

Avaliação funcional da marcha do rato após estimulação elétrica do músculo gastrocnêmio desnervado

Functional evaluation from rat's ambulation after electrical stimulation of the gastrocnemius muscle denervated

Tiago Souza dos Santos¹, Édison Sanfêlice André²

RESUMO

Objetivos. Avaliar algumas das características funcionais da marcha do rato após a estimulação elétrica (EE) do músculo gastrocnêmio desnervado. Métodos: 30 animais foram divididos aleatoriamente em três grupos de dez – cinco experimentais (GE) e cinco controle (GC) e submetidos ao mesmo protocolo de estimulação (GC, aparelho desligado). Os três grupos diferiram entre si somente quanto ao momento de tratamento após a lesão nervosa: o grupo 1 (G1), do 1º ao 7º dia; G2, do 8º ao 14º e o G3, do 15º ao 21º. Resultados. A EE prejudicou a regeneração do nervo ciático dos animais tratados durante a segunda e a terceira semana após a lesão nervosa; enquanto, nos animais tratados na primeira semana, a evolução funcional foi semelhante à apresentada pelos animais falso tratados. Conclusão. Os efeitos funcionais da EE do músculo desnervado do rato dependem do momento de tratamento pós-lesão. A EE quando aplicada tardiamente, após sete dias, mostrou-se prejudicial à regeneração do nervo ciático, enquanto, quando aplicada agudamente, 24 após a lesão nervosa, não provocou efeitos negativos, todavia, a evolução positiva dos dados dos animais tratados não foi diferente da demonstrada pelos animais falso tratados, talvez, por necessitar de um período maior de tratamento.

Unitermos: Avaliação, Regeneração Nervosa, Nervo Ciático.

Citação: Santos TS, André ES. Avaliação funcional da marcha do rato após estimulação elétrica do músculo gastrocnêmio desnervado.

Trabalho realizado no Laboratório de Fisioterapia Neurológica Experimental da Universidade Regional de Blumenau – FURB.

1. Fisioterapeuta, mestrando em Neurociências pela Universidade Federal de Santa Catarina.

2. Fisioterapeuta, Doutor em Neurociências pela UNIFESP, Professor do Curso de Fisioterapia, FURB.

SUMMARY

Objective. To evaluate some functional characteristics from rat's ambulation after electrical stimulation (ES) of the denervated gastrocnemius. Method. Animals (n=30) were randomly divided in three groups of ten – five experimental and five controls. They were submitted to the same protocol, although on the control group the equipment was turned off. The groups were different only at the timing that the protocol has started, group 1 (G1), from 1st to 7th day; G2, from 8th to 14th, and G3, from 15th to 21st. Results. ES harmed the regeneration of the sciatic nerve of the animals treated during the 2nd and 3rd week after the nervous injury; whereas the animals treated in the 1st week, the functional evolution was similar to the presented one by the animals false treated. Conclusion. The functional effect of the ES of the denervated muscle of rats depends on the treatment moment after-injury. The ES when delayed applied, after seven days, revealed itself harmful to the regeneration of the sciatic nerve. While when applied acutely 24 hours after the nervous injury did not provoke negative effect, however, the positive evolution of the data of the treated animals was not different of the demonstrated one by the animals false treated, perhaps, for needing a bigger period of treatment.

Keywords: Evaluation, Nerve Regeneration, Sciatic Nerve.

Citation: Santos TS, André ES. Functional evaluation from rat's ambulation after electrical stimulation of the gastrocnemius muscle denervated.

Endereço para correspondência:

Tiago Souza dos Santos
Rua Dep Antônio Edu Vieira, 1822
Florianópolis-SC, CEP 88040-000
E-mail: santos.ts@hotmail.com

Recebido em: 22/11/06
Revisão: 23/11/06 a 28/05/07
Aceito em: 29/05/07
Conflito de interesses: não

INTRODUÇÃO

A necessidade constante de aprimoramento humano e tecnológico inerente ao tratamento das lesões do nervo periférico, fomenta a busca de milhares de pesquisadores a respostas esclarecedoras e a novas perspectivas quanto à recuperação satisfatória do paciente.

A resposta neuronal e regeneração axonal implicam em interações complexas entre diversos tipos celulares e mudanças na expressão de diferentes tipos de moléculas. Muitos modelos experimentais têm sido usados para conjugar conhecimentos sobre regeneração nervosa e o desenvolvimento de estratégias que promovam a recuperação^{1,2}.

Particularmente, às pesquisas referentes ao uso da estimulação elétrica (EE), um considerável número de estudos concerne à estimulação por corrente elétrica direta ao nervo lesado, seja através de eletrodos percutâneos³, ou então com dispositivos geradores de corrente elétrica implantáveis^{4,5}, tendo como objetivo principal, encontrar na própria fibra nervosa respostas à sua recuperação.

Pelo fato de muitas pesquisas apontarem que as mudanças degenerativas do músculo desnervado resultam das cessações dos padrões normais de uso da célula muscular, e na dependência da célula nervosa lesada ao novo padrão de atividade pós-lesão, a EE do músculo desnervado para aumentar a atividade muscular, tem sido examinada nos estudos clínicos e laboratoriais para determinar se tal ativação pode prevenir ou retardar os efeitos degradativos da desnervação.

MÉTODO

A amostra foi composta por 30 ratos Wistar adultos machos (pesando entre 300 e 400g), fornecidos pelo biotério central da Universidade Regional de Blumenau (FURB) e alojados em gaiolas individuais colocadas em ambiente com temperatura controlada (~ 22° C), ciclo claro-escuro de 12h (07h00-19h00 – claro sob luz artificial) e receberam água e alimentação (ração para roedores Purina®) livremente.

Os animais foram submetidos ao treino na pista de caminhada, nos dez dias antecedentes ao procedimento cirúrgico, de modo acostumar os animais à pista e facilitar a aquisição dos dados.

O procedimento cirúrgico foi conduzido no intuito de produzir uma lesão nervosa por esmagamento do nervo ciático através do uso de uma pinça hemostática por 30 segundos⁶, e respeitou os preceitos éticos postulados pelo COBEA⁷ e o protocolo

utilizado foi aprovado junto ao Comitê de Ética em Experimentação Animal da FURB (CEEAA/FURB) sob o n° 004/06.

Os animais foram divididos aleatoriamente em três grupos de dez animais (G1, G2, G3), cada um com cinco ratos no grupo experimental (GE) e cinco no grupo controle (GC). Os três grupos diferenciaram-se somente quanto à semana específica em que foram submetidos à EE: o G1 do 1° ao 7° dia, o G2 do 8° ao 14° e o G3 do 15° ao 21° após a desnervação. Os grupos foram tratados diariamente entre as 14h00min e as 17h00min; tratou-se de seguir uma seqüência de estimulação entre os animais (animal 1, 2, 3, 4 e 5) de modo a padronizar o horário diário em que cada animal foi estimulado.

Os animais foram sedados com o emprego de 0,05ml/100g de Diazepan®, e depois de detectado o nível de sedação desejada foram contidos através de dispositivo contensor⁸; a pata experimental foi amarrada com um atilho a uma das extremidades da base, de modo a evitar que o animal a retirasse em reação ao estímulo elétrico.

A EE foi realizada com o aparelho Neurograph (nome comercial), da marca KLD Biosistemas, liberando uma corrente direta monofásica quadrática, com 1s de duração de pulso e 2s de repouso ao decorrer de 15 minutos diariamente durante sete dias. A amplitude da corrente oscilou entre 2 e 3 miliâmpères variando conforme a resposta de cada animal, mas de modo a produzir uma contração muscular semelhante em todos. Os animais do GC foram submetidos a todos os procedimentos empregados no GE, entretanto o aparelho encontrava-se desligado.

Coleta e Análise dos dados

Os animais foram avaliados por meio de uma pista de caminhada (42 x 8,5 x 9,0 cm), com uma câmara escura ao final, onde foram estimulados a caminhar e filmados.

A digitalização da deambulação dos animais foi obtida através do posicionamento de uma filmadora da marca Minolta® acoplada a um microcomputador a um metro de distância da pista. As filmagens continham imagens da deambulação dos ratos na pista, em perfil e através de um espelho colocado embaixo da pista num ângulo em 45° de inclinação para a obtenção das imagens da face plantar da pata do animal. As aquisições dessas imagens foram realizadas 24h, 7, 14 e 21 dias após a lesão nervosa.

Posteriormente através do programa “Pinnacle Studio” (versão 9.0), as filmagens foram armazenadas e escrutinadas, de onde foram isolados diversos quadros contendo o momento necessário para a análise dos dados. Estes dados continham a imagem da face plantar da pata do animal no momento do apoio intermediário, tanto da pata esquerda quanto da pata direita traseiras em seu percurso na pista.

Os quadros de interesse foram exportados para o programa “Image j” (versão 1.30, National Institute of Health, 2003) de onde foram feitas as mensurações das variáveis para o cálculo de índice funcional do ciático (IFC)9-11 que quantifica o nível de recuperação funcional. Tratando-se de uma fórmula matemática $[SFI = -38.3 (EPL - NPL/NPL) + 109,5.5 (ETS - NTS/NTS) + 13.3 (EIT - NIT/NIT) - 8,8]$ que analisa comparativamente a pata normal com a pata que sofre do experimento. O resultado do cálculo é o índice de função do ciático, que é expresso em porcentagem de déficit funcional. Assim, valores próximos e acima de zero são indicadores de valores próximos do normal. Valores mais distantes de zero, indicam perdas funcionais proporcionais.

Desta forma os quadros de imagens selecionados nas filmagens forneceram os valores de comprimento da pata normal ou NPL, comprimento da pata experimental ou EPL; largura da pata (espalhamento do 1° ao 5° artelho) normal ou NTS e da pata experimental ou EPS; largura intermediária (espalhamento do 2° ao 4° artelho) tanto da pata normal NIT como da pata experimental EIT.

A análise estatística dos dados foi processada através da ANOVA (análise de variância) de uma via, para a obtenção dos dados estatísticos do IFC. Foi utilizado o programa Statistica, versão 5.5 (Stasoft Inc., 1999), com o índice de significância de $p < 0,05$.

RESULTADOS

Os dados foram colhidos em 21 dias, contando de quatro avaliações que se procederam nos seguintes momentos: 24h, no 7°, no 14° e no 21° dia pós-lesão. Os animais experimentais e controle de cada grupo foram comparados. Os resultados obtidos com o primeiro grupo foram os seguintes (Figura 1), comparando os índices obtidos na avaliação do primeiro dia com os valores alcançados na última avaliação realizada no 21° dia de experimento, ambas as trajetórias retratam a melhora das variáveis analisadas pelo IFC como indicadores do processo de regeneração nervosa. No entanto, nas quatro análises realizadas, estatisticamente nenhum grupo se destacou.

O rendimento apresentado pelos grupos, GE 2 e GC 2, há primeira análise, demonstra-se estatisticamente semelhante, com esta equivalência mantendo-se ainda na segunda e terceira análise, realizadas respectivamente no dia 7 e no dia 14 após a desnervação (Figura 2). A última semana de tratamento espelhada no gráfico demonstra a progressão inversa dos rendimentos obtidos pelos diferentes grupos tratados. Enquanto os resultados alcançados pelos animais controle progredem de forma crescente, o grupo dos animais estimulados eletricamente, apresenta dados negativos em relação à avaliação anterior. Tal discrepância entre os grupos fica exposta na última análise, onde a diferença entre os dois grupos é estatisticamente significativa $[F(1,8) = 12,37; p < 0,007]$.

Comparando as análises da primeira semana, dia 1 e dia 7, nota-se evolução de ambos os grupos estudados (Figura 3). Comparando a segunda com a terceira análise, os valores alcançados pelos grupos estudados apresentam pequena variação. Já na quarta análise ocorrida no 21° dia, a diferença entre os dois grupos foi comprovada estatisticamente $[F(5,24) = 8,99; p < 0,00006]$, apresentando os animais controle, melhores resultados quando comparados aos resultados da análise anterior, e com a evolução quase nula obtida pelos animais experimentais.

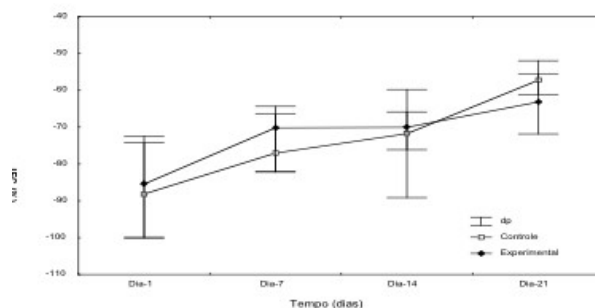


Figura 1. Evolução do IFC dos animais estimulados na primeira semana (de 24h ao 7° dia pós-lesão) pós-axiotmese do nervo ciático direito.

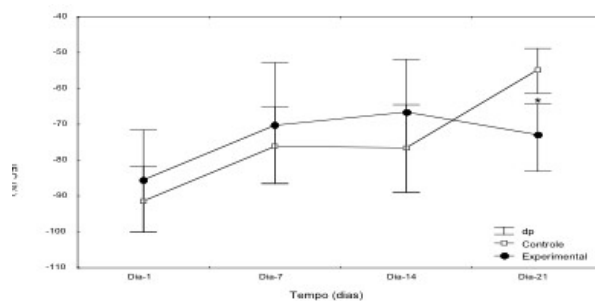


Figura 2. Evolução do IFC dos animais estimulados na segunda semana (do 7° ao 14° dia) pós-axiotmese do nervo ciático direito ($p < 0,007$).

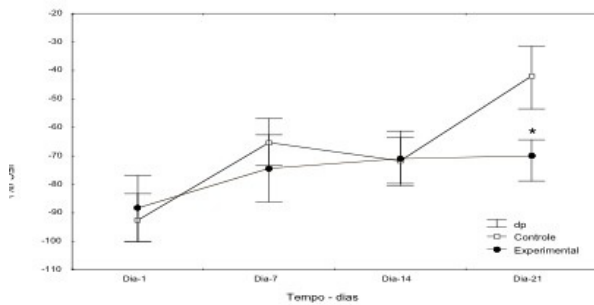


Figura 3. Evolução do IFC dos animais estimulados na terceira semana (do 14º ao 21º dia) pós-axionotmese do nervo ciático direito ($p < 0,00006$).

DISCUSSÃO

A análise do IFC apontou efeitos negativos ao processo de reinervação muscular evidenciado pelo menor rendimento funcional dos animais que receberam a EE em comparação aos animais falso tratados dependendo da semana em que os animais eram tratados eletricamente. A leitura de nossos resultados nos permite inferir que a EE, sob os protocolos empregados, provocou efeitos deletérios à regeneração do nervo ciático do rato quando os animais foram tratados pela EE durante a segunda e a terceira semana pós axionotmese; enquanto que os animais tratados eletricamente durante a primeira semana, apresentaram dados evolutivos que sugerem a regeneração nervosa, semelhante aos dados demonstrados pelos animais falso tratados.

Cole e Gardiner¹², estimulando eletricamente a musculatura desnervada do rato por oito semanas, observaram que a massa muscular e a resistência à fadiga apresentaram evolução já na segunda semana; pelo fato da reinervação neste modelo animal ocorrer aproximadamente em três semanas, ficou evidente que o trabalho de contração muscular diária imposta pela EE, independente da inervação, desempenhou um papel importante na atenuação das alterações deletérias decorrentes da desnervação.

Williams^{4,5} encontrou através de estudos histológicos e eletromiografia, resultados positivos tanto quanto a regeneração do nervo periférico lesado, como do desempenho funcional do músculo reinervado após um longo período de EE através de geradores de corrente elétrica implantados.

A resposta neuronal e regeneração axonal implicam em interações complexas entre diversos tipos celulares e mudanças na expressão de diferentes tipos de moléculas¹. Diversos são os mecanismos admitidos como participantes e até mesmo promotores do processo de regeneração nervosa. O que já se conhece, é a dependência do tecido neural à liberação de fatores

por parte do organismo por ele inervado, estando a manutenção e sobrevivência das células nervosas sujeitas às manifestações que acometem o alvo neuronal e ao papel desempenhado por estes fatores¹³⁻¹⁵.

Funakoshi et al.¹⁶ encontraram resultados que atestam o fato da dependência neuronal à fibra muscular por ela inervada. Analisando a quantidade de NT-4, proteína membro da família das neurotrofinas, após o bloqueio da transmissão neuromuscular pelo emprego da alfa-bungarotoxina, uma antagonista da ACh na JNM, estes pesquisadores observaram que em 40 horas após paralisia parcial da musculatura tratada, os níveis de RNAm NT-4 estavam diminuídos 20 vezes o valor encontrado no grupo controle. Eles alegaram que a expressão desta proteína possa ser controlada pela ação do neurotransmissor na célula pós-sináptica.

Estes autores também investigaram a interferência da atividade muscular produzida pela EE nervosa e encontraram dados alentadores em relação a esta técnica, demonstrando o aumento de até cinco a sete vezes da expressão de RNAm NT-4 após 12 horas de EE, e apontaram os efeitos terapêuticos desta proteína, como o seu emprego em casos de esclerose lateral amiotrófica.

A existência de fatores neurotróficos alvo-derivados é tida como essencial para sobrevivência, manutenção, diferenciação e regeneração de vários tipos de células neuronais tanto para o desenvolvimento do SN como para o reparo da lesão nervosa^{17,18}. O que os trabalhos mais detalhados têm demonstrado é a responsividade destas moléculas à variável “tempo”¹⁹.

Foi pensando nisso que se primou por um esquema experimental que permitisse relacionar os resultados funcionais obtidos pelos diferentes grupos experimentais aos específicos momentos em que eles fossem tratados.

Estudos em nosso laboratório, com o emprego de laser de baixa potência^{20,21} demonstraram que a regeneração nervosa ocorre também, apesar de nenhuma intervenção e de forma natural (ainda que mais lenta), nos animais falso tratados. Tal observação também foi constatada no presente trabalho.

Quando os animais são estimulados na primeira semana, os resultados funcionais dos animais experimentais em todas as avaliações são semelhantes aos do grupo controle, evidenciado em ambos a evolução positiva das características analisadas. No entanto, quando os animais são estimulados nas semanas seguintes, na segunda e na terceira semana após a lesão nervosa, os animais que receberam a EE demonstraram resultados funcionais abaixo daque-

les alcançados pelos animais falso tratados, evidenciando o caráter prejudicial da EE quando aplicada nestes momentos específicos. Isto denota que os efeitos da EE, são dependentes do momento pós-lesão nervosa em que ela é aplicada.

Estudos em andamento do nosso laboratório investigam os efeitos funcionais da EE do músculo desnervado frente a protocolos de tratamento mais prolongados (14 e 21 dias), iniciados no dia seguinte a lesão nervosa.

A reciprocidade entre as células pré e pós-sináptica foi estudada por Xie et al.²² na junção neuromuscular (JNM) do *Xenopus*. Eles investigaram a expressão de neurotrofinas atividade-dependente na célula muscular e seu papel no desenvolvimento da JNM. A despolarização da membrana eliciada pela EE da fibra muscular rapidamente e especialmente aumentou os níveis de RNAm NT-3, ocasionado pelo aumento da expressão de ACh. A repetida estimulação aumentou os níveis de RNAm NT3 na cultura ao segundo e terceiro dia o que não aconteceu no sexto e no sétimo dia de estimulação, sugerindo que os efeitos da despolarização dependem do estágio do desenvolvimento em que se encontra a placa motora.

O número de receptores de ACh na membrana da fibra pós-sináptica afeta a eficiência da JNM. Seguinte a desnervação, o número desses receptores permanece normal na JNM do músculo sóleo do rato por 20 dias, então cai 50% e mais 30% do nível normal durante os próximos 10 e 40 dias, respectivamente. A inativação do músculo pelo tratamento nervoso por tetrodotoxina ou toxina botulínica causa queda similar²³.

A EE muscular, iniciada no dia da desnervação previne esta queda por até 60 dias, mas não têm efeito se começar depois de passados 10 dias da lesão nervosa²⁴.

CONCLUSÃO

Os efeitos funcionais da EE do músculo desnervado do rato dependem do momento de tratamento pós-lesão. A EE quando aplicada tardiamente, após sete dias, mostrou-se prejudicial à regeneração do nervo ciático, enquanto, quando aplicada agudamente, 24 após a lesão nervosa, não provocou efeitos negativos, todavia, a evolução positiva dos dados dos animais tratados não foi diferente da demonstrada pelos animais falso tratados, talvez, por necessitar de um período maior de tratamento.

Agradecimentos

A Daniel Doering, Jairo A Stiz e Grasielle Lana.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Rodriguez EJ, Valero-Cabré A, Navarro X. Regeneration and functional recovery following peripheral nerve injury. *Perip Nerv Syst Dis* 2004;1(2):177-185.
- Mcdevitt L, Fortner P, Pomeranz B. Application of weak electric field to the hind paw enhances sciatic motor nerve regeneration in adult rat. *Brain Res* 1987;416:308-314.
- Mendonça AC, Barbieri CH, Mazzer N. Directly applied low intensity direct electric current enhances peripheral nerve regeneration in rats. *J Neurosci Meth* 2003;129:183-190.
- Williams HB. The value of continuous electrical muscle stimulation using a completely implantable system in the preservation of muscle function following motor nerve injury and repair: an experimental study. *Microsurgery* 1996; 17(11):589-596.
- Williams HB. A clinic pilot study to assess functional return following continuous muscle stimulation after nerve injury and repair in the upper extremity using a completely implantable electrical system. *Microsurgery* 1996;17(11):597-605.
- Bridge PM, Ball DJ, Mackinnon SE, Nakao Y, Brandt K, Hunter DA, et al. Nerve crush injuries – a model for axoniotmesis. *Exp Neurol* 1994;127: 284-290.
- Schnaider TB, Souza C. Aspectos éticos da experimentação animal. *Rev Bras Anestesiol* 2003;53(2):278-285.
- Krinke GJ. The laboratory rat, the hand book of experimental animals. London: Academic Press, 2000, 756p.
- de Medinacelli L, Freed W, Wyatt R. An index of the functional condition of sciatic nerve based measurements made from walking tracks. *Exp Neurol* 1982;77:6634-6643.
- Bervar M. Video analysis of standing – an alternative footprint analysis to asses' functional loss following injury to the rat sciatic nerve. *J Neurosci Meth* 2000;103:109-116.
- Varejão ASP, Meek MF, Ferreira AJA, Patrício JAB, Cabrita AMS. Functional evaluation of peripheral nerve regeneration in the rat: walking track analysis. *J Neurosci Meth* 2001; 108:1-9.
- Cole BG, Gardiner PF. Does electrical stimulation of denervated muscle, continued after reinnervation influences recovery of contractile function? *Exp Neurol* 1984;85:52-62.
- Moody WJ, Bosma MM. Ion channel development, spontaneous activity, and activity-dependent development in nerve and muscle cells. *Physiol Rev* 2005;85:883-941.
- Glebova NO, Ginty DD. Growth and survival signals controlling sympathetic nervous system development. *Annu Rev Neurosci* 2005;28:191-222.
- Jerregard H, Nyberg T, Hildebrand C. Sorting of regenerating rat sciatic nerve fiber with target-derived molecules. *Exp Neurol* 2001;169:298-306.
- Funakoshi H, Belluardo N, Arenas E, Yamamoto Y, Casabona A, Persson H, et al. Muscle-derived neurotrophin-4 as an activity-dependent trophic signal for adult motor neurons. *Science* 1995;268:1495-1499.
- Wang X-H, Poo M-M. Potentiation of developing synapses by postsynaptic release of neurotrophin-4. *Neuron* 1997;19:825-835.
- Wang T, Xie K, Lu B. Neurotrophins promote maturation of developing neuromuscular synapses. *J Neurosci* 1995;15(7):4796-4805.
- Oppenheim RW. Cell death during development of nervous system. *Annu Rev Neurosci* 1991;14:453-501.
- Hoeller AA, André ES. Efeitos do laser de baixa intensidade HeNe sobre a atividade eletrográfica do músculo gastrocnêmio de ratos *Wistar* submetidos à lesão do nervo ciático. *Fisiot Brasil* 2007;8(2):33-41.
- Buerger C, Silva ES, Imme JL, André ES. Efeitos da laserterapia de baixa potência sobre os processos de regeneração do tecido nervoso periférico. *Fisiot Mov* 2004;17(2):67-74.
- Xie K, Wang T, Olafsson P, Mizuno K, Lu B. Activity-dependent expression of NT-3 in muscle cells in culture: implications in the development of neuromuscular junctions. *J Neurosci* 1997;17(9):2947-2958.
- Lomo, T. What Controls the Position, Number, Size, and Distribution of Neuromuscular Junctions on Rat Muscle Fibers? *J Neurocytol* 2003;32:835-848.
- Andreose JS, Fumagalli G, Lomo T. Number of junction acetylcholine receptors: control by neural and muscular influences in the rat. *J Physiol* 1995;483(2):397-406.