

Influência da estimulação elétrica de baixa frequência sobre a reinervação muscular

Autores

Rosana Macher Teodori
Rinaldo Roberto de Jesus Guirro
Viviane Balisardo Minamoto

Apoio Financeiro

Fap

1. Introdução

Está bem estabelecida na literatura a sequência temporal de regeneração após esmagamento nervoso em ratos. Estudos de Gorio et al. (1980) e Carmignoto et al. (1983) mostram que 10 dias após a lesão nenhum axônio é evidenciado no músculo e que o processo de reinervação muscular inicia-se duas semanas após o esmagamento, sendo o crescimento axonal ao longo do tronco nervoso de 4 mm/dia.

A eliminação dos contatos sinápticos excessivos inicia nesse momento e, por volta do 60º dia, as fibras musculares estão monoinervadas. As terminações nervosas remanescentes aumentam seu tamanho e, após 90 dias, ocupam quase completamente a fenda pós sináptica.

A eletroestimulação (EE) muscular é um dos recursos utilizados pela Fisioterapia para facilitar a recuperação funcional, uma vez que retarda a atrofia e proliferação conjuntiva (GREATHOUSE, 1985). Resultados semelhantes têm sido observados em nosso laboratório (FERNANDES et al., 2005).

A literatura relata os efeitos da EE crônica de baixa frequência na transição dos tipos de fibras musculares, através de mudanças nas isoformas das cadeias pesadas de miosina, minimizando a transição de lenta para rápida nas fibras do músculo sóleo de ratos (PETTE; STARON, 2001). A EE fásica de baixa frequência apresentou o mesmo efeito em músculo sóleo denervado de ratos (FERNANDES et al., 2005). Entretanto, o papel da atividade neuromuscular para o brotamento axonal e reinervação muscular é ainda controverso, não havendo relatos na literatura sobre a influência da EE fásica de baixa frequência.

Gordon; Sulaiman e Boyd (2003) estudaram o efeito da EE (20 Hz) sobre o tempo de regeneração axonal após secção do nervo femoral e neurorafia em ratos, seguida de EE muscular crônica (24 horas/dia, 2 semanas). Evidência de reinervação foi observada apenas após 8 semanas. Decidiram então estimular o coto proximal do nervo femoral por 2 semanas e observaram uma aceleração da regeneração de axônios motores. Por ser um protocolo inviável para a clínica, os autores encurtaram o período de estimulação para 1 hora/dia, observando aceleração no crescimento de axônios.

Lieber (2002) descreveu efeito inibidor da EE muscular crônica sobre a expressão da NCAM (molécula de adesão celular neural), que atua como sinalizador positivo para a reinervação, favorecendo a formação de

sinapses. Em condições de alta atividade muscular (músculo normalmente inervado ou denervado e eletricamente estimulado) a expressão da NCAM é inibida e a sinaptogênese pode estar comprometida.

Tam e Gordon (2003) apontam que o exercício físico inibe o brotamento axonal em músculos parcialmente denervados, considerando que nessa condição a formação de pontes entre os processos de células de Schwann perisinápticas de unidades motoras inervadas e não-inervadas é inibida, reduzindo o número de brotos axonais.

Considerando a inviabilidade do uso da EE crônica na clínica fisioterapêutica devido à necessidade de implantação de eletrodos para eletroestimulação entre 8 e 24 horas/dia e a ausência de estudos que demonstrem o efeito da EE fásica, utilizada na clínica, para o brotamento e maturação de axônios lesados, este estudo se propôs a investigar a influência desta forma de EE sobre a reinervação muscular.

O crescimento dos neuritos em direção à junção neuromuscular (JNM) é inibido tão logo os axônios refaçam a conexão sináptica (GORIO et al., 1983). O tamanho das junções neuromusculares (JNM) em regeneração é recuperado aproximadamente 90 dias após o esmagamento do nervo. O crescimento de neuritos entre as fibras musculares é vigoroso e persiste por vários dias. Progressivamente, mais axônios entram no músculo e estabelecem contato com JNMs reinervadas poucas horas ou dias antes, o que leva a poliinervação das fibras musculares. Dois dias após a chegada de neuritos em regeneração no músculo, a poliinervação já está presente; 15 dias após o esmagamento nervoso, 25% das fibras musculares estão poliinervadas. O aumento do brotamento, crescimento de neuritos e formação de sinapses no período que compreende entre 14 e 25 dias após esmagamento do nervo indica que os impulsos nervosos podem ser liberados aos músculos denervados (re-inervados) (GORIO et al., 1983). Carmignoto et al. (1983) citam que por volta do 25º dia, o potencial de repouso da membrana muscular, a força de contração, a sensibilidade à acetilcolina e os níveis de acetilcolinesterase voltaram ao normal. Os axônios deixam o tronco nervoso, penetram no músculo e crescem entre as fibras. Neuritos em regeneração se ramificam continuamente e imediatamente após reinervação da fibra muscular, liberam neurotransmissores (CARMIGNOTO et al., 1983).

2. Objetivos

Investigar:

a) a distribuição do terminal motor, dos receptores de acetilcolina (AchRs) e das células de Schwann nos diferentes grupos e nos diferentes tempos de tratamento; **b)** se a eletroestimulação altera o padrão morfométrico do músculo sóleo reinervado; **c)** possíveis alterações do perfil fenotípico das fibras do músculo sóleo nos diferentes grupos experimentais.

3. Desenvolvimento

Utilizou-se 50 ratos Wistar pesando entre 180 e 200 g., divididos em 3 grupos: a) **Grupo lesão** (n=15): lesão por esmagamento do nervo isquiático e análise após 10 (n=5), 20 (n=5) e 30 (n=5) dias; b) **Grupo lesão + eletroestimulação** (n=30): lesão por esmagamento do nervo isquiático + EE e análise após 10 (n=10), 20 (n=10) e 30 (n=10) dias; c) **Grupo controle** (n=5): animais sem lesão e sem eletroestimulação.

Os animais foram anestesiados com uma mistura de Ketalar^R (Cloridrato de Ketamina) 50 mg/ml e Rompun^R (Cloridrato de Tiazina) 2 g/100ml, na proporção de 1:1, em dose de 0,3 ml/100 g de peso corporal (i.m.).

Após tricotomia e incisão de 15mm na região glútea esquerda, o nervo isquiático foi exposto e esmagado com pinça hemostática adaptada (4 pinçamentos de 20 segundos e intervalo de 1 segundo) (FERNANDES et al., 2005). Os planos muscular e cutâneo foram suturados e os animais mantidos em gaiolas individuais, em ciclo claro/escuro de 12 horas e livre acesso à ração e água no Biotério da Faculdade de Ciências da Saúde - UNIMEP.

Os animais do grupo Lesão + EE foram novamente anestesiados (dose = 0,15 ml/100g de peso corporal) 24 horas após a lesão nervosa, sendo submetidos a protocolo de EE no músculo sóleo (SO) esquerdo, durante 30 minutos. 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® (pulso quadrático bifásico simétrico) com os parâmetros: frequência=10Hz, largura de pulso=3ms, intensidade=5mA, padronizada a partir da visualização de contração vigorosa do músculo, sendo acrescida de 1 mA a cada 5 minutos para evitar acomodação.

Os animais desse grupo foram subdivididos em: **a) Eletroestimulação diária:** animais eletroestimulados diariamente, com intervalo de 24 horas a cada EE, por um período de 10, 20 e 30 dias; **b) Eletroestimulação intervalada:** animais eletroestimulados às segundas, quartas e sextas-feiras, por um período de 10, 20 e 30 dias.

Para coleta dos músculos, os ratos foram anestesiados (dose de 0,3 ml/100g de peso corporal) e o músculo SO esquerdo retirado, pesado e dividido em três fragmentos, sendo o terço médio utilizado para estudo das JNM e o terço distal para análise histoquímica. Os fragmentos foram congelados em isopentano pré-congelado em nitrogênio líquido, obtendo-se cortes longitudinais de 40 mm para a análise das JNM e de 12mm, para análise histoquímica.

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

Cortes longitudinais do terço médio do músculo foram submetidos à análise imunohistoquímica, sendo os AchRs marcados com rodamina-alfa-bungarotoxina (Rh-BTX 1:100 em PBS; Molecular Probes). A seguir, os cortes foram incubados com os anticorpos primários anti-neurofilamento (1:100 em solução bloqueadora-Sigma) e anti-S100 (1:100 em solução bloqueadora-Sigma), e com os anticorpos secundários anti-rabbit-IgG-FITC (1:100 em solução bloqueadora-Sigma) e anti-mouse-alexa-fluor (1:100 em solução bloqueadora; Molecular Probes) e montados em lâmina sob lamínula em meio de montagem para fluorescência DABCO (Sigma).

As lâminas foram observadas em microscópio de fluorescência NIKON, para quantificação dos AchRs, terminais nervosos e células de Schwann.

Para análise histoquímica, cortes transversais do terço distal do músculo SO foram submetidos à demonstração da atividade enzimática miosina ATPase (m.ATPase), pré-incubada em meio ácido (ac-m.ATPase, pH 4.3; BROOKE; KAISER, 1970) e alcalino (alc-m.ATPase, pH 10.3; descrito por Guth e Samaha, 1970, e modificado por Butler e Cosmos, 1981), o que permite a classificação em fibras do tipo I, II e híbridas. A incidência dos diferentes tipos de fibras musculares será comparada entre os grupos experimentais. Será analisado um corte por lâmina, e deste serão obtidos campos para fotomontagem nos diferentes pHs, realizada através de um sistema de vídeo impressão (microscópio óptico Olympus acoplado à câmera e ao Monitor Samsung), a fim de se determinar o número e a porcentagem de cada um dos tipos

de fibras musculares.

Serão medidas as áreas de secção transversa de cada tipo de fibra muscular, utilizando-se para isso um sistema de análise de imagem (*software* Motic Image Advanced, 3.2). Os campos, obtidos através de um aumento de 20x no microscópio óptico, serão analisados utilizando-se a reação de mATPase, que permite observar os diferentes tipos de fibras musculares encontrados neste sítio muscular.

Os dados serão submetidos à análise de variância, seguido de teste de comparações múltiplas, considerando-se o nível de significância de 5%.

4. Resultados

Por se tratar de projeto com duração de dois anos, iniciado em dezembro de 2005, cujo cronograma previa para o primeiro ano a realização do procedimento cirúrgico, de intervenção por eletroestimulação, coleta e processamento dos músculos para análise histoquímica, imunohistoquímica e morfométrica, apresenta-se aqui os dados qualitativos obtidos até o momento, referentes ao grupo controle, considerando que as demais análises serão desenvolvidas na segunda fase do projeto.

Os terminais nervosos e respectivos AchRs estão ilustrados na figura 1.

A análise histoquímica permitiu identificar os diferentes tipos de fibras no músculo SO, sendo as de tonalidade clara do tipo I, as mais escuras do tipo II e as de tons intermediários são consideradas fibras híbridas (figura 2).

5. Considerações Finais

Os resultados e conclusões serão apresentados após conclusão das análises.

Referências Bibliográficas

BROOKE M.H.; KAISER K.K. Muscle fiber types: how many and what kind? **Arch Neurol**, v. 23, p. 369, 1970.

BUTTLER, J.; COSMOS, E. Enzymic markers to identify muscle-nerve formation during embryogenesis: modified myosin ATPase and silver-cholinesterase histochemical reactions. **Exp Neurol**, v. 73, p. 813-816,

1981.

CARMIGNOTO, G. et al. 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.

GORDON, T.; SULAIMAN, O.; BOYD, G. Experimental strategies to promote functional recovery after peripheral nerve injuries. **J Peripher Nerv Syst**, v. 8, p. 236-250, 2003.

GORIO, A. et al. Motor nerve sprouting induced by ganglioside treatment. Possible implications for gangliosides on neuronal growth. **Brain Res**, v. 197, p. 236-241, 1980.

GORIO, A. et al. Muscle reinnervation-II. Sprouting, synapse formation and repression. **Neurosci**, v. 8 , n.3, p. 403-416, 1983.

GREATHOUSE, D.G. **Effects of short term, medium frequency electrical stimulation on normal, partially denervated and denervated rat skeletal muscle**. University of Kentucky, Lexington, KY, 1985. Dissertation.

GUTH, L.; SAMAHA, F.J. Procedure for the histochemical demonstration of actomyosin ATPase. **Exp Neurol**, v. 28, p. 365-367, 1970.

LIEBER, R.L. **Skeletal muscle structure, function & plasticity: The physiological basis of rehabilitation**. 2nd Ed. Williams & Wilkins, Baltimore-USA, 2002.

TAM, S.L.; GORDON, T. Neuromuscular activity impairs axonal sprouting in partially denervated muscles by inhibiting bridge formation of perisynaptic Schwann cells. **J Neurobiol**, v. 57, p. 221-234, 2003.

Anexos

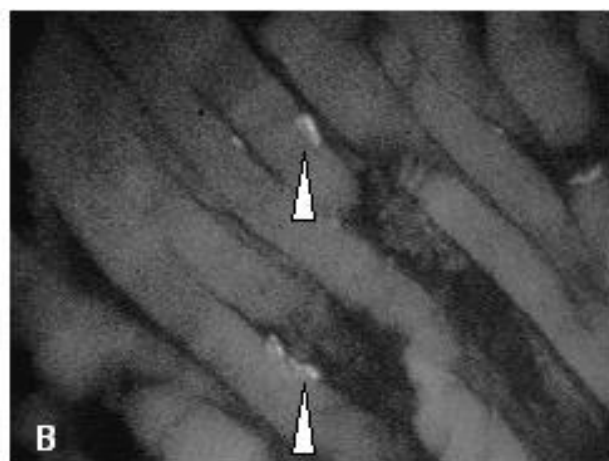


Figura 1: Fotomicrografia do músculo SO (grupo controle) em corte longitudinal. Observar: A - terminal nervoso (cabeças de seta) e B - o respectivo AChR (cabeças de seta).



Figura 2: Fotomicrografia do músculo SO (grupo controle) em corte transversal. Observar diferentes tipos de fibras. Reação ATPase miofibrilar (pH 10.3). Bar= 50 μ m.