

ANÁLISE DA MASSA MUSCULAR E EXPRESSÃO GÊNICA DA ATROGINA-1 EM MÚSCULO DE RATO DESNERVADO E ELETROESTIMULADO

Autores

Silvana Coca Lima
Viviane Balisardo Minamoto
Sabrina Paviani Messa
Eliane Silva

Orientador

Viviane Balisardo Minamoto

1. Introdução

Quando um músculo perde sua inervação por lesão do nervo periférico, ele deixa de receber os sinais para contração, necessários para manutenção de suas funções normais. A resposta do músculo à desnervação compreende degeneração das fibras musculares, alteração no balanço entre síntese e degradação protéica, resultando em atrofia, diminuição da área de secção transversa da fibra muscular (EBERSTEIN e EBERSTEIN, 1996), proliferação do tecido conjuntivo intramuscular (SALONEN et al., 1985), assim como diminuição ou perda da capacidade de gerar força (DOW et al., 2006).

A condição de desnervação também implica em alterações na expressão de genes musculo-específicos como a atrogina-1, uma ubiquitina-ligase que atua na via de degradação ubiquitina-proteossomo (BODINE et al., 2001), com importante função na degradação de proteínas, influenciando no balanço entre síntese e degradação protéica muscular (LECKER et al., 1999).

Diversos recursos podem ser aplicados como forma de tratamento muscular após desnervação, no intuito de manter as características normais do músculo ou minimizar as alterações decorrentes da perda do contato neuromuscular. Estudos experimentais foram realizados para analisar os efeitos da estimulação elétrica no músculo desnervado, porém a maioria deles utiliza-se da estimulação elétrica crônica, com eletrodos implantados por longos períodos. Sabe-se que este tipo de estimulação previne a atrofia (EBERSTEIN e

EBERSTEIN, 1996), minimiza a perda de força muscular (GUNDERSEN, 1988; DOW, 2004) e diminui a proliferação de tecido conjuntivo no músculo (KANAYA e TAJIMA, 1992).

A estimulação elétrica fásica, usualmente aplicada pelos fisioterapeutas para tratamento de pacientes com lesão nervosa periférica, diferencia-se da crônica por utilizar eletrodos de superfície sobre a pele e pela aplicação por períodos curtos. Há poucos experimentos utilizando protocolos de estimulação elétrica fásica, que se assemelhem aos aplicados na clínica, e seu efeito em músculos desnervados, assim como sua ação no mecanismo molecular da célula, não está bem elucidado.

2. Objetivos

Analisar a influência de 2 protocolos de estimulação elétrica fásica de baixa frequência na massa muscular e expressão gênica da atrogina-1 em músculo de rato previamente desnervado.

3. Desenvolvimento

Foram utilizados 20 ratos *Wistar* (180 ± 20 g), mantidos no biotério central da Universidade Metodista de Piracicaba – UNIMEP, em condições controladas de biotério. O estudo foi aprovado pelo comitê de ética animal da Universidade Federal de São Carlos, parecer nº 008-06. Os animais foram divididos aleatoriamente em 4 grupos (n=5): desnervado (D), desnervado e eletroestimulado diariamente (EED), desnervado e eletroestimulado alternadamente (EEA: segundas, quartas e sextas-feiras) e controle (C). Para os procedimentos de desnervação, estimulação elétrica e coleta dos músculos, os animais foram anestesiados com injeção intramuscular de cloridrato de ketamina (50mg/ml) e cloridrato de tiazina (2g/100ml), na proporção de 1:1, em dose de 0,1 ml/100g de peso corporal. Todos os animais foram sacrificados após 10 dias do protocolo de desnervação.

Para procedimento de desnervação os animais, previamente tricotomizados na região glútea esquerda, foram submetidos a incisão nesta região para visualização e exposição do nervo isquiático. Este foi esmagado com pinça hemostática adaptada, utilizando-se quatro pinçamentos de 20 segundos cada, com intervalos de 1 segundo (FERNANDES, 2005). Os animais foram mantidos em gaiolas individuais até total cicatrização da incisão.

Os protocolos de estimulação elétrica aplicado nos animais dos grupos EED e EEA tiveram início 24 horas após a desnervação. A corrente elétrica foi gerada pelo equipamento DUALPEX 961 – QUARK com os seguintes parâmetros: forma de pulso quadrática bifásica simétrica, 3 ms de largura de pulso, frequência de 10 Hz e intensidade inicial de 5 mA, sendo acrescida de 1 mA a cada 5 minutos para evitar acomodação da contração muscular. Cada sessão de estimulação elétrica teve duração de 30 minutos. Foram utilizados 2 eletrodos percutâneos auto-adesivos, com 1 cm² de área, posicionados um na região inguinal e outro sobre o músculo gastrocnêmio, regiões previamente tricotomizadas. Não houve estimulação elétrica aos sábados e domingos em nenhum grupo.

No dia da coleta, os animais previamente anestesiados tiveram o músculo gastrocnêmio esquerdo retirado, pesado e a porção distal da cabeça medial do músculo foi armazenada em microtubo, congelada em nitrogênio líquido e posteriormente mantida em freezer (-80°C). Após a coleta, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical.

A expressão de PNA total de cada animal foi obtida utilizando-se o reagente Trizol (Gibco). A densidade óptica das amostras foi determinada por espectrofotometria, no comprimento de onda de 260nm. Para avaliar a expressão de PNA isolado foi determinada a razão entre as absorções a 260 e 280 nm (razão ≥ 1.8). Amostras com razão ≥ 1.8 foram utilizadas para determinar a expressão de PNA (25µg de

A desnervação provocou aumento na expressão da atrogina-1 em todos os grupos, quando comparado ao grupo C (D: 81-vezes; EED: 68-vezes; EEA: 97-vezes, respectivamente, $p < 0,05$). Além disso, a estimulação elétrica aplicada diariamente reduziu o acúmulo da atrogina-1 em 16% quando comparado ao D e 30% quando comparado ao EEA (Figura 1).

DISCUSSÃO

A desnervação é um modelo de desuso bastante utilizado para melhor entender os efeitos que a falta de atividade elétrica acarretam no funcionamento do músculo esquelético. Embora o tipo de desnervação mais utilizado experimentalmente seja a neurotmesa, a axoniotmesa, utilizada neste estudo, também causa degeneração total desde o local da lesão até a parte distal do nervo, e permite entender as conseqüências de lesões decorrentes de esmagamento e estiramento nervoso.

No presente estudo, a massa muscular diminuiu em torno de 47% nos grupos desnervados e desnervados + eletroestimulados, quando comparado ao controle. No entanto, os grupos desnervados e submetidos a estimulação elétrica não apresentaram diferença em relação ao grupo somente desnervado. Este resultado foi semelhante ao encontrados por Polacow et al. (2003), que aplicaram estimulação elétrica no músculo sóleo desnervado de ratos e não encontraram diferença entre os grupos desnervado, tratado ou não, apenas diminuição de 49% quando comparado ao controle. Zhang et al. (2005), analisaram o músculo gastrocnêmio de ratos pós neurotmesa do nervo isquiático em vários períodos e verificaram redução de 50, 65 e 80% da massa muscular após 14, 28 e 56 dias, respectivamente, quando comparado com o controle.

Em relação à atrogina-1, proteína atuante no processo de degradação protéica, ela não é observada em músculos normais, e sua presença caracteriza quadro de atrofia independente da causa (LECKER, et al., 1999). Bodine et al. (2001), identificaram aumento da expressão da atrogina-1 após 3 dias em músculos submetidos a três diferentes modelos de desuso: desnervação, imobilização ou ausência de carga muscular. Além disso, realizaram experimento com animais mutantes, ausentes de atrogina-1, e observaram que esses animais, mesmo quando desnervados, não apresentavam atrofia muscular, o que comprovou o importante papel dessa proteína no processo da atrofia.

No presente estudo, constatou-se que a expressão de mRNA da atrogina-1 no grupo EED foi 16% menor que no grupo D e 30% menor que no grupo EEA, mostrando que o tratamento diário foi efetivo em reduzir os níveis de atrogina-1, sugerindo minimização da degradação protéica pela via ubiquitina-proteossomo. Além disso, a não diferença entre os grupos D e EEA, sugere que a aplicação da estimulação elétrica em dias alternados não tem influência na redução dos níveis de atrogina-1 pós-desnervação. Apesar da redução da expressão da atrogina-1 no grupo EED sugerir menor atrofia, não foi observada diferença na massa muscular relativa nesse grupo quando comparado aos demais grupos desnervados. Uma possível hipótese para este resultado é que o período de 10 dias é suficiente para se observar alterações na transcrição de gene responsável pela atrofia muscular, mas não na massa muscular.

5. Considerações Finais

O menor nível da expressão da atrogina-1, observado no grupo que recebeu estimulação elétrica diariamente, sugere que o protocolo de estimulação elétrica diária é mais efetivo para diminuir a degradação protéica muscular pós-desnervação. Novos estudos são necessários para identificar melhor parâmetro da corrente elétrica e/ou frequência de tratamento.

Referências Bibliográficas

BODINE, S. C. et al. Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. **Science**, v. 294, p. 1704-1708, 2001.

DOW, D. E. et al. Number of contractions to maintain mass and force of a denervated rat muscle. **Muscle Nerve**, v.30, n.1, p.77-86, 2004.

DOW, D. E. et al. Electrical stimulation of denervated muscles of rats maintains mass and force, but not recovery following grafting. **Restor Neurol Neurosci**, v.24, n.1, p.41-54, 2006.

EBERSTEIN, A.; EBERSTEIN, S. Electrical stimulation of denervated muscle: is it worthwhile? **Med Sci Sports Exerc**, v.28, n.12, p.1463-1469, 1996.

FERNANDES, K. C. B. G. et al. Análise morfométrica dos tecidos muscular e conjuntivo após desnervação e estimulação elétrica de baixa frequência. **Rev Bras Fisiot**, v. 9, n. 2, p. 235-41, 2005.

GUDERSEN, K. Determination of muscle contractile properties: the importance of the nerve. **Acta Physiol Scand**, v. 162, p. 333-341, 1998.

Guide for the use of laboratory animals. **National Research Council, Washington, DC** 1996.

KANAYA, F; TAJIMA, T. Effect of electrostimulation on denervated muscle. **Clin Orthop Relat Res** n.283, p. 296-301, 1992.

LECKER, S. H. et al. Multiple types of skeletal muscle atrophy involve a common program of changes in gene expression. **Faseb J** 2004; 18:39-51.

LIEBER, R.L. **Skeletal muscle structure and function: Implications for rehabilitation and sports medicine**. Williams & Wilkins, Baltimore, 2002.

POLACOW, M. L. O. et al. Estudo morfométrico do músculo sóleo denervado de ratos tratados pela associação de metformina e estimulação elétrica. **Rev Bras Fisiot**, v. 7, n. 1, p. 77-84, 2003.

Anexos

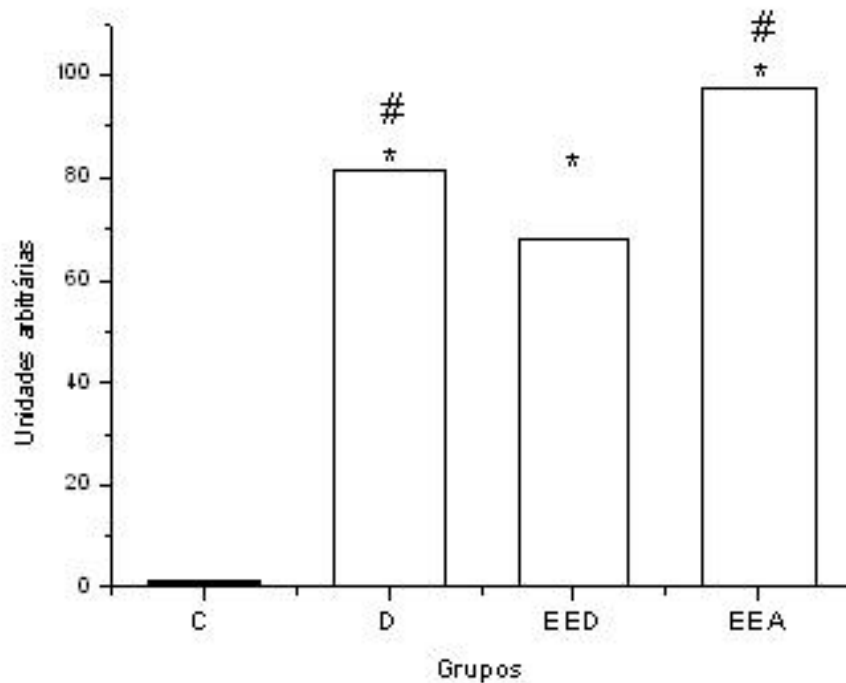


Figura 1: Expressão de mRNA da atrogina-1 no músculo gastrocnêmio de ratos dos grupos controle (C), desnervado (D), desnervado e eletroestimulado diariamente (EED) e desnervado e eletroestimulado alternadamente (EEA). * quando comparado ao C ($p < 0,05$); # quando comparado ao EED ($p < 0,05$).

Tabela 1: Massa muscular relativa (MMR) do músculo gastrocnêmio de ratos dos grupos controle (C), desnervado (D), desnervado e eletroestimulado diariamente (EED) e desnervado e eletroestimulado alternadamente (EEA).

Grupos	MMR (%)
C	0,287±0,030
D	0,159±0,012 *
EED	0,152±0,023*
EEA	0,146±0,013*

* quando comparado ao controle; $p < 0,05$