



18º Congresso de Iniciação Científica

INFLUÊNCIA DA ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA DE ALTA VOLTAGEM SOBRE A POPULAÇÃO DE CÉLULAS DE SCHWANN E VASCULARIZAÇÃO NO NERVO APÓS AXONIOTMESE

Autor(es)

JAQUELINE ALVES DA SILVA

Orientador(es)

ROSANA MACHER TEODORI

Apoio Financeiro

PIBIC/CNPQ

1. Introdução

As células de Schwann são as principais mediadoras da regeneração. Sofrem divisão mitótica imediatamente após a lesão, se diferenciam e regulam a expressão gênica de moléculas envolvidas na degeneração e regeneração (BURNETT; ZAGER, 2004). Desprovidas de axônios, tornam-se alongadas e se unem a células de Schwann vizinhas, formando as Bandas de Bungner no interior dos tubos de membrana basal. Nesta fase a síntese de fatores neurotróficos aumenta e, como a lâmina basal das células de Schwann permanece íntegra durante a degeneração Walleriana, serve de guia para o brotamento dos axônios durante a reinervação (STOLL; M?LLER, 1999).

A regeneração inicia aproximadamente 6 horas após a lesão, quando os axônios proximais formam um cone de crescimento, de onde surgem os primeiros brotos axonais (IDE, 1996). Cada axônio emite 2 a 3 brotos em direção ao músculo para restabelecimento da função (FAWCETT; KEYNES, 1990; IDE, 1996), os quais são atraídos por fatores tróficos presentes na membrana basal das células de Schwann, especialmente a laminina e a fibronectina, que aceleram a regeneração axonal (LEE; SCOTT; WOLFE, 2000).

A neovascularização endoneural distal pós-traumática depende do grau de regeneração e da isquemia em até 8 semanas após o esmagamento nervoso (LUNDBORG; MYERS; POWELL, 1983, apud PACHIONI et al., 2006). Ao longo da primeira semana após axoniotmese há aumento no tamanho dos vasos. Dentro de 6 semanas o número de vasos e sua densidade de área aumenta, sugerindo que a degeneração e regeneração são auxiliadas por respostas vasogênicas que podem estar relacionadas com as necessidades funcional e metabólica dos tecidos (PODHAJSKY e MYERS, 1993).

Diante da lentidão da regeneração nervosa, o principal desafio da clínica é identificar mecanismos que acelerem esse processo e promovam rápida recuperação funcional.

A estimulação elétrica de alta voltagem (EEAV) é pouco explorada na clínica e tem sido investigados seus efeitos regenerativos na cicatrização de úlceras dérmicas (LOW; REED, 2001; DAVINI et al., 2005) e circulatórios (DAVINI et al., 2005).

O estudo de Silva (2008) aponta que a EEAV acelera a recuperação funcional após esmagamento do nervo isquiático, potencializa a maturação das fibras regeneradas e promove diminuição da densidade de área de macrófagos e tecido conjuntivo no nervo, sugerindo aceleração do reparo neural e da eliminação sináptica em ratos.

A hipótese deste estudo é que a EEAV interfere na população de células de Schwann, facilitando a regeneração nervosa. Além disso, acredita-se que apresente efeito vasodilatador, melhorando a nutrição do nervo e contribuindo para o sucesso da regeneração nervosa. Sendo as células de Schwann os principais mediadores da regeneração, avaliar sua população pode indicar o grau de evolução do processo regenerativo no nervo, trazendo subsídios para discussão sobre o uso desse recurso no tratamento de lesões nervosas

periféricas em humanos.

2. Objetivos

Analisar quantitativamente os vasos sanguíneos epineurais e os núcleos de células de Schwann no nervo regenerado após axoniotmese.

3. Desenvolvimento

Vinte ratos Wistar foram divididos nos grupos (n=5): Controle (CON) - sem lesão e sem EEAV; Desnervado (D) - esmagamento do nervo isquiático; Desnervado + EEAV (EEAV) - esmagamento do nervo isquiático e EEAV; SHAM – sem lesão, porém submetido à EEAV (SHAM).

O nervo isquiático dos animais dos grupos D e EEAV foi esmagado (4 pinçamentos de 20 s) após anestesia intramuscular de Ketalar (50 mg/mL) e Rompun (2 g/100 mL), na proporção 1:1, na dose de 0,3 mL/100 g de massa corporal.

O grupo SHAM foi submetido ao mesmo procedimento, porém o nervo foi exposto e mantido intacto.

Utilizou-se o Neurodyn High Volt – ANVISA 10360310008 - IBRAMED®. Sob anestesia a estimulação catódica no limiar motor foi realizada durante 30 minutos (Frequência = 100 Hz; Voltagem = 100 V; duração de pulso = 20 µseg e duração interpulso = 100 µseg), 5 dias/semana, iniciando 24 horas após a lesão. Um eletrodo ativo silicone-carbono (2,0 x 2,0 cm) foi posicionado sobre a cicatriz cirúrgica e outro, dispersivo (4,0 x 4,0 cm) paralelamente ao ativo, com distância de 1 cm entre eles.

Após 21 dias o nervo foi exposto e fixado in situ (fixador de Karnovsky modificado), sendo a porção distal retirada e os animais eutanasiados por deslocamento cervical.

Após fixação (Karnovsky) por 24 h e pós-fixação em tetróxido de ósmio a 1 % em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7.3, por 2 h, os fragmentos do nervo foram imersos em uranila 5 % durante 24 h e desidratados em soluções crescentes de acetona para inclusão em resina Araldite 502 (Electron Microscopy Sciences?).

Cortes transversais de 1 mm foram corados com Azul de Toluidina a 1%, em solução aquosa de bórax a 1% para microscopia de luz. Para análise das células de Schwann, 5 cortes não seriados foram selecionados, sendo 5 campos aleatoriamente considerados em cada um. Utilizou-se um microscópio de luz com ocular reticulada (Carl Zeiss – K 10x/18) calibrada com régua milimetrada (OBJ. MIKRON. 5/17) em objetiva de 100 x para quantificação das células em cada área delimitada pelo retículo (1000 µ² em cada campo, totalizando 5000 µ² em cada corte). A área total por animal foi de 25.000 µ².

Para análise da densidade de área dos vasos epineurais toda a extensão dos 5 cortes foi considerada, utilizando-se o sistema de contagem já descrito, em objetiva de 40 x, considerando-se o total de 3 retículos completos, sendo 2500 µ² em cada campo, totalizando 12500 µ² em cada corte. A área total por animal foi de 62500 µ².

Utilizou-se o teste de Shapiro Wilk para a normalidade dos dados e o teste Anova F - one way seguido do teste post hoc de Tukey, considerando p < 0,05.

4. Resultado e Discussão

Os resultados estão descritos na tabela 1.

Estudos sobre a influência da EEAV na regeneração nervosa periférica são escassos. Silva (2008) relata benefícios desse recurso quando aplicado durante a regeneração nervosa, sendo necessário investigar os mecanismos responsáveis por essa resposta.

Gordon (2010) cita que após axotomia as células de Schwann aumentam a expressão de brain-derived neurotrophic factor (BDNF), bem como de glial-derived neurotrophic factor (GDNF), fatores que favorecem a regeneração axonal. Além disso, a laminina e a fibronectina presentes na membrana basal das células de Schwann aceleram a regeneração e facilitam o crescimento de neuritos (LEE; SCOTT; WOLFE, 2000).

Imediatamente após a lesão as células de Schwann proliferam no segmento distal, formando as bandas de Bungner que direcionam os axônios em regeneração para o órgão alvo (PELLEGRINO et al., 1986) de forma que, nos períodos iniciais da degeneração Walleriana, o número de células de Schwann no interior dos tubos de membrana basal aumenta de 4 a 17 vezes (HIRATA et al., 1995). Os fatores neurotróficos, por sua vez, bloqueiam o crescimento axonal favorecendo conexões funcionais destes com as fibras musculares desnervadas (GORDON; SULAIMAN; BOYD, 2003).

Sendo a relação entre célula de Schwann e axônio no nervo normal de 1:1 (SAID; DUCKETT; SAURON, 1981) e considerando que o número dessas células aumenta durante a regeneração, sendo maior que o de axônios em regeneração; depois de reconstituída a estrutura do nervo esse número deve diminuir. Evidências indicam a morte (apoptose) das células de Schwann in vivo durante a degeneração e regeneração (HIRATA et al., 1998).

A apoptose parece ser, em parte, regulada pela disponibilidade limitada de fatores tróficos derivados dos axônios e representa um

mecanismo pelo qual se estabelece a proporção adequada entre células de Schwann e a mielinização do axônio por elas envolvido (ZORICK; LEMKE, 1996).

A estimulação elétrica após lesão nervosa periférica pode ser benéfica quando aplicada em condições favoráveis (DOW et al., 2004). A associação entre uma breve estimulação elétrica de baixa frequência (20 Hz) de neurônios axotomizados e a presença de fatores neurotróficos acelera o crescimento axonal (GORDON, 2010).

Os efeitos da EEAV sobre a regeneração nervosa são pouco conhecidos. Essa corrente possui um pulso monofásico de 2 picos, com amplitude de pico máximo de até 500 V, duração de pulso de 50 a 200 ms e frequências que variam de 1 até aproximadamente 120 pulsos de 2 picos/segundo. Apresenta a vantagem de ser uma estimulação agradável que atinge fibras nervosas sensoriais, motoras e nociceptivas (ROBINSON; SNYDER-MACKLER, 2001).

Os estimuladores EEAV afetam diretamente o nível celular e efeitos indiretos ocorrem em níveis teciduais, segmentares e sistêmicos. Por possuir polaridade (onda monofásica), podem ser efetivos para conter e absorver edemas, acelerar o reparo de tecidos dérmicos e controlar a dor (LOW; REED, 2001).

Apesar de utilizada na clínica, a EEAV é ainda pouco explorada.

Considerando a importância das células de Schwann para a regeneração nervosa periférica e a constatação de Silva (2008) de que a EEAV acelera a regeneração, investigou-se o comportamento dessas células no nervo regenerado após axoniotmese.

No grupo D o número de células de Schwann foi 2,3 vezes maior que no grupo CON, enquanto no grupo EEAV essa proporção foi de 1,3 e não diferiu do CON. Sendo esses valores identificados nos diferentes grupos 21 dias após a lesão, os resultados reafirmam que a EEAV acelerou o processo de regeneração, pois a recuperação da proporção entre axônios e células de Schwann parece ter sido alcançada, uma vez que o número de células de Schwann no grupo EEAV foi semelhante ao do CON, onde o nervo estava intacto. Os resultados sugerem que a EEAV acelerou a proliferação das células de Schwann, sua ação sobre a regeneração nervosa e, em seguida, a apoptose dessas células, praticamente recuperando a proporção entre células de Schwann e axônios regenerados após esmagamento nervoso.

Retomando a afirmação de Gordon (2010) sobre a possível aceleração do crescimento axonal quando se associa estimulação elétrica de neurônios axotomizados e a presença de fatores neurotróficos, é provável que a EEAV tenha influenciado na regulação de fatores neurotróficos essenciais à regeneração dos neurônios lesados.

Assim, se a EEAV influencia a regulação de fatores neurotróficos favorecendo a regeneração, sua utilização no tratamento das lesões nervosas periféricas poderia modificar a prática clínica, acelerando a recuperação funcional e permitindo ao paciente recuperar as atividades de vida diária e laborais, reduzindo o tempo de afastamento do trabalho e minimizando as consequências funcionais, socioeconômicas e psicossociais. Entretanto, outros estudos são necessários para identificar e quantificar esses fatores durante a regeneração nervosa e exposição à EEAV.

Quanto ao efeito circulatório da EEAV, apesar da afirmação de Román et al. (1987) de que sua ação térmica e eletroquímica favorece o direcionamento de grande densidade de corrente para os tecidos a ela expostos, produzindo também efeitos sobre o sistema vascular devido a contração/relaxamento muscular rítmicos causados pela estimulação no limiar motor, que promove um efeito de bombeamento aumentando o fluxo sanguíneo no músculo e em tecidos vizinhos, o aumento do número e densidade de área de vasos sanguíneos neurais não foi observado neste estudo. É possível que a EEAV tenha provocado modificação na permeabilidade vascular, o que não pôde ser constatado pelas análises realizadas.

5. Considerações Finais

A EEAV acelerou o processo de regeneração, influenciando a proliferação das células de Schwann, favorecendo sua ação sobre a regeneração nervosa e, em seguida, sua apoptose, recuperando a proporção entre células de Schwann e axônios regenerados após axoniotmese.

Nenhum efeito da EEAV foi observado no número e densidade de área de vasos sanguíneos epineurais, sendo possível que a estimulação elétrica tenha provocado alguma modificação na permeabilidade vascular.

Referências Bibliográficas

- BURNETT MG, ZAGER EL. Pathophysiology of peripheral nerve injury: a brief review. *Neurosurg Focus* 2004; 16 (5): 1-7.
- DAVINI R, NUNES CV, GUIRRO ECO E GUIRRO RRJ. High-voltage electrical stimulation: a treatment option. *Braz J Phys Ther* 2005; 9 (3): 249-256.
- DOW DE, CEDERNA PS, HASSETT CA, KOSTROMINOVA TY, FAULKNER JA, DENNIS RG. Number of contractions to maintain mass and force of a denervated rat muscle. *Muscle & Nerve* 2004; 30(1): 77-86
- FAWCETT JW, KEYNES RJ. Peripheral nerve regeneration. *Ann Rev Neurosci* 1990; 13: 43-60.
- GORDON T. The Physiology of neural injury and regeneration: The role of neurotrophic factors. *J Com Dis* 2010; 43: 265-273.
- GORDON T, SULAIMAN OAR, BOYD JG. Experimental strategies to promote functional recovery after peripheral nerve injuries. *J*

Peripher Nerv Syst 2003; 8: 236-250.

HIRATA H, HIBASAMI H, HINENO T, et al. Role of ornithine descarboxylase in proliferation of Schwann cells during wallerian degeneration and its enhancement by nerve expansion. Muscle & Nerve 1995; 18: 1341-1343.

HIRATA H, HIBASAMI H, YOSHIDA T, MORITA A, OHKAYA S, MATSUMOTO M, SASAKI H, UCHIDA A. Differentiation and apoptosis without DNA fragmentation in cultured Schwann cells derived from wallerian-degenerated nerve. Apoptosis 1998; 3: 353-360.

IDE C. Peripheral nerve regeneration. Neurosci Res. 1996; 25: 101-12.

LEE SK, SCOTT W, WOLFE SW. Peripheral nerve injury and repair. J Am Acad Orthop Surg 2000; 8: 243-252.

LOW J, REED A. Eletroterapia explicada: princípios e prática. Manole: São Paulo; 2001.

LUNDBORG G, MYERS R, POWELL H. Nerve compression injury and increased endoneurial fluid pressure a "miniature compartment syndrome" J Neurol Neurosurg Psychiatry 1983; 46: 1119-24.

PACHIONI C, MAZZER N, BARBIERI C, FAZAN V, PADOVANI, et al. Lesão por esmagamento do nervo isquiático de ratos, estudo da vascularização. Acta Orthop Bras 2006; 14 (4).

PELLEGRINO RG, POLITIS MJ, RITCHIE LM, et al. Events in degenerating cat peripheral nerve: Induction of Schwann cells S phase and its relation to nerve fiber degeneration. J Neurocytol 1986; 15: 17-28.

PODHAJSKY RJ, MYERS RR. The vascular response to nerve crush: relationship to Wallerian degeneration and regeneration. Brain Res 1993; 623: 117-23.

ROBINSON AJ, SNYDER-MACKLER L. Eletrofisiologia Clínica – Eletroterapia e teste eletrofisiológico. 2ª ed. Artmed: Porto Alegre; 2001

ROMÁN GC, STRAHLENDORF HK, COATES PW, ROWLEY BA. Stimulation of sciatic nerve regeneration in the adult rat by low-intensity electric current. Exp Neurol 1987; 98: 222-232.

SAID G, DUCKETT S, SAURON B. Proliferation of Schwann cells in tellurium-induced demyelination in young rats. A radioautographic and teased nerve fiber study. Acta Neuropathol 1981; 53(3): 173-179.

SILVA AM. Análise quantitativa de axônios regenerados após esmagamento do nervo isquiático e estimulação elétrica de alta voltagem. 6º Congresso de Pós graduação no contexto da 6ª Mostra Acadêmica da Unimep, 2008.

STOLL G, MULLER HW. Nerve injury, axonal degeneration and neural regeneration: basic insights. Brain Pathol 1999; 9(2): 313-325.

ZORICK TS, LEMKE G. Schwann cell differentiation. Curr Opin Cell Biol 1996; 8: 870-876.

Anexos

Tabela 1: Valores médios \pm DP do número de células de Schwann, número e densidade de área de vasos sanguíneos no nervo isquiático dos animais dos grupos: CON (Controle); D (Desnervado); EEAV (Desnervado + Eletroestimulado) e SHAM (Sham).

Grupos	Nº Céls. Schwann	Nº Vasos	Dens. Área Vasos
CON	163,80 \pm 25,97	4,94 \pm 0,77	0,48 \pm 0,06
D	382,60 \pm 185,19 *	4,62 \pm 2,51	0,50 \pm 0,18
EEAV	214,20 \pm 73,00	3,38 \pm 1,89	0,30 \pm 0,17
SHAM	245,20 \pm 125,04	3,93 \pm 1,06	0,30 \pm 0,07

(*) Difere do CON ($p = 0,04$).