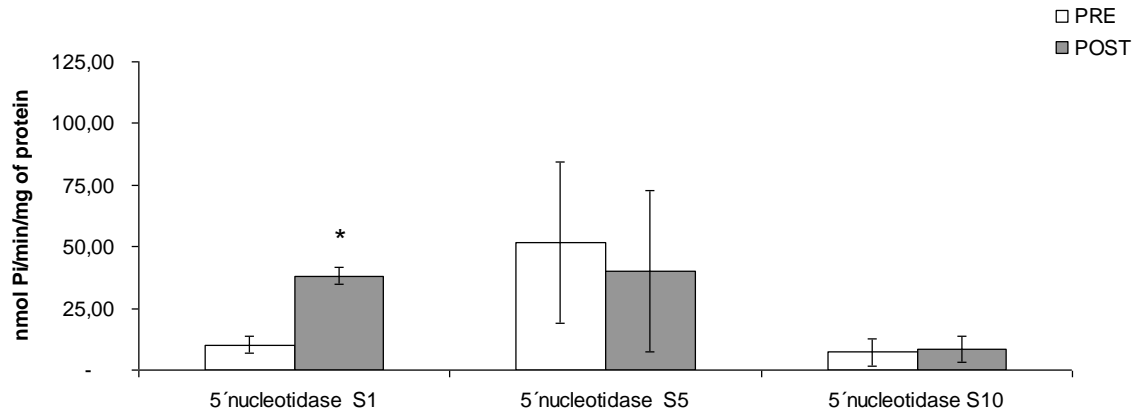


Graphic 6: Effect of Chronicle RC application on NTPDase activity for Hydrolyses of ADP in platelets of sedentary women

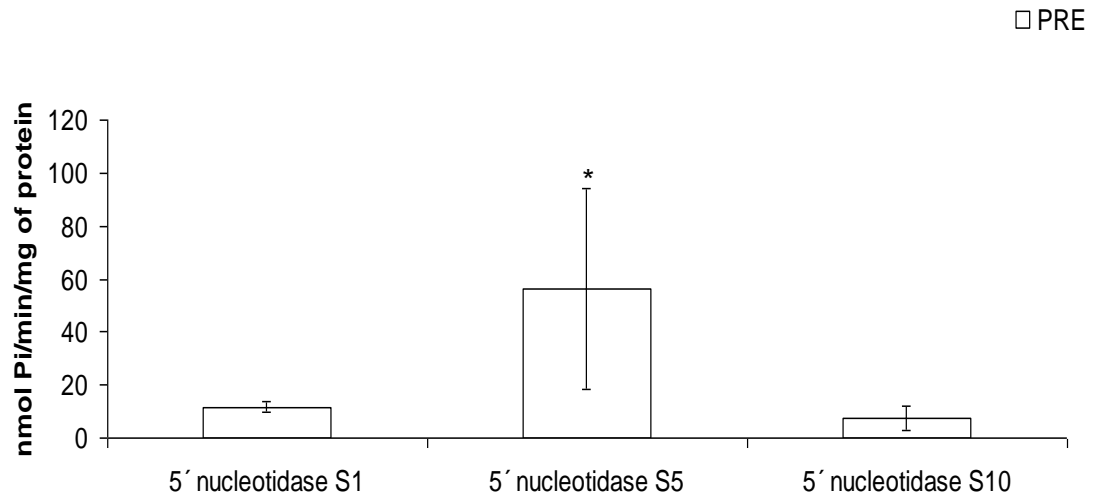




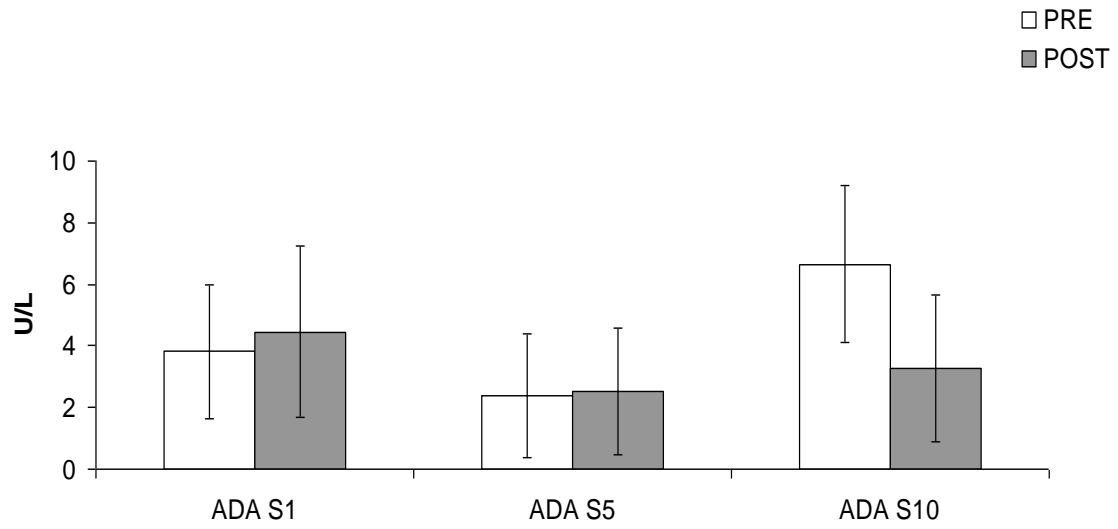
Graphic 7: Effect of Acute RC application on Ecto-5'-nucleotidase activity for Hydrolyses of AMP in platelets of sedentary women



Graphic 8: Effect of Chronicle RC application on Ecto-5'-nucleotidase activity for  
Hydrolyses of AMP in platelets of sedentary women



Graphic 9: Effect of Acute RC application on Adenosine Deaminase (ADA) activity for Hydrolyses of Adenosine in platelets of sedentary women



Graphic 10: Effect of Chronicle RC application on Adenosine Deaminase (ADA) activity for Hydrolyses of Adenosine in platelets of sedentary women

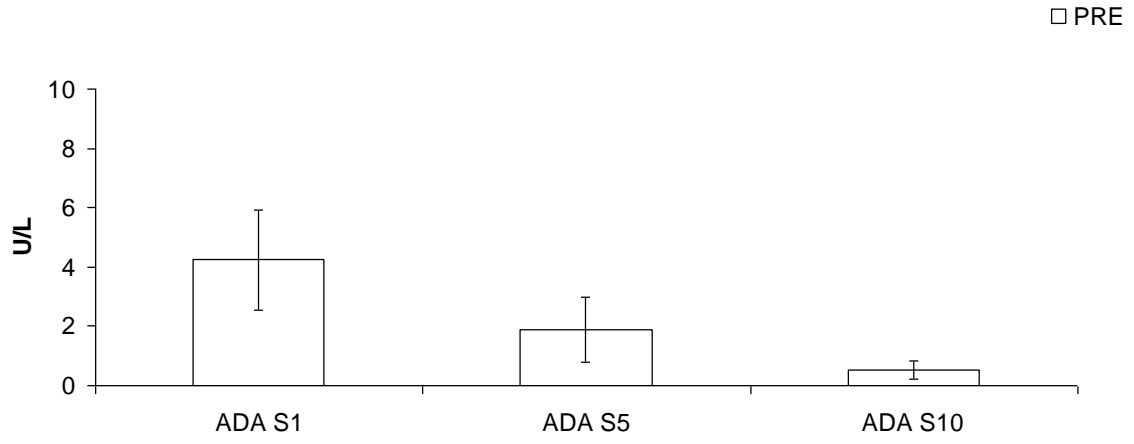


Table 2: Effect of Acute RC application on SOD, CAT and TBARS activity in blood and serum samples of sedentary women

VARIABLES	SESSIONS		p-value
	PRE	POST	
SOD 1	17.37(±7.60)	15.47(±3.51)	0.418
SOD 5	17.38(±4.80)	17.15(±3.79)	0.846
SOD 10	10.79(±4.08)	10.61(±4.07)	0.869
CAT 1	18.68 (±6.31)	15.37(±7.34)	0.161
CAT 5	20.23(±5.69)	19.41(±5.48)	0.779
CAT 10	20.62(±2,35)	18.17(±2,84)	0.001
TBARS 1	12.59(±4.08)	11.43(±4.02)	0.177
TBARS5	12.13(±3.56)	11.53(±4.67)	0.673
TBARS 10	12.92(±2.52)	12.72(±3.82)	0.762

Table 3: Effect of Chronic RC application on SOD, CAT and TBARS activity in blood and serum samples of sedentary women

VARIABLES	SESSIONS – PRE			p-value
	S1	S5	S10	
SOD	18.16 (±7.36)	17.11 (±4.89)	10.94 (±4.20)	0.003
CAT	18.80 (±5.13)	19.49(±5.95)	20.47(±3.16)	0.735
TBARS	12.86(±4.12)	12.44(±3.51)	12.92(±2.52)	0.635

#### 4. CONCLUSÕES

Pode-se concluir que a aplicação aguda da Corrente Russa aumenta a atividade das principais enzimas que compõem os sistemas colinérgico e purinérgico.

Com o aumento da atividade da AChE, ocorrerá possivelmente pelo aumento do substrato ACh na junção neuromuscular liberado a partir do estímulo elétrico.

O aumento na atividade das enzimas NTPDase para os substratos ATP e ADP e da 5'-nucleotidase para o substrato AMP, somadas a diminuição da atividade da enzima ADA, provavelmente ocasionou um aumento na concentração de adenosina no meio extracelular. Estes resultados sugerem que a CR libera nucleotídeos de adenina contidos nas vesículas sinápticas para o meio extracelular, os quais posteriormente foram degradados pelas enzimas que se encontram neste meio.

Frente a estes resultados, sugere-se que a CR possa desencadear a contração muscular, além de aumentar a circulação local. Estes resultados são positivos de certa forma para fisioterapeutas que trabalham na reabilitação pós-trauma ou pós-operatório, onde não se pode realizar o movimento articular de um segmento corporal. E na área de Dermato-Funcional, pode ser usado como complemento do exercício físico (treino), a fim de ajudar a ativar as fibras musculares.

Podemos salientar ainda que não observou-se ação nenhuma da CR sobre o estresse oxidativo, em nenhum momento das análises. Possivelmente, por que as pacientes não foram submetidas as alterações necessárias para o aumento da produção de EROs, como: o aumento de temperatura corporal, aumento da intensidade e ou período de estímulo superior a 30 minutos.

Finalizando mostra-se que a CR leva mudanças na atividade das enzimas das vias colinérgica e purinérgica nas aplicações agudas. Entretanto, sugesse mais estudos, uma vez que não se tem maiores detalhes sobre quais os sistemas que a aplicação da CR teria influência.

## 5. REFERÊNCIAS

- ABBACCHIO, M. P; BURNSTOCK, G. **Purinergic signalling: pathophysiological roles.** J J Pharmacol. 78, 113–145. 1998.
- BLOOMER, R. J. et al. **Plasma protein carbonyl response to increasing exercise duration in aerobically trained men and women.** Intern J Sport Medicin. 28. 1: 21–25, 2007.
- BOURS, M. J. L. et al. **Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation.** Pharmacol Therap.112:358-404. 2006.
- BOTA, A. **Production and certification of an enzyme reference material for adenosine deaminase 1 (BCR 647).** Clin Chim Act. 306. 79-89. 2001.
- BREEN, P.P. et al. **Fine-Wire Electromyography Response to Neuromuscular Electrical Stimulation in the Triceps Surae.** IEEE-Trans Neur Syst Rehab Engin. 2014
- BODIN, P. BURNSTOCK, G. **Purinergic signalling: ATP release.** Neur Res. 26, 959–969. 2001.
- BURNSTOCK, G. **Purinoceptors: ontogeny and phylogeny.** Drug Dev. Res. 39: 204-242. 1996.
- BURNSTOCK, G.; VERKHRATSKY, A. **Evolutionary origins of the purinergic signalling system.** Act Physiol. 195: 415-447. 2009.
- BUVINIC, S. et al. **ATP released by electrical stimuli elicits calcium transients and gene expression in skeletal muscle.** J Biol Chem 284:34490–34505. 2009.
- BURNSTOCK, G. **Purinergic signalling: from discovery to current developments.** Exp Physiol. 99:16–34. 2014.
- BURNSTOCK. G.; VERKHRATSKY, A. **Long-term (trophic) purinergic signalling: purinoceptors control cell proliferation, differentiation and death.** Cell Death Dis. 1, 9. 2010.
- BURNSTOCK, G. **Purinergic nerves.** Pharmacol. Rev. 24: 509-581. 1972.

- CARDOSO, T. M. et al. **Ecto-AMP deaminase blunts the ATP-derived adenosine A2A receptor facilitation of acetylcholine release at rat motor nerve endings.** *J Physiol.* 549.2: 399–408, 2003.
- CASAS, M., et al. **IP3-dependent, post-tetanic calcium transients induced by electrostimulation of adult skeletal muscle fibers.** *J. Gen Physiol.* 136. 4. 455–467. 2010.
- CEA, L. A. et al. **Connexin- and pannexin-based channels in normal skeletal muscles and their possible role in muscle atrophy.** *J Membr Biol* 245:423–436. 2012.
- CORREIA-DE-SÁ, P.; RIBEIRO, J. A. **Adenosine uptake and deamination regulate tonic A2a -receptor facilitation of evoked [3H]-ACh release from the motor nerve terminals.** *Neuroscience.* 73, 85–92.1996.
- CORREIA-DE-SÁ, P.; TIMÓTEO, M. A.; RIBEIRO, J. A. **Presynaptic A1 inhibitory/A2A facilitatory adenosine receptor activation balance depends on motor nerve stimulation paradigm at the rat hemidiaphragm.** *J Neurophysiol* 76:3910–3919. 1996.
- COURTNEY, M. P.; JOHANNSEN, D. L.; RAVUSSIN, E. **Skeletal Muscle Mitochondria and Aging: A Review.** *J Aging Res.* 2012
- CSERNOCH, L. et al. **ATP-induced changes of intracellular calcium concentration in human skeletal muscle fibres in culture.** *J Physiol* 526:30–31. 2000.
- CUNHA, R. A. et al. **Preferential activation of excitatory adenosine receptors at rat hippocampal and neuromuscular synapses by adenosine formed from released adenine nucleotides.** *Br J Pharmacol.* 119, 253–260.1996.
- CUNHA, R. A. **Adenosine as a neuromodulator and as a homeostatic regulator in the nervous system: different roles, different sources and different receptors.** *Neurochem Int.* 38, 107–125. 2000.
- CUNHA, R. A. **Adenosine as a neuromodulator and as a homeostatic regulator in the nervous system: different roles, different sources and different receptors.** *Neurochem Int* 38, 107–125. 2001.



- CUNHA, R. A.; Ribeiro, J. A. **ATP as a presynaptic modulator.** Life Sci 68, 119–137. 2000.
- CUNHA, R. A.; RIBEIRO, J. A. **ATP as a presynaptic modulator.** Life Sci. 68, 119–137. 2000.
- DELLITO, A.; BROWN, M.; STRUBE, M. J. **Electrical stimulation of quadriceps femoris in an elite weight lifter: a single-subject experiment.** Int J Sports Med. 10:187–191. 1989.
- DELLITO, A.; ROSE, S. J.; MCKOWEN, J. M. **Electrical stimulation versus voluntary exercise in strengthening thigh musculature after anterior cruciate ligament surgery.** Phys Ther. 68:660–663. 1988.
- DRACHMAN, D. **Neuromuscular transmission of trophic effects.** Ann. N. Y. Acad. Sci. 183:158-170. 1971.
- ENGEL, A .G. **The neuromuscular junction.** In: ENGEL, A. G.; FRANZINI-ARMSTRONG, C. Myology – basic and clinical. 3.ed. New York: International Edition, p. 325-372. Vol.1. 2003.
- ELTIT, J. M. et al. **Slow Calcium Signals after Tetanic Electrical Stimulation in Skeletal Myotubes.** Biop J. 86. 3042–3051. 2004.
- ERIKSSON, E.; HAGGMARK, T.; KIESSLING, K. H. **Effect of electrical stimulation on human skeletal muscle.** Int J Sports Med 2: 18-22, 1981.
- EVANGELISTA, R.A. et al. **Adaptação da característica fisiológica da fibra muscular por meio de eletroestimulação,** Fisiot B, v.4, n.5, p.326-334, 2003.
- FAHEY, T. D.; HARVEY, M.; SCHROEDER, R.V. **Influence of sex differences and knee joint position on electncal stimulation-modulated strength increases.** Med Sci Sports Exerc 17: 144-147, 1985
- FELDER, C.C. et al. **Therapeutic opportunities for muscarinic receptors in the central nervous system.** J. Med. Chem., 43, 4333 – 4353. 2000.
- FORRESTER, T. **An estimate of adenosine triphosphate release into the venous effluent from exercising human forearm muscle.** J. Physiol. 224: 611-628. 1972.
- FOURE, A. et al., **Time Course of Central and Peripheral Alterations after Isometric Neuromuscular Electrical Stimulation-Induced Muscle Damage.** PLOS ONE. 9. 2014.

- FREDHOLM, B. B. **Adenosine and neuroprotection.** Intern Rev Neurobiol. 40. 259-180. 1997.
- GALLACI, M.; OLIVEIRA, A. C. **Farmacologia da junção neuromuscular.** In: Farmacologia integrada. 3. ed. p. 175-183. Cap. 20. 2007.
- GARCIA, N. et al. **Adenosine A1 and A2A receptormediated modulation of acetylcholine release in the mice neuromuscular junction.** Eur J Neurosci Epub ahead print. 2013.
- GAUTHIER, S. **Advances in the pharmacotherapy of Alzheimer's disease.** CMAJ. 166. 5: 616-623. 2002.
- GERMINARIO, E. et al. **High-frequency fatigue of skeletal muscle: role of extracellular Ca<sup>2+</sup>.** Eur J Appl Physiol. 104:445–453. 2008.
- GOLDFARB, A. H. **Nutritional antioxidants as therapeutic and preventive modalities in exercise-induced muscle damage.** Can J Appl Physiol. 24:249-266, 1999.
- HALLGRENT, M. P. et al. **Exercise, physical Activity, and Sedentary Behavior in the Treatment of Depression: Broadening the Scientific perspectives and Clinical Opportunities.** Front Psych. 2016.
- HUGHES, B. W.; KUSNER, L. L.; KAMINSKI, H. J. **Molecular architecture of the neuromuscular junction.** Muscl Nerv, Vol. 33, no. 4, p. 445-61, 2006.
- HUNSUCKER, S.; MITCHELL, B.; SPYCHALA, J. **The 5'-nucleotidase as regulators of nucleotide and drug metabolism .** Pharmacol Ther. 107. 1: 1-30. 2005.
- ILLES, P.; RIBEIRO, A. **Molecular physiology of P2 receptors in the central nervous system.** Eur J Pharmacol. 483. 1:5-17. 2004.
- KING, M. A.; CLANTON, T. L.; LAITANO, O. **Hyperthermia, dehydration and osmotic stress: unconventional sources of exercise-induced reactive oxygen species.** Amer J Physiol. 2015.
- KLISZCZEWICZ, B. et al. **Acute Exercise and Oxidative Stress: CrossFit™ vs. Treadmill Bout by.** JI Hum Kin. 47:81-90, 2015.
- KOLB, H. A.; WAKELAM, M. J. O. **Transmitter-like action of ATP on patched membranes of cultured myoblasts and myotubes.** Nature. 303:621–623. 1983.

- KOTS, Y. M. **Electrostimulation Canadian-Soviet exchange symposium on electrostimulation of skeletal muscles**, Concordia University, Montreal, Quebec, Canada, December 6–15, 1977
- KOTS, Y. M.; XVILON, V. A. **Trenirovka mishechnoj sili metodom elektrostimuljatsii: soobschenie 2, trenirovka metodom elektricheskogo razdrazenii mishechi**. Teor Pract Fis Cult. 1971;4:66–72.
- KRAMER, J. F.; MENDRYK, S. W. **Electrical stimulation as a strength improvement technique**. J Orthop Sports Phys Ther. 1982;4:91–98.
- MARRS, T. C. **Organophosphate Poisoning**. Pharmac. Ther. v.58, p.51-66, 1993
- MENEGUINI, R. **A toxicidade do oxigênio**. Ciência Hoje.5:28. 1987.
- MESSULAM, M. M. et al. **Acetylcholinesterase knockouts establish central cholinergic pathways and can use butyrylcholinesterase to hydrolyze acetylcholine**. Neurology. 110, 627–639. 2002.
- MORRISSEY, M.C. et al. **The effects of electrical stimulation on the quadriceps during postoperative knee immobilization**. Amer J Sport and Medicin, v.13, n.1, p.40- 45, 1985.
- OSORIOFUENTEALBA, C. et al. **Electrical stimuli release ATP to increase GLUT4 translocation and glucose uptake via PI3K $\gamma$ -Akt-AS160 in skeletal muscle cells**. Diabetes. 62:1519–1526. 2013.
- POLIDORI, M. C. **Physical activity and oxidative stress during aging**. Intern J Sport Medicin. 21: 154-157, 2000.
- RIBEIRO, J. A. et al. **Purinergic regulation of acetylcholine release**. Prog Brain Res 109, 231–241. 1996.
- RIBEIRO, J. A.; WALKER, J. **The effects of adenosine triphosphate and adenosine diphosphate on transmission at the rat and frog neuromuscular junctions**. Br J Pharmacol 54:213–218. 1975.
- RIBEIRO, J. A.; WALKER, J. **Action of adenosine triphosphate on end-plate potentials recorded from muscle fibres of the rat diaphragm and frog sartorius**. Br. J. Pharmacy. 49, 724-725. 1973.

- RINNE, J. O. et al. **Brain Acetylcholinesterase activity in mild cognitive impairment and early Alzheimer's disease.** J Neurol Neurosurg Psychiatry, v.74, p.113- 115, 2003.
- ROBSON, S. C.; SEVIGNY, J.; ZIMMARMENN, H. **The E-NTPDase family of ectonucleotidases: structure, fuction, relationships and pathophysiology significance.** Purinergic Signal. 2. 2:409-430. 2006
- SANDONA, D. et al. **The T-tubule membrane ATP-operated P2X4 receptor influences contractility of skeletal muscle.** FASEB J. 19:1184–1186. 2005.
- SANES, J. R.; LICHTMAN, J. W. **Development of the vertebrate neuromuscular junction.** Ann Rev Neurosc, Vol. 22, p. 389-442, 1999.
- SCHETINGER, M. R. C. et al. **NTPDase an 5'-nucleotidase activities in physiological and disease conditions: new perpectives for human health.** Biof. 3. 2: 77-98. 2007.
- SCHWEITZER, E. **Coordinated release of ATP and ACh from cholinergic synaptosomes and its inhibition by calmodulin antagonists.** J Neurosc 7:2948–2956. 1987.
- SELKOWITZ, D. M. **High frequency electrical stimulation in muscle strengthening.** Am J Sports Med. 1989; 17: 103–111.
- SILINSKY, E. M., et al. **Quantal ATP release from motor nerve endings and its role in neurally mediated depression.** Prog Brain Res 120:145–158. 1999.
- SILINSKY, E. M. **On the association between transmitter secretion and the release of adenine nucleotides from mammalian motor nerve terminals.** J Physiol. 247: 145–162. 1975.
- SILINSKY, E. M.; HUBBARD, J. I. **Release of ATP from rat motor nerve terminals.** Nat Lond. 243: 404-405. 1973.
- SOO, C. L.; CURRIER, D. P.; THRELKELD, A. J. **Augmenting voluntary torque of healthy muscle by optimization of electrical stimulation.** Phys Ther 68 333-337, 1988
- SOREQ, H.; SEIDMAN, S. **Acetylcholine-news roles for an old actor.** Nat Rev. Neur. 2, 294-302. 2001.

SOUTHORN, P. A.; POWIS, G. **Free radicals in medicine II. Involvement in human disease Mayo.** Clin Proc. 63: 390-408. 1988.

SOUZA, S.F. **Estimulação elétrica neuromuscular em cães submetidos a imobilização rígida temporária da articulação femoro-tibio-patelar.** Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Santa Maria. 2006.

THOMSON, F.K.; BOWEN, J.M. **Eletrodiagnostic testing: mapping and clinical use of motor points in the dog.** Jof the Amer Veter Med Assoc.159. 12: 1763-1771, 1971.

TRAMS, G. E. **On the evolution of neurochemical transmission. Models and hypothesis.** Heidelb: Spring Verlag. 1-9. 1981.

TU, J. et al. **cAMP/protein kinase A activates cystic fibrosis transmembrane conductance regulator for ATP release from rat skeletal muscle during low pH or contractions.** PLoS One 7:50157. 2012.

ZANINI, D. et al.  **$\delta$ -Aminolevulinatase activity in lung cancer patients and its relationship with oxidative stress.** Biomed Pharmacother. 68. 5: 603-609. 2014.

ZIMMERMANN, H. et al. **Ectonucleotidases: some recent developments and a note on nomenclatures.** Drug Dev Res. 52. 1-2: 44-56. 2001.

ZIMMERMANN, H. et al. **Ecto-nucleotidases, molecular properties and functional impact.** An de la R Acad Nac Fram. 73. 2: 537-566. 2007.

WARD, A.R.; SHKURATOVA, N. **Russian electrical stimulation:the early experiments.** Phys ther. 82. 10: 1019-1030, 2002.



WILLMANN, R.; FUHRER, C. **Neuromuscular synaptogenesis: clustering of acetylcholine receptors revisited.** Cell. Mol. Life. Sci. 59. 8: 1296-1316, 2002.

WULLEMS, A. J. et al. **A review of the assessment and prevalence of sedentarism in older adults, its physiology/health impact and non-exercise mobility counter-measures.** Biogerontology. 2016.

YEGUTKIN, G. **Nucleotide and nucleoside-converting ectoenzymes: importante moduladores of purinergic signaling cascade.** Biochim Bioph Act. 1783. 5: 673-694. 2008.

**ANEXO**

## ANEXO A – Carta de Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo seres humanos - UFSM

 <p>MINISTÉRIO DA SAÚDE Conselho Nacional de Saúde Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP)</p>	<p>UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa Comitê de Ética em Pesquisa - CEP- UFSM REGISTRO CONEP: 243</p> 
--	---

### CARTA DE APROVAÇÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa – UFSM, reconhecido pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – (CONEP/MS) analisou o protocolo de pesquisa:

**Título:** Análise do estresse oxidativo no após a aplicação da corrente russa na redução da fadiga muscular

**Número do processo:** 23081.009561/2010-05

**CAAE (Certificado de Apresentação para Apreciação Ética):** 0123.0.243.000-10

**Pesquisador Responsável:** Maria Rosa Chitolina Schetinger

Este projeto foi APROVADO em seus aspectos éticos e metodológicos de acordo com as Diretrizes estabelecidas na Resolução 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde. Toda e qualquer alteração do Projeto, assim como os eventos adversos graves, deverão ser comunicados imediatamente a este Comitê. O pesquisador deve apresentar ao CEP:

**Janeiro/ 2011- Relatório parcial**

**Janeiro/ 2012- Relatório final**

Os membros do CEP-UFSM não participaram do processo de avaliação dos projetos onde constam como pesquisadores.

**DATA DA REUNIÃO DE APROVAÇÃO:** 01/09/2010

Santa Maria, 01 de Setembro de 2010.



Félix A. Antunes Soares  
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa-UFSM  
Registro CONEP N. 243.