

ANÁLISE DA DENSIDADE DE TECIDO CONJUNTIVO APÓS DESNERVAÇÃO E ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA DE BAIXA FREQUÊNCIA

Autores

Quelen Milani Caierao

Orientador

Viviane Balisardo Minamoto

1. Introdução

A lesão nervosa periférica é problema freqüente na clínica, sendo que a reabilitação desempenha papel importante na prevenção da atrofia muscular, manutenção da amplitude de movimento articular, recuperação da função motora e da sensibilidade perdida.

As alterações morfológicas decorrentes da desnervação envolvem diminuição da massa muscular (ZERNICKA et al., 2002) e área de secção transversa das fibras (ASMUSSEN et al., 2003) e aumento do tecido conjuntivo (TC) (PURSLOW, 2002), entre outras. Essas modificações ocorrem imediatamente após a desnervação e persistem enquanto o músculo está desprovido de suprimento nervoso. Caso a reinervação não ocorra em um determinado tempo, o tecido fibroso terá substituído os elementos contráteis do músculo, e a recuperação da função muscular torna-se impossível (CUMMINGS, 1992).

Nas lesões onde o reparo do nervo e o restabelecimento das condições funcionais do músculo são possíveis, a eletroestimulação (EE) é usada com o objetivo de minimizar a atrofia e a proliferação de TC (DECHERCHI et al., 2003). Dessa maneira, autores têm investigado os efeitos da EE crônica de baixa frequência sobre os músculos desnervados, observando alterações musculares morfológicas, histoquímicas e bioquímicas (MARQUESTE et al., 2004). Por outro lado, autores como Lieber (2002) sugerem que a EE não é benéfica para a regeneração nervosa, uma vez que a mesma interfere na reinervação, retardando o retorno funcional do músculo.

Embora exista divergência entre o uso ou não da EE, a maioria dos estudos discutem os efeitos da EE crônica, porém, na prática clínica utiliza-se a EE fásica. Sendo assim, este trabalho justifica-se por analisar o efeito da EE fásica em músculo previamente desnervado, comparando-se 2 protocolos de EE: tratamento diário *versus* alternado.

Com base no exposto, acredita-se que os resultados desse trabalho fornecerão subsídios para proposta de adequado tratamento de EE após desnervação muscular.

2. Objetivos

Avaliar o efeito de 2 protocolos de EE fásica de baixa frequência durante 30 dias no remodelamento de TC do músculo gastrocnêmio medial (GM) de rato previamente desnervado.

3. Desenvolvimento

MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Grupos Experimentais

20 ratos *Wistar* (180 e 250g), divididos em (n=5): controle (C), desnervado (D), desnervado e eletroestimulado diariamente (EDD) e desnervado e eletroestimulado alternadamente (EEA). Os animais foram mantidos em gaiolas, ciclo claro/escuro de 12 horas e livre acesso à ração e água no Biotério dessa instituição. O trabalho foi aprovado pelo comitê de ética, protocolo número 008-06, da universidade Federal de São Carlos.

4.2 Protocolo experimental

Para os procedimentos de lesão do nervo, aplicação de EE e remoção dos músculos, os animais foram anestesiados com injeção intramuscular de Ketalar^R (Cloridrato de Ketamina) 50mg/ml e Rompun^R (Cloridrato de Tiazina) (2g/100ml, na proporção de 1:1, em dose de 0,3 ml/100 g de peso corporal).

A lesão do nervo foi realizada por meio de esmagamento do nervo isquiático, utilizando-se pinça hemostática adaptada, realizando-se 4 pinçamentos com duração de 20 seg. e intervalo de 1 seg. entre cada um (FERNANDES et al., 2003).

A EE, iniciada 24 horas após o esmagamento do nervo isquiático, foi realizada no músculo GM esquerdo,

durante 30 dias, com aplicação diária (EED: segunda à sexta-feira) ou alternada (EEA: segundas quartas e sextas-feiras). A corrente elétrica foi gerada pelo equipamento DUALPEX 961 – QUARK (forma de pulso quadrática bifásica simétrica, 3 ms de largura de pulso, F= 10 Hz e I=5mA, acrescido 1 mA a cada 5 minutos para evitar acomodação do músculo, durante 30 minutos). Foram utilizados 2 eletrodos percutâneos auto-adesivos, posicionados um na região inguinal e outro sobre o músculo G.

Após período de 30 dias de EE, os ratos tiveram o músculo GM esquerdo retirado, pesado e o ventre muscular foi congelado em isopentano resfriado em nitrogênio líquido. Após a coleta, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical. Para a análise muscular foram obtidos cortes transversais de 12µm de espessura, corados com HE.

4.3 Análise da densidade de TC

Um corte histológico de cada músculo foi fotografado (20x) em toda a sua extensão e a densidade de TC foi mensurada utilizando um sistema de planimetria por contagem de pontos (MATHIEU et al., 1980).

4.4 Análise dos dados

Φοι απλιχαδο ο τεστε Σηαπιρο–Ωιλκ ε Λεϖενε σεγυιδο δο ΑΝΟζΑ–Φ (Ονε – Ωαψ), ε τεστε δε Τυκεψ ΗΣΔ (α =5%). Ο σοφτωαρε υτιλιζαδο φοι ο Στατιστιχαλ Παχκαγε φορ Σοχιαλ Σχιενχεσ φορ Περσοναλ Χομπυτερ Ωινδοωσ (ΣΠΣΣ/ΠΧ ζερσ©ο 11.0). Οσ παλορεσ φοραμ εξπρεσσοσ εμ μ[δια ε δεσπιο παδρ©ο.

4. Resultados

Os músculos apresentaram maior densidade de TC no grupo D quando comparado aos grupos C e EED ($15 \pm 2.83\%$ vs $12 \pm 1.37\%$ e $11 \pm 1.59\%$, respectivamente, $p < 0.05$). O grupo EEA ($13 \pm 2.46\%$) apresentou menor densidade de TC quando comparado ao D, embora esta diferença não tenha sido significativa (Tabela 1; Figura 1).

É comum pacientes serem encaminhados a clínica devido as lesões nervosas periféricas, sendo a EE um recurso bastante utilizado para o tratamento destas lesões. Por este motivo, o presente trabalho teve como objetivo o estudo de 2 protocolos de EE (aplicação diária e alteranada) no remodelamento de TC em músculos previamente desnervados por axoniotmese.

É freqüente músculos desnervados apresentarem proliferação de TC, o que prejudica a função muscular, pois o aumento da densidade de TC forma uma barreira mecânica que dificulta o suprimento sanguíneo para as fibras musculares, provocando diminuição dos capilares e atrofia. Além disso, a proliferação de TC faz com que as fibras colágenas tenham contato mais íntimo umas com as outras, podendo estimular a formação de ligação cruzada anormal, o que resulta em perda da extensibilidade e aumento na rigidez tecidual muscular (JÄRVINEN et al., 2002).

O uso da EE em clínicas de fisioterapia tem como objetivo minimizar a atrofia das fibras e também a proliferação de TC, uma vez que é sabido que o estímulo mecânico impede a proliferação de TC (WILLIAMS et al. 1988).

Optou-se pelo modelo de EE fásica por ser um método não invasivo e usado com freqüência na clínica. Apesar do protocolo proposto ser indicado para músculos de contração lenta (FERNANDES et al., 2005), o músculo G, músculo de contração rápida, também sofreu os efeitos da EE, uma vez que este apresenta, em sua região profunda, 51% de fibras do tipo I. (DELP e DUAN, 1996).

Estudo prévio relata efeitos benéficos da EE em músculos desnervados, quando aplicada durante 20 dias (FERNANDES et al., 2003). Assim, teve-se o interesse de analisar se a EE também seria benéfica por período mais longo (30 dias), quando o músculo já encontra-se reinervado (GORIO et al., 1983).

Quando ocorre desnervação, a força de contração diminui devido atrofia das fibras musculares, com concomitante aumento de TC e gordura (MOKRUSCH, 2002). No presente estudo, a desnervação provocou aumento de 25% de TC no grupo D, quando comparado ao grupo C, corroborando os achados de Possebon

et al. (2001) que também observaram grande quantidade de TC entre as fibras musculares após 30 dias de desnervação no músculo G de ratos Wistar desnervados.

Ambos protocolos de EE aplicados ao músculo, diário e alterado foram efetivos para diminuir a densidade de TC, porém somente no grupo EED houve diferença significativa quando comparado com o grupo D. Além disso, o grupo EED apresentou os mesmos valores de densidade de TC quando comparado ao C. Resultados similares também foram encontrados em estudo prévio, onde a aplicação de corrente galvânica diariamente, durante 30 até 150 dias, em músculo desnervado de coelho resultou em maior número de fibras musculares e menos TC do que os músculos não tratados (Gutmann e Gutmann, 1944).

5. Considerações Finais

Com base nos dados obtidos pode-se concluir que a aplicação de EE em músculos previamente desnervados é tratamento eficaz para diminuir a proliferação de TC observada após lesão nervosa. Além disso, o tratamento diário mostrou ser mais efetivo do que o alternado, sugerindo que na prática clínica este deve ser o tratamento de escolha.

Referências Bibliográficas

1- ASMUSSEN, G.; SCHMALBRUCH, I.; SOUKUP, T.; PETTE, D. Contractile properties, fiber types, and myosin isoforms in fast and slow muscles of hyperactive Japanese waltzing mice. **Exp Neurol**, v.184, n.3, p. 758 – 766, 2003.

2- CARTER, A.J. ; KRISTMUNDSDOTTIR, F. ; GILMOUR, J. ; GLASBY, M.A. Changes in muscle cytoarchitecture after peripheral nerve injury and repair. **J Hand Surg [Br]**, v.23, n.3, p. 265-369, 1998.

3 – CUMMINGS, J. **Electrical Stimulation of denervated muscle**. In **Gersch, M : Electrotherapy in rehabilitation**, Philadelphia : F A Davis, 1992.

- 4- DECHERCHI, P. ; DOUSSET, E.; MARQUESTE T.; BERTHELIN, F.; HUG, F.; JAMMES, Y.; GRÉLOT, L. Électromyostimulation et recuperation fonctionnelle d'un muscle dénervé. **Science & Sports**, v.18, p. 253 – 263, 2003.
- 5- DELP, M.D.; DUAN, C. Composition and size of type I, IIA, IID/X, and IIB fibers and citrate synthase activity of rat muscle. **J Appl Physiol**, v.80, n.1.p. 261-270, 1996.
- 6- 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 desnervação e estimulação elétrica de baixa frequência. **Rev Bras Fisiot**, v.9, n.2, p. 235 – 241, 2005.
- 7- GORIO, A.; CARMIGNOTO, G.; FINESSO, M.; POLATO, P.; NUNZI, M.G. Muscle reinnervation – II Sprouting, synapse formation and repression. **Neuroscience**, v.8, n.3, p. 403-416, 1983.
- 8- GUTMANN, E.; GUTMANN, L. The effect of galvanic exercise on denervated and re-innervated muscles in the rabbit. **J Neurol Neurosurg Psychiat**, v.7, p. 7–17, 1944.
- 9- JÄRVINEN, T.A.; JÓZSA, L.; KANNUS, P.; JÄRVINEN, T.L.; JÄRVINEN, M. Organization and distribution of intramuscular connective tissue. **J Muscle Res Cell Motil**, v.23, n.3, p. 245 – 254, 2002.
- 10- KOSTROMINOVA, T.Y.; DOW, D.E.; DENNIS, R.G.; MILLER, R.A.; FAULKNER, J.A. Comparison of Gene Expression of Two-Month Denervated, Two-Month Stimulated-Denervated and Control Rat Skeletal Muscles. **Physiol Genomics**, v.22, n.2, p. 227- 243, 2005.

11- LIEBER, R.L. **Skeletal muscle structure, function, & plasticity: the physiological basis of rehabilitation**. 2nd. ed. Philadelphia: Lippincott, USA; 2002.

12- MARQUESTE, T.; ALLIEZ, J.R.; ALLUIN, O.; JAMMES, Y.; DECHERCHI, P. Neuromuscular rehabilitation by treadmill or electrical stimulation after peripheral nerve injury and repair. **J Appl Physiol**, v.96, n.5, p. 1988–1995, 2004.

13- MATHIEU, O.; CRUZ-ORIVE, L.M.; HOPPELER, H.; WEIBEL, E.R.. Measuring error and sampling variation in stereology: comparison of the efficiency of various methods for planar image analysis. **J Microsc**, v.121, n.1, p. 75 – 88, 1981.

14- MOKRUSCH, T. MRI-Changes of Skeletal Muscle after Denervation and LIB Electrical Stimulation. **Basic Appl Myol**, v.12, n.6, p. 273-276, 2002.

15- POLACOW, M.L.O.; SILVA, C.A.; GUIRRO, R.R.J.; CAMPOS, M.R.; BORGES, J.P. 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.

16- POSSEBON, S.; IORCZESKI, R.; GIACOMINI, A.C.; GIACOMINI, F.L.; HAAS, V.R. Efeitos do Treinamento físico e da Creatina Magnésio em músculos desnervados de Ratos. **Rev Medica HSP**, v.13, n.29, p. 16-21, 2001.

17- PURSLOW, P.P. The structure and functional significance of variations in the connective tissue within muscle. **Comp Biochem Physiol**, v.133, n.4, p. 947 – 966, 2002.

18- WILLIAMS PE, CATANESE T, LUCEY EG, GOLDSPINK G. THE IMPORTANCE OF STRETCH AND CONTRACTILE ACTIVITY IN THE PREVENTION OF CONNECTIVE TISSUE ACCUMULATION IN MUSCLE. **J ANAT**, V.158, P.109 – 14, 1988.

19- ZERNICKA, E.; SMOL, E.; LANGFORT, J.; GORECKA, M. Time course of changes in lipoprotein lipase activity in rat skeletal muscles during denervation-reinnervation. **J Appl Physiol**, v.92, n.2, p. 535 – 540, 2002.

