

Estudo Morfométrico de Fibras Nervosas Regeneradas após Esmagamento do Nervo Isquiático e Estimulação Elétrica Muscular

Autores

Renata Stempniewski Duarte Passos

Orientador

Rosana Macher Teodori

Apoio Financeiro

Pibic

1. Introdução

Nervos periféricos sofrem traumas freqüentes levando à diminuição ou perda da sensibilidade e motricidade no território inervado (VAN MEETEREN et al., 1997).

A axoniotmese é um tipo de lesão nervosa comum, caracterizada pela perda de continuidade dos axônios, com preservação de suas bainhas conjuntivas (ROBINSON, 2000), havendo degeneração Walleriana e regeneração axonal, tratando-se, portanto, de lesão reversível, onde a recuperação funcional é esperada (BURNETT; ZAGER, 2004).

A reinervação inicia-se duas semanas após axoniotmese (CARMIGNOTO et al., 1983); entre 14 e 25 dias da lesão, os estímulos podem ser liberados aos músculos denervados (re-inervados) e o crescimento dos neuritos em direção à terminação motora é inibido tão logo os axônios refaçam a conexão sináptica (GORIO et al., 1983).

A eletroestimulação (EE) é um recurso terapêutico bastante utilizado na prática clínica para facilitar a recuperação funcional após denervação, por seu efeito benéfico ao tecido muscular, retardando o processo de atrofia e desacelerando a rápida proliferação conjuntiva (FERNANDES et al., 2005).

Entretanto, após compressão nervosa, o diâmetro dos axônios e a espessura das bainhas de mielina normalmente não recuperam valores normais (ANSSELIN; FINK, DAVEY, 1997; SANTO NETO et al., 2004), o que pode influenciar a recuperação funcional.

O papel da atividade neuromuscular para a regeneração de nervos ainda é controverso, havendo necessidade de estudos que comprovem sua influência nesse processo.

A literatura aponta resultados da EE crônica no nervo proximal à lesão (BRUSHART et al., 2002), não havendo citação sobre as possíveis influências sobre a regeneração nervosa quando se aplica a EE fásica de baixa frequência no músculo denervado, como ocorre rotineiramente na clínica.

Este estudo investigou se a EE fásica pode influenciar as características morfométricas do nervo regenerado em ratos, independentemente de ser benéfica para o músculo, podendo os resultados subsidiar discussões para reorientação da prática clínica.

2. Objetivos

Investigar possíveis alterações no diâmetro dos axônios e espessura das bainhas de mielina de fibras nervosas regeneradas após esmagamento do nervo isquiático em ratos e subsequente eletroestimulação muscular.

3. Desenvolvimento

Utilizou-se 18 ratos Wistar divididos em 3 grupos (n=6):

Grupo I: Denervado e eletroestimulado (DEE): os animais foram anestesiados com uma mistura de Ketalar® (50mg/ml) e Rompun® (2g/100ml), na proporção de 1:1, em dose de 0,3 ml/100 g de peso corporal. Após tricotomia e assepsia, o nervo isquiático esquerdo foi exposto por uma incisão de 15 mm na região glútea e esmagado com uma pinça hemostática curva Erwin Guth^o de 12cm adaptada (4 pinçamentos de 20 segundos e intervalo de 1 segundo) (FERNANDES et al., 2005). A EE muscular iniciou 24 horas após a denervação (20 dias, respeitando os finais de semana; 30 minutos/dia). Após anestesia (conforme citado para denervação, em dose de 0,15mL/100 g de peso corporal), dois eletrodos auto-adesivos com 1 cm² de área foram posicionados: um na região inguinal e outro sobre o músculo gastrocnêmio. A corrente elétrica foi gerada pelo equipamento DUALPEX 961 – QUARK® com os seguintes parâmetros: frequência=10 Hz, largura de pulso=3 ms, intensidade=5 mA, padronizada a partir da visualização de contração vigorosa do músculo, sendo acrescida de 1 mA a cada 5 minutos para evitar acomodação.

Grupo II: Denervado (D): os animais foram submetidos aos mesmos procedimentos do Grupo I, com exceção do protocolo de EE.

Grupo III: Controle (CON): os animais não sofreram qualquer intervenção, permanecendo nas mesmas condições dos demais, em gaiolas individuais de polietileno, submetidos a ciclo claro/escuro de 12 horas e com ração e água *ad libitum* durante 21 dias.

Em seguida, os ratos foram novamente anestesiados, o nervo isquiático esquerdo foi exposto e fixado *in situ* a 4°C durante 10 minutos, com fixador Karnovsky (1965) modificado. A porção distal do nervo de todos os animais foi retirada e mantida em solução fixadora (Karnovsky) por 24 horas, pós-fixada em tetróxido de ósmio a 1% em tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH 7.3, por duas horas, imersa em uranila 5% durante 24 horas, desidratada em soluções crescentes (30 a 100%) de acetona e incluída em resina Araldite (UEGAMA).

A seguir, foram obtidos cortes transversais de 1¼m com navalha de vidro em ultramicrótomo LKB e corados com azul de toluidina a 1%, em solução aquosa de bórax 1%, para microscopia óptica.

Após a coleta do nervo, todos os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical.

Para análise morfométrica utilizou-se um sistema analisador de imagens *Image-Pro Plus 4.0 - Media Cybernetics*®, calibrado com auxílio de uma lâmina de calibração micrometrada ZEISS 5_{+100/100} mm, para a obtenção de medidas em micrômetros (¼m). A lâmina histológica era focalizada em objetiva de 10X e 100X

e a imagem era captada pelo sistema. A amostra se constituiu de 5 campos aleatoriamente definidos.

As medidas foram realizadas de forma semi-automática, os valores obtidos (em micrômetros) do diâmetro do axônio e diâmetro da fibra eram transferidos para o *Excel*, constituindo uma lista de dados.

Utilizou-se um fator de correção para calibração do *software* analisador de imagens, aplicado a cada valor obtido para o número de axônios.

O número total de axônios em cada nervo foi calculado a partir da somatória do número obtido nos 5 campos, em objetiva de 100X, sendo estabelecida uma proporção desse valor com a área total do nervo, obtida em objetiva de 10X.

O diâmetro médio dos axônios e das fibras de cada animal foi obtido a partir da somatória dos diâmetros dos axônios e diâmetros das fibras, respectivamente, dividido pelo número de axônios e fibras mensurados. Os valores de espessura das bainhas de mielina foram obtidos subtraindo-se o diâmetro do axônio do diâmetro da fibra e, em seguida, dividindo-se por dois. Para a espessura média das bainhas de mielina foi feita a somatória das espessuras das bainhas de mielina pelo número de fibras nervosas analisadas. O valor da razão G foi calculado a partir da divisão do diâmetro do axônio pelo diâmetro da fibra nervosa.

Para verificar as pressuposições do teste paramétrico, utilizou-se os testes de *Shapiro-Wilk* para a normalidade dos dados e de *Levene*, para homogeneidade entre as variâncias. Para todas as variáveis aplicou-se a análise de variância ANOVA (teste F. de Fisher), não identificando diferença estatística entre os grupos em relação ao número de axônios e razão G. Quando houve significância estatística, utilizou-se o teste de Tukey, para as demais variáveis: diâmetro do axônio, diâmetro da fibra e espessura da mielina.

4. Resultados

A análise qualitativa mostra diferenças entre o nervo isquiático normal e regenerado após 20 dias do esmagamento (Figura 1).

Não houve diferença significativa entre os grupos em relação ao número de axônios regenerados. Resultado semelhante foi encontrado por Toft, Fugleholm e Schmalbruch (1988), no qual os axônios distais em regeneração tornaram-se de 2 a 3 vezes mais numerosos em relação aos axônios do coto proximal, 2 a 4 semanas após axoniotmese. Isto reforça o fato de que cada axônio proximal dá origem a vários brotos, que seguem em direção ao órgão alvo (BURNETT; ZAGER, 2004), até restabelecer contato, quando então inicia a repressão sináptica (GORIO et al., 1983, SANES; LICHTMAN, 1999).

Dados do número de axônios regenerados nos dois grupos denervados também apontam que a eletroestimulação aplicada não inibiu o brotamento axonal (Tabela 1).

Em relação à maturação dos axônios regenerados, esta foi significativamente diferente entre os grupos denervados, sendo que ambos apresentaram valores menores que o grupo controle (Tabela 1). Diversos estudos mostraram que fibras nervosas mielínicas, na fase aguda da regeneração, apresentaram diâmetro menor no segmento distal à lesão quando comparado com nervo normal (BRIDGE et al., 1994; MLIGILICHE, 2003).

Parece haver consenso de que a diminuição do calibre do axônio no nervo regenerado é acompanhada da

diminuição da espessura da bainha de mielina. Fraher e Dockery (1998) citam que o axônio controla continuamente a espessura da bainha de mielina durante o desenvolvimento, sendo que um axônio de determinado calibre tende a ser envolvido por uma bainha de mielina com espessura específica.

O que se evidenciou neste estudo é que a aplicação da EE durante a fase aguda de regeneração nervosa atrasou a maturação axonal. Isso provavelmente seja conseqüente a uma alteração na expressão da NCAM (molécula de adesão celular neural), expressada pela fibra muscular em condição de denervação e relacionada à sinalização e favorecimento da reinervação, tornando as fibras musculares mais receptivas à reinervação (LIEBER, 2002). Uma das hipóteses para explicar o efeito inibitório sobre a maturação dos axônios regenerados neste estudo é que a eletroestimulação possa ter inibido a expressão de NCAM no músculo denervado.

Outro aspecto relevante é a relação existente entre a capacidade da unidade motora em gerar tensão e o tamanho dos axônios. Baseados no “princípio do tamanho”, estudos demonstraram que unidades motoras que geraram força de tensão menor, apresentavam axônios com potencial de ação e tamanho menores, enquanto que em axônios de tamanho maior as unidades motoras desenvolveram força de tensão maior (LIEBER, 2002). Assim, o menor calibre das fibras nervosas regeneradas em animais denervados e eletroestimulados poderia contribuir para a limitação da funcionalidade do músculo reinervado, argumentando contra a utilização deste recurso terapêutico como facilitador do processo de regeneração nervosa e recuperação funcional, apesar dos benefícios já comprovados da eletroestimulação muscular utilizando os mesmos parâmetros deste estudo (FERNANDES et al., 2005) em retardar a atrofia muscular e proliferação conjuntiva, o que poderia favorecer a recuperação funcional após regeneração nervosa.

A razão G é um parâmetro relacionado com a velocidade de condução do impulso nervoso. A maioria dos axônios mielínicos deve apresentar razão G entre 0,6-0,7. Valores acima de 0,7 indicam bainha de mielina fina, enquanto aqueles abaixo de 0,6 indicam bainha de mielina espessa (ANSSELIN; FINK; DAVEY, 1997). Neste estudo, todos os grupos apresentaram valor de 0,6 (Tabela 1), sugerindo que o protocolo de EE aplicado não interferiu na velocidade de condução do nervo regenerado, apesar de não ter sido realizada análise eletrofisiológica.

O protocolo de EE, nos parâmetros utilizados neste estudo, não inibiu a regeneração axonal, entretanto, houve atraso na maturação dos axônios regenerados. Novos estudos devem ser desenvolvidos para investigação de diferentes parâmetros de EE e seus possíveis efeitos na qualidade da regeneração nervosa.

5. Considerações Finais

O protocolo de eletroestimulação utilizado neste estudo não inibiu a regeneração axonal. Entretanto, atrasou a maturação dos axônios regenerados.

Referências Bibliográficas

ANSSELIN, A. D.; FINK, T.; DAVEY, D.F. Peripheral nerve regeneration through nerve guides seeded with Schwann cells. **Neurophatol Appl Neurobiol**, v. 23, p. 387-398, 1997.

BURNETT, M. G.; ZAGER, E. L. Pathophysiology of peripheral nerve injury: a brief review. **Neurosurg Focus**, v. 16, n. 5, Article1, 2004.

- BRIDGE, P. M.; BALL, D.J.; MACKINNON, S.E.; NAKAO, Y.; BRANDT, K.; HUNTER, D.A.; HERTL, C. Nerve crush injuries - A model for axonotmesis. **Exp Neurol**, v. 127, p. 284-290, 1994.
- BRUSHART, T.M.; HOFFMAN, P. N. ; ROYALL, R. M.; MURINSON, B. B.; WITZEL, C.; GORDON, T. Electrical stimulation promotes motoneuron regeneration without increasing it's speed or conditioning the neuron. **J Neurosci**, v. 22, n. 15, p. 6631-6638, 2002.
- CARMIGNOTO, G.; FINESSO, M.; SILIPRANDI, R.; GORIO, A. Muscle reinnervation – I. Restoration of transmitter release mechanisms. **Neurosci**, v. 8, p. 393-401, 1983.
- FERNANDES, K.C.B.G.; POLACOW, M.L.O.; GUIRRO, R.R.J.; CAMPOS, G.E.R.; SOMAZZ, M.C.; PINTO, V.F.; FUENTES, C.B.; TEODORI, R.M. Análise morfológica dos tecidos muscular e conjuntivo após denervação e estimulação elétrica de baixa frequência. **Rev Bras Fisiot**, São Carlos - SP, v. 9, n. 2, p. 235-241, 2005.
- FRAHER, J.; DOCKERY, P. A strong myelin thickness-axon size correlation emerges in developing nerves despite independent growth of both parameters. **J Anat**, v. 193, n. 2, p. 195-201, 1998.
- GORIO, A.; CARMIGNOTO, G.; FINESSO, M.; POLATO, P.; NUNZI, M.G. Muscle reinnervation-II. Sprouting, synapse formation and repression. **Neurosci**, v. 8, n. 3, p. 403-416, 1983.
- KARNOVSKY, M.J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. **J Cell Biol**, v. 27, p. 137a, 1965.
- LIEBER, R. L. **Skeletal muscle structure, function & plasticity: The physiological basis of rehabilitation** . 2nd Ed. Williams & Wilkins, Baltimore-USA, 2002.
- MLIGILICHE, L. N ; TABATA, Y.; KITADA, M.; ENDOH, K.; OKAMATO, K.;FUJIMOTO, E.; IDE, C. Poly lactic acid-caprolactone copolymer tube with a denatured skeletal muscle segment inside as a guide for peripheral nerve regeneration: A morphological and electrophysiological evaluation of regenerated nerves. **Anat Sci International**, v. 78, p. 156-161, 2003.
- ROBINSON, L. R. Traumatic injury to peripheral nerves. **Muscle & Nerve**, v. 23, p. 863-868, 2000.
- SANES, JR ; LICHTMAN, JW. Development of the vertebrate neuromuscular junction. **Annu Rev Neurosci**, v. 22, p. 389-442, 1999.
- SANTO NETO, H et al. Primary nerve repair by muscle autografts prepared with local anesthetic. **Microsurgery**, v.24, n. 3, p. 188-193, 2004.
- TOFT, P.B.; FUGLEHOLM, K.; SCHMALBRUCH, H. Axonal branching following crush lesion of peripheral nerves of rat. **Muscle Nerve**, v. 11, p. 880-889, 1988.
- VAN MEETEREN, N.L.U.; BRAKKEE, J.H.; HAMERS, F.P.T.; HELDERS, P.J.M.; GISPEN, W.H. Exercise training improves functional recovery and motor nerve conduction velocity alter sciatic nerve crush lesion in the rat. **Arch Phys Med Rehabil**, v. 78, p. 70-77, 1997.

Anexos

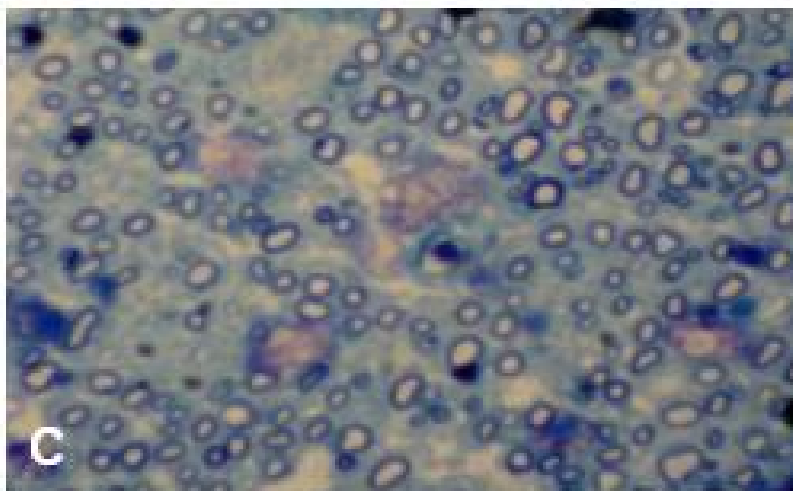
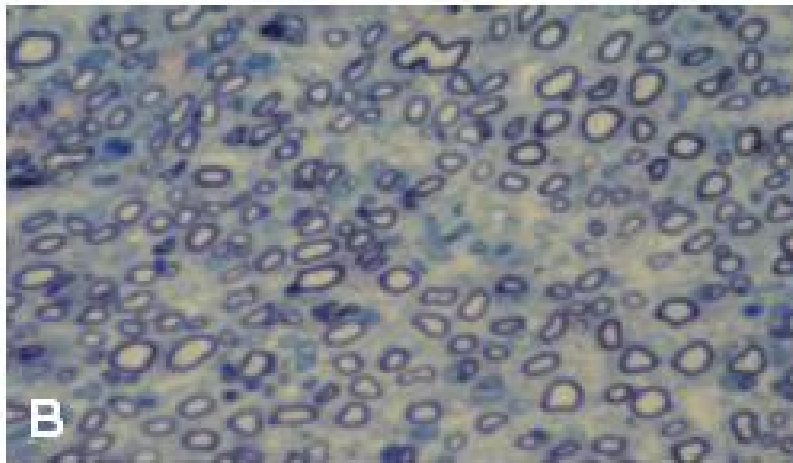
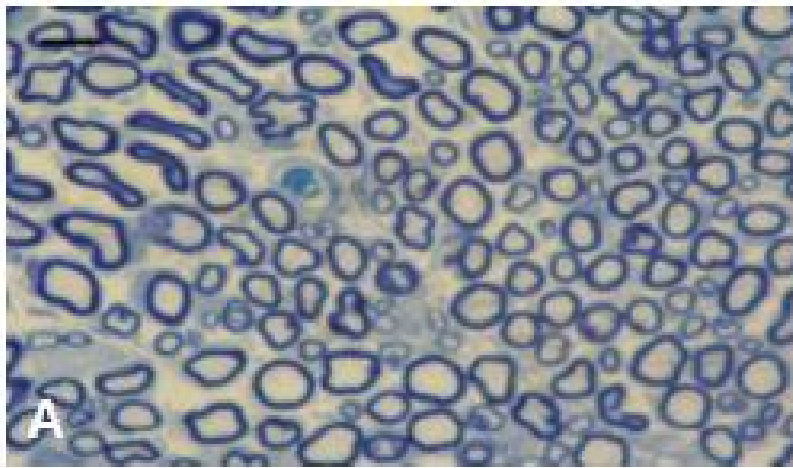


Figura 1: Fotomicrografia de corte transversal do nervo isquiático dos grupos: controle (A), denervado (B), denervado e eletroestimulado (C). Observar axônios com calibres variados e diferentes espessuras de bainha de mielina nos 3 grupos. Bar= 20 µm.

Tabela 1: Valores médios \pm DP do número de axônios e variáveis morfométricas no nervo isquiático de animais dos grupos: Controle (**CON**); Denervado (**D**); Denervado e Eletroestimulado (**DEE**); (*) Difere do CON; (#) Difere do D ($p < 0,05$).

	CON	D	DEE
N° axônios	7867,86 \pm 1782,33	10218 \pm 1948,77	10831,08 \pm 2361,67
Ø axônios	6,36 \pm 0,39 μ m	5,01 \pm 0,57 μ m [*]	4,23 \pm 0,39 μ m ^{* #}
Ø fibras	10,14 \pm 0,37 μ m	8,32 \pm 1,2 μ m [*]	6,55 \pm 0,7 μ m ^{* #}
Esp. mielina	1,89 \pm 0,14 μ m	1,65 \pm 0,36 μ m [*]	1,15 \pm 0,17 μ m ^{* #}
Razão G	0,62 \pm 0,02	0,6 \pm 0,03	0,64 \pm 0,01