



15º Congresso de Iniciação Científica

ANALISE DO ESTRESSE E COMPORTAMENTO DE RATOS ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA NEUROMUSCULAR

Autor(es)

JULIANA DE MELLO LIBARDI

Orientador(es)

Rinaldo Roberto de Jesus Guirro

Apoio Financeiro

PIBIC

1. Introdução

A imobilização é uma condição freqüente na prática clínica fisioterapêutica e diversos fatores podem propiciar a sua prescrição durante um processo de reabilitação, como fraturas ósseas, rupturas ligamentares, doenças degenerativas das articulações, lesões medulares e musculares, inflamações, a falta de nutrição, cirurgias, perda do controle neural, envelhecimento. E é inevitável como conseqüência a todas essas condições, a diminuição da amplitude de movimentos das articulações e o aparecimento de hipotrofia muscular. Estudos demonstram que o desuso muscular induz efeitos deletérios, tais como a hipotrofia muscular, proliferação do tecido conjuntivo intramuscular, redução das reservas de glicogênio, da densidade dos capilares, dos sarcômeros em série, da força e resistência à fadiga (JÓZSA et al., 1990; REARDON et al., 2001). Além disso, no período inicial da imobilização, há o estresse oxidativo que gera compostos lesivos às estruturas dos sistemas biológicos (EDGERTON et al., 2002). Uma complicação da imobilização, como já citado, é o aparecimento de fraqueza e hipotrofia muscular. Os músculos perdem até 15% de sua força a cada semana de imobilização (TEASELL et al., 1993) sendo que a mais expressiva diminuição ocorre durante a primeira semana (APPELL, 1990). A contração muscular previne ou retarda os efeitos deletérios do desuso. A prática de exercício físico seria uma ótima alternativa para essa prevenção, mas na debilidade física, fraqueza extrema como, por exemplo, numa permanência longa no leito, período longo de imobilização, isso não se torna possível. Nesse contexto, a estimulação elétrica é utilizada como uma ferramenta essencial para melhorar o desempenho muscular (THERIAULT et al., 1994). Esse recurso tem sido utilizado para reduzir o tempo de reabilitação, recuperar a força muscular, principalmente quando há contra-indicações de exercícios dinâmicos, e na prevenção da hipotrofia muscular decorrente da imobilização (AVRAMIDIS et al., 2003). Efeitos hemodinâmicos também são constatados com a contração induzida artificialmente como a melhora da circulação sanguínea, da microcirculação e das trocas

transcapilares (DALY et al., 1996). De acordo com o exposto, o estudo se propôs a avaliar os efeitos comportamentais e estressores associados à imobilização e a estimulação elétrica.

2. Objetivos

Este projeto de Iniciação Científica teve como objetivo avaliar os efeitos da estimulação elétrica e imobilização articular sobre as respostas comportamentais indicativas do estado de ansiedade e/ou estresse em ratos.

3. Desenvolvimento

Foram utilizados 20 ratos albinos Wistar com 3 meses de idade, fornecidos pelo Biotério da UNIMEP, submetidos ambiente controlado (ciclos foto periódicos de 12h claro/escuro, 23°C ±2) e distribuídos igualmente em 4 grupos experimentais: controle (C), imobilizados (I) 7 dias, estimulados eletricamente (EE) e imobilizados estimulados eletricamente (I+EE). O trabalho foi aprovado pelo comitê de ética em experimentação animal da UFSCar, protocolo 015/2006. Após anestesia com pentobarbital sódico (50mg/kg, i.p) a pata posterior esquerda dos animais foi imobilizada com o modelo de órtese de resina acrílica proposto por Silva et al. (2006). Após 24 h da imobilização os ratos foram submetidos aos protocolos de avaliação comportamental. Os animais foram observados diariamente no início da noite, período de maior atividade da espécie. Para o open field, permaneceram no ambiente durante 3 minutos (PELLOW et al., 1985) e para o teste do labirinto em cruz elevado, cada animal foi submetido ao teste comportamental sendo colocado no centro do labirinto, de frente para um dos braços fechados e, observado durante 5 minutos, utilizou-se o modelo descrito por Lamprea et al. (2000). Os grupos EE e I+EE foram estimulados com uma corrente quadrática bifásica simétrica com frequência de 10Hz, fase de 300 us e intensidade inicial de 5 mA, sendo elevada em 1 mA a cada 5 minutos. Para tanto foi utilizado o equipamento DUALPEX 961 (QUARK), com eletrodos de 1x1 cm. Após as fases experimentais, os animais foram anestesiados e uma amostra de sangue coletada, centrifugada e o plasma encaminhado para análise da concentração plasmática de corticosterona através de ELISA (BIORAD- diagnósticos). A avaliação estatística foi utilizada pelo teste de normalidade (Kolmogorov-Smirnov) seguido da análise variância (ANOVA) e teste de Tukey, com nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

4. Resultados

O comportamento exploratório é a denominação da expressão comportamental da curiosidade que acontece de forma espontânea nos animais (RENNER e SELTZER, 1991). O teste de campo aberto (open field) é um teste comportamental empregado na avaliação exploratória de ratos. Esse paradigma foi validado por File e Wardill (1975). Com o teste de movimentação exploratória, foi avaliado o grupo controle sendo observado que o deslocamento exploratório teve redução a cada dia de análise, o que leva a acreditar que se trata de período de adaptação ao ambiente. Por outro lado, ao se avaliar o comportamento do grupo imobilizado quando submetido ao campo aberto observou-se que concomitantemente ao desuso houve supressão no comportamento de deambulação dos ratos imobilizados, se comparados aos parâmetros observados pelo grupo controle com expressiva redução, atingindo 68,9%, 55,2%, 54%, 61,5%, 63,8%, respectivamente do 1º ao 5º dia de análise, fato que mostra inibição no comportamento exploratório. Sugere-se então que a limitação funcional gerada pela órtese pode ser uma condição indutora de estresse. Na literatura, podem-se encontrar estudos que mostram que ratos com maior estresse e ansiedade têm menor comportamento exploratório (BLAKLEY et al., 2006). Um fator indicativo do estresse é a elevação nas concentrações plasmáticas de corticosterona (Rodriguez Echandia et al., 1988). Neste sentido, na figura 1 pode-se observar que o grupo submetido à imobilização apresentou elevação plasmática na concentração deste hormônio atingindo uma elevação média de 177% no primeiro e segundo dia se comparado aos animais do grupo controle, no terceiro dia a concentração apresentou diminuição de 38% se comparado ao primeiro dia de imobilização, 22% no quarto dia, e ainda permanecia 16,4% maior do que o controle no 5º dia, porém dentro da faixa de normalidade. Figura 1. Concentração plasmática de corticosterona (ng/mL)

dos grupos controle (C), estimulados eletricamente (E), imobilizados (I) e imobilizados estimulados eletricamente (I+EE) após o teste de campo aberto durante 5 dias consecutivos. Os valores correspondem à média \pm epm, n=6, *P<0,05 se comparado ao controle e #P<0,05 se comparado ao imobilizado. Na seqüência experimental avaliou-se o comportamento dos ratos submetidos ao labirinto em cruz elevado (LCE), que é um método considerado como um instrumento útil e válido para medir ansiedade, investigações de aspectos comportamentais, fisiológicos e farmacológicos (Anseloni e Brandão, 1997). Lister (1987) examinou o comportamento de camundongos e observou que existe uma correlação entre o número total de entradas nos BA e o índice de ansiedade. Segundo Cruz et al. (1994), a exploração das extremidades dos braços abertos também é um indicador do nível de medo experimentado pelo animal no labirinto em cruz elevada. No grupo imobilizado submetido à estimulação elétrica foi verificado que o índice de deslocamento exploratório foi em média 38% maior do que o grupo imobilizado, mas não atingiu os valores observados no grupo controle, persistindo a limitação no comportamento. Cabe ressaltar que o grupo submetido à estimulação elétrica (EE) não diferiu do controle, assim, optou-se por não apresentá-lo na figura 2. Figura 2. Número de campos deslocados no open field dos grupos controle (C), imobilizado (I) e imobilizado estimulado eletricamente (I+EE). Os valores correspondem à média \pm epm, n=6. *P<0,05 se comparado ao dia antecedente, #P<0,05 se comparado ao controle; a = diferente do controle; b = diferentes do imobilizado. Observou-se menores índices dos parâmetros que indicam medo e ansiedade quando comparado o grupo Imobilizado submetido à estimulação elétrica ao grupo somente imobilizado, mostrando elevação de 34% na porcentagem de tempo no braço aberto, 126% na porcentagem de entrada no braço aberto e 13% na avaliação de risco. Este comportamento foi acompanhado de redução de 68% no número de entrada no braço fechado e 61% no número de idas ao final do braço aberto fato que sugere que a terapia ao ter induzido uma melhora nas condições energéticas da musculatura possa ter propiciado mudanças comportamentais, uma vez que o animal manifestou aumento na capacidade de locomoção (Figura 3). Figura 3. Resultados do labirinto em cruz elevado (LCE) mostrando porcentagem de tempo e de entradas do braço aberto (BA), número de entradas no braço fechado (BF), número de idas ao final do braço aberto (BA) e avaliação de risco dos grupos Controle (C), Imobilizado (I), Estimulação elétrica (EE) e Imobilizado e estimulação elétrica (I+EE), n = 6. * p<0,05 em relação ao controle e # p<0,05 em relação ao imobilizado Para esta proposta, relaciona-se estudos que demonstraram melhora nas condições metabólicas associadas à estimulação elétrica (SILVA et al., 2006; forti et al., 2004). Por fim, observou-se que o grupo de ratos imobilizados e submetidos à estimulação elétrica apresentaram alterações nos parâmetros comportamentais em menor instância do que aqueles imobilizados e não estimulados, fato indicativo da existência de relações funcionais entre os ajustes neuroquímicos e a modulação do comportamento.

5. Considerações Finais

De acordo com o estudado sugere-se a existência de alterações fisiológicas e comportamentais ligadas a imobilização neuromuscular. Estas alterações são caracterizadas pela redução na atividade exploratória e desenvolvimento de ansiedade, fatos que podem acompanhar a limitação imposta pelo desuso. A estimulação elétrica demonstrou ter relações funcionais entre os ajustes neuroquímicos e modulação do comportamento, sendo considerada válida sua utilização em casos de imobilizações.

Referências Bibliográficas

- ANSELONI, V. Z.; BRANDÃO, M. L. Ethopharmacological analysis of behavior of rats using variations of the elevated plus-maze. **Behavioral Pharmacology**. v. 8, p. 533-540, 1997.
- APPELL, H. J. Muscular atrophy following immobilization. A review. **Sports Med**. v.10, n. 1, p. 42-58, 1990.
- AVRAMIDIS, K.; STRIKE, P. W.; TAYLOR, P. N.; SWAIN, I. D. Effectiveness of electric stimulation of the vastus medialis muscle in the rehabilitation of patients after total knee arthroplasty. **Arch Phys Med Rehabil**. v. 84, p.1850-53, 2003.
- BLAKLEY, G.; POHORECKY, L. A. Psychosocial stress alters ethanol's effect on open field behaviors. **Pharmacol Biochem Behav**. v. 84, n. 1, p. 51-61, 2006.
- CRUZ, A. P. M.; FREI, F.; GRAEFF, F. G. Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated

- plus-maze. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**. v. 49, p. 171-176, 1994.
- DALY, J. J. Therapeutic neural effects of electrical stimulation. **IEEE transaction on rehabilitation engineering**. v. 4, n.4, p. 218-30, 1996.
- EDGERTON V. R.; ROY R. R.; ALLEN D. L.; MONTI R. J. Adaptations in skeletal muscle disuse or decreased-use atrophy. **Am J Phys Med Rehabil**. v. 81, n. 11, p. 127-47, 2002.
- FILE S.E.; WARDILL A. G. Validity of head-dipping as a measure of exploration in a modified hole-board. **Psychopharmacologia**. v. 44, n. 1, p. 53-59, 1975.
- FORTI, F.; GUIRRO, R. R. J.; SILVA, C. A. Efeitos da glutamina e da estimulação elétrica sobre o perfil metabólico de músculos desnervados. **Revista Brasileira de Educação Física e Esporte**. v. 18, n. 3, p. 273-281, 2004.
- JÓZSA, L.; KANNUS, P.; THORING, J.; REFFY, A.; JARVINEN, M.; KVIST, M. The effect of tenotomy and immobilization on intramuscular connective tissue. **J Bone Joint Surg**. v.72, p.293-7, 1990.
- LAMPREA, M. R.; CARDENAS, F. P.; SILVEIRA, R.; MORATO, S.; WALSH, T. J. Dissociation of memory and anxiety in a repeated elevated plus-maze paradigm: forebrain cholinergic mechanisms. **Behavioral Brain Research**. v. 117, p. 97-105, 2000.
- LISTER, M. J. Clinical measurement. **Phys Ther**. v. 67, n. 12, p. 1829, 1987.
- PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S. E; BRILEY, M. Validation of open-closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rats. **J Neurosci. Meth**. v. 14, p. 49-67, 1985.
- REARDON, K. A.; DAVIS, J.; KAPSA, R. M.; CHOONG, P.; BYRNE, E. Myostatin, insulin-like growth factor-1, and leukemia inhibitory factor are upregulated in chronic human disuse muscle atrophy. **Muscle Nerve**. v. 24, p. 893-9, 2001.
- RENNER, M. J.; SELTZER, C. P. Characteristics of exploratory and investigatory behavior in the rat (*Rattus norvegicus*). **J. Comparative. Physicol**. v. 1051, p. 326-339, 1991.
- RODRIGUES ECHANDIA, E. L.; GONZALEZ, A. S.; CABRERA, R.; FRACCHIA, L. N. A further analysis of behavioral and endocrine effects of unpredictable chronic stress. **Physiol Behav**. v. 43, n. 6, p. 789-95, 1988.
- SILVA, C. A.; GUIRRO, R. R. J.; POLACOW, M. L. O.; DURIGAN, J. L. Q. Proposal for rat hindlimb joint immobilization: orthosis with acrylic resin model. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v. 39, p. 979-85, 2006.
- TEASELL, R.; DITTMER, D. K. Complications of immobilization and bed rest. **Can Fam Physician**. v. 39, p. 1440-2, 1993.
- THERIAULT, R.; THERIAULT, G.; SIMONEAU, J. A. Human skeletal muscle adaptation in response to chronic low-frequency electrical stimulation. Theriault R, Theriault G, Simoneau JA. **J Appl Physiol**. v. 77, n. 4, p. 1885-9, 1994.

Anexos





