



5º Congresso de Pesquisa

INFLUÊNCIA DA ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA DE BAIXA FREQUENCIA SOBRE A REINERVAÇÃO MUSCULAR

Autor(es)

ROSANA MACHER TEODORI

Co-Autor(es)

RINALDO ROBERTO DE JESUS GUIRRO
VIVIANE BALISARDO MINAMOTO

Apoio Financeiro

FAPESP, FAP/UNIMEP

1. Introdução

Apesar da capacidade de regeneração do sistema nervoso periférico, a recuperação funcional após lesão é frequentemente pobre (LUNDBORG, 2000), sendo fundamental o desenvolvimento de estratégias que favoreçam a regeneração e consequente recuperação funcional. Lesões por esmagamento preservam a microcirculação do nervo e seus envoltórios conjuntivos, o que favorece o reparo nervoso, além de impedir entrada de substâncias deletérias no sítio da lesão, como ocorre na neurotmeose (LUNN; BROWN; PERRY, 1990). A reinervação muscular inicia 2 semanas após a axoniotmeose (GORIO et al., 1983). Os axônios se destacam do tronco nervoso, penetram no músculo, crescem entre as fibras e reinervam a junção neuromuscular (JNM), liberando neurotransmissores. Após 15 dias, 25% das fibras musculares estão poliinervadas. Por volta do 25º dia, o potencial de repouso da membrana muscular, força de contração, sensibilidade à acetilcolina e níveis de acetilcolinesterase voltaram ao normal (CARMIGNOTO et al., 1983). No 26º dia inicia a eliminação sináptica e, por volta do 60º dia, as fibras estão monoinervadas. As terminações nervosas remanescentes aumentam seu tamanho e, aos 90 dias, ocupam quase completamente a fenda pós sináptica (GORIO et al., 1983). A eletroestimulação (EE) é um recurso utilizado para facilitar a recuperação funcional após lesão nervosa, retardando a atrofia e a proliferação conjuntiva no músculo (GREATHOUSE, 1985). Entretanto, o papel da atividade neuromuscular para a regeneração axonal é ainda controverso; os parâmetros de estimulação são variados, assim como o local onde o estímulo é aplicado (nervo ou músculo). Estimulação elétrica crônica (20 Hz, 24 horas/dia, durante 2 semanas) aplicada proximal à secção no nervo femoral de ratos acelera a regeneração de axônios motores. Mesmo quando estes parâmetros de EE são aplicados durante 1 hora/dia, observa-se uma aceleração no crescimento axonal (GORDON; SULAIMAN e BOYD, 2003). A EE crônica aplicada ao músculo desnervado inibe a

expressão da molécula de adesão celular neural (NCAM), que favorece a formação de sinapses (LIEBER, 2002), sugerindo que em condições de alta atividade muscular (músculo normalmente inervado ou desnervado e eletricamente estimulado) a expressão da NCAM é inibida e a sinaptogênese pode estar comprometida. Células de Schwann terminais induzem brotamento terminal através de uma rede de longos processos que formam pontes com processos de células de Schwann de junções inervadas ao redor (LOVE; SON e THOMPSON, 2003), direcionando brotos em regeneração a JNMs desnervadas (KOIRALA; QIANG e KO, 2000). Love, Son e Thompson (2003) demonstraram que a EE crônica do músculo sóleo (SO) parcialmente desnervado de ratos não altera o comprimento ou o número dos processos de células de Schwann terminais, mas reduz o número de pontes entre elas, o que altera o brotamento terminal e a reinervação muscular. Entretanto, não há relatos sobre a influência da EE muscular fásica de baixa frequência sobre a reinervação muscular. Considerando a variabilidade dos parâmetros de EE em músculos desnervados, é importante investigar se a EE muscular aplicada na clínica compromete a regeneração nervosa, embora seja benéfica para prevenção da atrofia e da proliferação de tecido conjuntivo.

2. Objetivos

Investigar a distribuição do terminal motor e dos receptores de acetilcolina (AChRs) após axoniotmese e eletroestimulação muscular, bem como a influência da eletroestimulação sobre o padrão morfométrico do músculo sóleo reinervado.

3. Desenvolvimento

Cinquenta ratos Wistar (222,05 ±42,2g), foram divididos em 3 grupos: a) Grupo lesão (L; n=15): esmagamento do nervo isquiático e sobrevida de 10 (n=5), 20 (n=5) e 30 (n=5) dias. b) Grupo lesão + EE (EEA/EED; n=30): esmagamento do nervo isquiático e EE, com sobrevida de 10 (n=10), 20 (n=10) e 30 (n=10) dias. c) Grupo controle (CO; n=5): sem lesão e sem EE. Os animais dos grupos L, EE Diária (EED) e EE em dias Alternados (EEA) foram anestesiados com uma mistura (1:1) de Ketalar® (Cloridrato de Ketamina) 50 mg/mL e Rompun® (Cloridrato de Tiazina) 2 g/100mL (0,3 mL/100 g de peso corporal). O nervo isquiático esquerdo foi exposto e esmagado com pinça hemostática Erwin Guth® de 12cm, por 4 pinçamentos de 20 segundos. Os planos muscular e cutâneo foram suturados e os animais mantidos em gaiolas individuais, ciclo claro/escuro de 12 horas e livre acesso à ração e água, no Biotério da FACIS - UNIMEP. Após 24 horas da lesão os animais dos grupos EEA e EED foram anestesiados e o músculo SO esquerdo eletroestimulado (corrente quadrática bifásica simétrica, $i = 5$ mA, fase = 3 ms, freq = 10 Hz) 30 min ao dia (DUALPEX 961 – QUARKâ), com 2 eletrodos percutâneos auto-adesivos de 1 cm² de área (região inguinal e sobre o músculo gastrocnêmio). Os animais submetidos à EE foram subdivididos em dois grupos: a) EE diária: eletroestimulados diariamente; b) EE intervalada: eletroestimulados em dias alternados; ambos por um período de 10, 20 e 30 dias. Após anestesia, o músculo SO esquerdo foi retirado e congelado em isopentano pré-congelado em nitrogênio líquido, sendo obtidos cortes transversais de 12 µm em micrótomo criostato (MICRON 505 E – Zeiss), corados com Hematoxilina-Eosina, para análise morfométrica. Foram mensuradas 200 fibras do músculo SO de cada animal (Motic Images 3.2®), escolhidas aleatoriamente entre os campos fotografados em toda a extensão do músculo. Para análise das JNMs, o músculo SO foi obtido de animais perfundidos intracardiacamente com 20 mL de solução tampão fosfato (PBS), seguida de 20 mL de paraformaldeído a 2%. O músculo foi fixado in situ com paraformaldeído 2% (15 min.) e retirado. Para marcação dos AChRs, os músculos foram processados e incubados com α -bungarotoxina conjugada à rodamina (Rh-BTX 1:100 em PBS; Sigma). Para marcação dos terminais nervosos, foram incubados com anticorpo primário (anti-neurofilamento – Sigma) e secundário (anti-mouse FITC). Para marcação das células de Schwann, os músculos foram incubados com anticorpo primário (anti-S100) e secundário (anti-rabbit FITC), montados em lâmina sob lamínula, em meio de montagem para fluorescência DABCO (Sigma) e observados em microscópio de fluorescência Nikon Eclipse TS 100, com câmera de vídeo (Nikon digital camera DX m1200F) em objetiva de 20x. Considerou-se as JNMs das três camadas de fibras mais superficiais do músculo SO, até o limite de 150 JNMs por animal em cada grupo, analisadas sob microscópio de fluorescência. Analisou-se a porcentagem de terminais nervosos cobrindo

AChRs, o número de brotamentos e o número de JNMs mono e poliinervadas. Para análise da área de secção transversa (AST) das fibras musculares, utilizou-se o teste Shapiro-Wilk para normalidade dos dados e homogeneidade entre as variâncias. Para todas as variáveis aplicou-se a ANOVA teste F, seguido do teste de Tukey. Quando não foi possível verificar esses pressupostos, aplicou-se o teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn. Para análise das JNMs, aplicou-se o teste de Kruskal-Wallis seguido de Student-Newman-Keuls (SNK) para análise intergrupos da porcentagem de terminais nervosos, número de brotos axonais, número de JNMs mono e poliinervadas. Para análise intragrupos do número de JNMs mono e poliinervadas, aplicou-se o teste de Wilcoxon. Os dados foram processados no software BioEstat 4.0®, considerando $p < 0,05$.

4. Resultados

Músculos esqueléticos desnervados atrofiam rapidamente, apresentando diminuição de 29% das proteínas contráteis aos 10 dias, acompanhada da diminuição da AST das fibras (FURUNO, GOODMAN e GOLDBERG, 1990). Essa atrofia é devida ao aumento da proteólise miofibrilar causada pelo aumento de cálcio intracelular, o que resulta em síntese protéica discreta ou ausente (ENGEL e FRANZINI-ARMSTRONG, 1994). A EE minimiza a atrofia de músculos desnervados pela alteração da concentração do cálcio no meio sarcoplasmático, o que diminui a degradação das proteínas musculares (EBERSTEIN e PACHTER, 1986). Neste estudo, os valores da AST mostram que a EE minimizou a atrofia na fase inicial da desnervação (grupos 10 e 20 dias), quando a atividade neuromuscular voluntária não está completamente restabelecida. Animais submetidos à EE diária apresentaram melhores resultados, provavelmente porque receberam 40% mais estímulo que na EE alternada (Tabela 1). Nos grupos 30 dias, tanto a EE diária como a alternada não interferiu na AST das fibras musculares, possivelmente porque o músculo já está reinervado, sugerindo que com o restabelecimento da contração voluntária, a EE não é importante para aumento da AST. Nos grupos CO e desnervados após 10 dias da lesão, não havia brotamento axonal, pois a regeneração nervosa inicia 14 dias após a axoniotmese (GORIO et al., 1983). Brotos axonais se tornaram evidentes a partir do 20º dia da lesão. A EE diária e intervalada foi benéfica ao brotamento axonal, tanto aos 20 quanto aos 30 dias após a lesão (Tabela 2). A tabela 2 mostra que no grupo CO, as JNMs estão monoinervadas e, 10 dias após a lesão o músculo está completamente desnervado. Nos grupos desnervados 10 dias, a EE diária ou intervalada não acelerou a reinervação muscular. Entretanto, nos períodos de 20 e 30 dias pós-lesão, nota-se aumento do número de JNMs poliinervadas, o que se justifica pelo fato de que cada axônio lesado emite de 2 a 3 brotos em direção ao músculo (FAWCETT e KEYNES, 1986), os quais reinervam as JNMs. Do 25º ao 60º dia, ocorre a eliminação sináptica e, ao final desse período, as JNMs se tornam monoinervadas (CARMIGNOTTO et al., 1983). Observa-se também na tabela 2 que a poliinervação foi mais evidente quando a EE foi aplicada diariamente 30 dias após a lesão. Apesar de não ter sido possível identificar as células de Schwann neste estudo, aparentemente, a EE fásica de baixa frequência não inibiu a função dessas células de induzir o brotamento terminal e guiar os brotos em regeneração às JNMs desnervadas (LOVE; SON e THOMPSON, 2003). No grupo CO as JNMs estão monoinervadas e, 10 dias após a lesão, não há JNMs inervadas (Tabela 2). Nos grupos L20 e L30, o número de JNMs monoinervadas foi significativamente menor que no grupo CO. Observou-se aumento do número de JNMs monoinervadas no grupo que recebeu EE intervalada 20 dias após a lesão. O mesmo ocorreu aos 30 dias, no grupo que recebeu EE diária, sugerindo que a EE tenha acelerado a eliminação sináptica. A eliminação sináptica é um processo de competição e o bloqueio ou estimulação excessiva da atividade sináptica lentifica ou acelera a velocidade de eliminação, respectivamente (BARRY e RIBCHESTER, 1995). Por ser a eliminação sináptica um processo atividade-dependente (SANES e LICHTMAN, 1999), é possível que a EE muscular aplicada tenha acelerado a competição entre os axônios terminais que reinervavam o músculo SO nesses grupos. Os resultados deste estudo diferem dos observados por Lieber (2002), onde a EE crônica em músculo desnervado inibiu a expressão da NCAM, inibindo a formação de sinapses. Possivelmente isso se deva aos diferentes parâmetros de EE utilizados. Uma análise da expressão da NCAM poderia elucidar essa questão.

5. Considerações Finais

Os efeitos da EE no músculo desnervado sobre a AST das fibras musculares são influenciados pelo tempo de desnervação, sendo a EE mais efetiva na fase inicial da regeneração (10 e 20 dias). A EE diária foi mais eficaz que a alternada para a preservação do trofismo do músculo SO desnervado. Dez dias após a lesão, a EE diária ou intervalada não acelerou a reinervação muscular; A EE diária e intervalada favoreceu o brotamento axonal, tanto aos 20 quanto aos 30 dias após a lesão; A EE aplicada diariamente 30 dias após a lesão parece ter acelerado a eliminação sináptica. Os parâmetros de EE aplicados não prejudicaram a reinervação muscular.

Referências Bibliográficas

0. 1.

BARRY, JA; RIBCHESTER, RR. Persistent polyneuronal innervation in partially denervated rat muscle after reinnervation and recovery from prolonged nerve conduction block. **J. Neurosci.** 15:6327–6339, 1995.

•
CARMIGNOTO, G. et al. Muscle reinnervation – I. Restoration of transmitter release mechanisms. **Neurosci** 8: 393-401, 1983.

•
EBERSTEIN, A; PACHTER, BR. The effect of electrical stimulation on reinnervation of rat muscle: contractile properties and endplate morphometry. **Brain Res.** 384(2): 304-310, 1986.

•
ENGEL, AG; FRANZINI-ARMSTRONG, C. **Myology.** 2. ed. Philadelphia: McGRAW-HILL INC; 1994. 1960p.

•
FAWCETT, JW; KEYNES, RJ. Muscle basal lamina: a new graft material for peripheral nerve repair. **J Neurosurg** 65 (3): 354-363, 1986.

•
FURUNO, K; GOODMAN, MN; GOLDBERG, AL. Role of Different Proteolytic Systems in the Degradation of Muscle Proteins during Denervation Atrophy. **J Biol Chem.** 265(15): 8550-8557, 1990.

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

•
GORIO, A et al. Muscle reinnervation-II. Sprouting, synapse formation and repression. **Neurosci** 8 (3): 403-416, 1983.

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

•
KOIRALA, S; QIANG, H; KO, CP. Reciprocal interactions between perisynaptic Schwann cells and regenerating nerve terminals at the frog neuromuscular junction. **J Neurobiol** 44: 343-360, 2000.

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

•
LOVE, F.M.; SON, Y.J.; THOMPSON, W.J. Activity alters muscle reinnervation and terminal sprouting by reducing the number of Schwann cell pathways that grow to link synaptic sites. **J Neurobiol**, 54:556-576, 2003.

•
LUNDBORG, G. A 25-year perspective of peripheral nerve surgery: Evolving neuroscientific concepts and clinical significance. **J Hand Surg**, 25:391–414, 2000.

•
LUNN, E.R.; BROWN, M.C.; PERRY, V.H. The pattern of axonal degeneration in the peripheral nervous system varies with different types of lesion. **Neurosci** 35 (1):157-165, 1990.

•
SANES, JR; LICHTMAN, JW. Development of the vertebrate neuromuscular junction. **Annu Rev Neurosci** 22: 389-442, 1999.

Anexos

Tabela 1: Valores médios \pm DP da Área de Secção Transversa (em μm^2) das fibras do músculo sóleo nos diferentes grupos e tempos de análise.

	CO	L10	EED10	EEA10	L20	EED20	EEA20	L30	EED30
Média	1769	855 *#	1034 *	866 *#	948 *†#	1441 *	1224*#	1497*	1600*
DP	45,11	33,57	34,06	34,5	73,02	80,77	44,15	91,42	32,00

(*) Difere do CO; (#) Difere do EED; (†) Difere do EEA; ($p < 0,05$).

Tabela 2: Valores de mediana e diferença interquartílica do número de brotos axonais, do número de junções neuromusculares poliinervadas e monoinervadas em diferentes grupos e tempos de análise.

		CO	L10	EED10	EEA10	L20	EED20	EEA20	L30	EED30
Nº brotos	Med	0	0	0	0	10	33,5 *	33 *	4	40 * †
	IQ	0	0	0	0	8,5	19,75	6,5	7,5	4,75
Nº Poli	Med	0	0	0	0	5,5	15 *	11,5 *	0,5	14,5 * †
	IQ	0	0	0	0	5,25	10	4,25	1,5	2,25
Nº Mono	Med	51,5	0 *	0 *	0 *	3 *	19	22 **	3,5 *	31,5 †
	IQ	33,75	0	0	0	1,5	6,5	0,75	7,5	14

(*) Difere do CO; (**) Difere do L20; (†) Difere do L30; (p<0,05).