

**UNIVERSIDADE METODISTA DE PIRACICABA – UNIMEP**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOTERAPIA**

**ESTUDO HISTOQUÍMICO, BIOQUÍMICO E MORFOMÉTRICO DO MÚSCULO  
EXTENSOR LONGO DOS DEDOS DE RATOS DENERVADO E ELETROESTIMULADO**

**MESTRANDA:** Andréa Simoni Cancelieri

**ORIENTADORA:** Prof. Dra. Rosana Macher Teodori

**PIRACICABA - SP**

**2005**

**UNIVERSIDADE METODISTA DE PIRACICABA – UNIMEP**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOTERAPIA**

**ESTUDO HISTOQUÍMICO, BIOQUÍMICO E MORFOMÉTRICO DO**  
**MÚSCULO EXTENSOR LONGO DOS DEDOS DE RATOS DENERVADO**  
**E ELETROESTIMULADO.**

**Andrea Simoni Cancelieri**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Fisioterapia da Universidade Metodista de Piracicaba, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Fisioterapia na área de Plasticidade Neuromuscular.

PIRACICABA - SP  
2005

À Corina Parsia e Hélio Simoni: grandes amores de minha vida...

*Aos meus pais, Roberto e Renata, por me  
amarem incondicionalmente e estarem presentes  
em toda a jornada, não me deixando sair do  
caminho.*

*Ao Raphael, meu amigo e companheiro, sempre  
presente em todos os momentos.*

## AGRADECIMENTOS

- Ao Instituto de Biologia da UNICAMP, permitindo o desenvolvimento das técnicas de análise, em especial ao Prof. Dr. Gerson Eduardo Ribeiro de Campos e ao técnico de laboratório Marco Aurélio R. de Paula;
- Aos alunos de iniciação científica Vinícius Fornasari Pinto e Carolina Bernardes Fuentes, por estarem sempre disponíveis e responsáveis durante o trabalho;
- Aos Fisioterapeutas Renato Ferretti, Roberta Vianna e Fernando Pucciareli Jr., pelo árduo trabalho e dedicação aos experimentos;
- À Ms. Kenny Carla Brentani Gomes Fernandes, que caminhou comigo lado-a-lado durante 2 anos;
- Às técnicas de Laboratório Maria Cristina de A. P. Ribeiro e Patrícia Carla P. Belotto, por me auxiliarem durante todo o tempo de pesquisa;
- Às minhas crianças, por serem sempre pacientes nos meus momentos difíceis;
- Ao Centro de Reabilitação Piracicaba por me proporcionar a realização de um sonho;
- Às amigas de trabalho, que durante todo o curso dispuseram ajuda em todos os sentidos;
- À Deus acima de tudo.

## RESUMO

A denervação causa alterações nas características estruturais e metabólicas do músculo, promovendo transição fenotípica das fibras, com respectiva alteração nas cadeias pesadas de miosina, além de atrofia e acúmulo de tecido conjuntivo. A eletroestimulação é método eficaz para a preservação das condições metabólicas do músculo denervado até que a reinervação aconteça. No entanto, ainda não está clara a influência da eletroestimulação fásica de baixa frequência no tratamento de músculos rápidos denervados. Este estudo investigou as características fenotípicas, bioquímicas e morfométricas do músculo extensor longo dos dedos (EDL) de ratos denervados submetidos à eletroestimulação fásica de baixa frequência. Ratos Wistar (n=18), com 6 semanas, peso médio de  $190 \pm 24$ g, foram divididos em 3 grupos (n=6). O grupo 1 (EE) teve o nervo isquiático esquerdo esmagado e o músculo EDL eletroestimulado por 20 dias (30 min/dia), iniciada 24 hs após a lesão. O padrão de eletroestimulação foi: f= 50 Hz, T=3ms e i=5mA, acrescido de 1 mA a cada 10 minutos e Ton/Toff= 4 segundos. O grupo 2 (NEE) teve o nervo isquiático esmagado e o músculo EDL não foi eletroestimulado. O grupo 3 (CON) não sofreu qualquer tipo de intervenção. Após 21 dias, o músculo EDL foi retirado e congelado, obtendo-se cortes transversais para análise histoquímica, bioquímica e morfométrica. A análise estatística utilizou o teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni para a análise da porcentagem dos tipos de fibras e área de secção transversa individual; o teste de Kolmogorov-Smirnov, seguido do ANOVA-teste f e Tukey HSD foi utilizado para a análise das áreas de secção transversa por grupo e densidade de área dos tecidos muscular e conjuntivo. A reação histoquímica mostrou transição fenotípica em ambos os grupos denervados, principalmente com relação às fibras IIB, IIBD e IIA ( $p=0,00$ ), e que a eletroestimulação não minimizou tal transição. A análise bioquímica mostrou diminuição da miosina tipo IIb e aumento das miosinas tipo IIc, IIa e I, evidenciando que a denervação promoveu transição das cadeias pesadas de miosina, de rápida para lenta e em abordagem qualitativa, não houve diferença entre as concentrações de miosina tipo IIb, IIc, IIa e I nos grupos EE e NEE, sugerindo que a eletroestimulação não influenciou a transição das cadeias de miosina. A análise morfométrica apontou que quando considerada a área de secção transversa por tipo de fibra, as fibras IIB, IIBD e IID do grupo NEE diferem do CON ( $p=0,00$ ) e que quando considerada por grupo, o grupo EE diferiu do NEE ( $p=0,00$ ), apesar da densidade de área do tecido conjuntivo e muscular não ser diferente entre os grupos ( $p=0,14$ ). Considera-se que o protocolo de eletroestimulação aplicado ao músculo EDL foi efetivo no sentido de minimizar a atrofia pós-denervação, não influenciando seu perfil fenotípico e bioquímico, bem como na proliferação conjuntiva. Sugere-se a necessidade de investigações futuras sobre o papel da regeneração nervosa, o que pode interferir com a recuperação funcional após lesão.

**Palavras-chave:** denervação, eletroestimulação, perfil fenotípico, perfil bioquímico, morfometria, músculo extensor longo dos dedos.

## ABSTRACT

Denervation causes not only changes in the structural and metabolic features of the muscle, leading to fibers phenotypic transition along with myosin heavy chain alteration, but connective tissue accumulation and atrophy as well. The electrical stimulation is an effective method to preserve denervated muscle metabolic conditions until reinnervation happens. However, it's not totally evident the influence of low-frequency phased electrical stimulation in fast denervated muscles. This study examined the phenotypical, biochemical and morphometric features of the extensor digitorum longus (EDL) of denervated rat submitted to low frequency-phased electrical stimulation. 6-weeks Wistar rat (n=18), average weight  $190 \pm 24$ g, were divided into 3 groups (n=6). Group 1 (EE) had the left sciatic nerve crushed and the EDL muscle electrically stimulated for 20 days (30 min/day), started 24hs after injury. The electrical stimulation pattern was:  $f = 50$  Hz,  $T = 3$  ms and  $i = 5$  mA, added by 1 mA every 10 minutes and  $T_{on/off} = 4$  seconds. Group 2 (NEE) had the sciatic nerve crushed and the EDL muscle wasn't electrically stimulated. Group 3 (CON) hasn't suffered any kind of intervention. After 21 days, the EDL muscle was removed and frozen, by getting cross-cuts for histochemical, biochemical and morphometric analysis. The statistical analysis used the Kruskal-Wallis test, followed by Bonferroni's multiple comparison to analyse fiber type's percentage and single cross sectional area; the Kolmogorov-Smirnov test, followed by ANOVA-test f and Tukey HSD were used to verify cross sectional area per group and the area density of the muscular and connective tissue. The histochemical reaction showed phenotypic transition in both denervated groups, mainly in relation to IIB, IIBD and IIA fibers ( $p=0,00$ ), and that electrical stimulation hasn't minimized such transition. The biochemical analysis showed decrease of IIB myosin type and increase of IID myosin type plus IIA and I, enhancing that denervation promoted transition of the myosin heavy chains, from fast to slow, and in qualitative approach, there was no difference among myosin concentrations of type IIB, IID, IIA and I in groups EE and NEE, suggesting that electrical stimulation hasn't influenced the myosin chains transition. The morphometric analysis showed that when taken into account the cross-section area per fiber type, fibers IIB, IIBD and IID from group NEE differ from CON group ( $p=0,00$ ), and on the other hand, when considered per group, the group EE differed from NEE ( $p=0,00$ ), despite the area density of the muscular and connective tissue not to be different among the groups ( $p=0,14$ ). It's considered that the electrical stimulation applied to the EDL muscle was effective in the sense of minimization of atrophy, not influencing its phenotypic and chemical profile, but in the connective proliferation as well. Further research about the role of nerve regeneration is suggested, what may interfere in with the function recovery after injury.

**Key-words:** denervation, electrical stimulation, phenotypic profile, biochemical profile, morphometry, extensor digitorum longus.

**LISTA DE TABELAS**

Páginas

Tabela 1: Porcentagem dos tipos de fibras nos grupos experimentais: CON (controle), EE (eletroestimulado) e NEE (não eletroestimulado) (n=6;  $p<0,05$ )..... 28

Tabela 2: Valores da área média de secção transversa ( $\mu\text{m}^2$ ) dos diferente tipos de fibras do músculo EDL nos grupos experimentais: CON (controle), EE (eletroestimulado) e NEE (não eletroestimulado) (n=6;  $p<0,05$ )..... 30

## LISTA DE FIGURAS

Páginas

Figura 1A: Procedimento cirúrgico para esmagamento do nervo isquiático ..... .....	21
Figura 1B: Aspecto macroscópico do nervo isquiático após esmagamento ..... .....	21
Figura 2: Posicionamento dos eletrodos durante a eletroestimulação.... .....	21
Figura 3A: Preparação do fragmento do músculo EDL para congelamento ..... .....	22
Figura 3B: Fixação do fragmento em “ <i>tragacanth gum</i> ” para congelamento e microtomia..... .....	22
Figura 4: Fotomicrografias de cortes transversais do músculo EDL após incubação em pH 4.3, 4.62 e 10.55..... .....	27
Figura 5: Porcentagem dos diferentes tipos de fibras no músculo EDL nos grupos: controle (CON), eletroestimulado (EE) e não-eletroestimulado (NEE)..... .....	29

Figura 6: Transição das cadeias pesadas de miosina.....	
.....	29
Figura 7: Área de secção transversa dos diferentes tipos de fibras musculares nos 3 grupos experimentais: controle (CON), eletroestimulado (EE) e não-eletroestimulado (NEE).....	
.....	31
Figura 8: Área média de secção transversa do conjunto de fibras do músculo EDL nos grupos : controle (CON), eletroestimulado (EE) e não-eletroestimulado (NEE).....	
.....	31
Figura 9: Fotomicrografias de cortes transversais do músculo EDL, demonstrando o tamanho das fibras e o tecido perimisial.....	
.....	33
Figura 10: Média da densidade de área (%) dos tecidos conjuntivo e muscular nos 3 grupos experimentais: controle (CON), eletroestimulado (EE) e não-eletroestimulado (NEE).....	
.....	34

## SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	3
2.1 Lesões nervosas periféricas.....	3
2.2 Alterações no nervo periférico decorrentes da denervação.....	6
2.3 Aspectos fenotípicos da fibra muscular e as conseqüências pós- denervação.....	8
2.4 Efeitos da eletroestimulação em músculos inervados e denervados .....	13
3 OBJETIVO.....	18
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	19
4.1 Animais e grupos experimentais.....	19
4.2 Procedimento experimental.....	19
4.3 Coleta do material.....	22
4.4 Microtomia.....	23
4.5 Análise Histoquímica.....	23
4.6 Análise Bioquímica.....	23
4.7 Análise Morfométrica.....	24
4.7.1 Área de secção transversa das fibras musculares.....	24
4.7.2 Densidade de área dos tecidos conjuntivo e muscular.....	24
4.8 Análise Estatística.....	25
5 RESULTADOS.....	26
5.1 Análise histoquímica.....	26

5.1.1 Tipagem das fibras.....	26
5.1.2 Porcentagem dos tipos de fibras.....	28
5.2 Análise bioquímica.....	29
5.3 Análise morfométrica.....	30
5.3.1 Área de secção transversa da fibra muscular.....	30
5.3.2 Densidade de área dos tecidos conjuntivo e muscular.....	34
6 DISCUSSÃO.....	35
7 CONCLUSÃO.....	46
8 BIBLIOGRAFIA.....	47
9 ANEXOS.....	53
Anexo A.....	53
Anexo B.....	53

## 1 INTRODUÇÃO

Estudos recentes têm demonstrado o efeito da eletroestimulação crônica na modificação dos tipos de fibras musculares em ratos, uma vez que a fibra muscular é capaz de se adaptar de acordo com o padrão de estimulação nervosa a ela imposto (DELP; PETTE, 1994; IJKEMA-PAASSEN; MEEK; GRAMSBERGEN, 2001; PETTE; STARON, 2001; PETTE et al., 2002; ASMUSSEN et al., 2003). A eletroestimulação pode ser aplicada tanto em fibras normalmente inervadas, associada a processos de imobilização ou até mesmo atuando como sobrecarga funcional, quanto em fibras denervadas, uma vez que outra característica atribuída a ela nesse caso é a de manutenção do trofismo muscular (EBERSTEIN; EBERSTEIN, 1996).

Durante o processo de denervação ocorre transição dos tipos de fibras musculares devido à alteração do padrão de estimulação nervosa (PETTE; STARON, 2001; LIEBER, 2002). Pette e Staron (2001) citam que em músculos lentos, a denervação acarreta decréscimo nas cadeias pesadas de miosina (*myosin heavy chains - MHC*) lentas e no músculo rápido, provoca a diminuição das MHC rápidas.

Observa-se assim que o padrão de estimulação nervosa, seja natural ou artificial (eletroestimulação), tem papel fundamental na manutenção das características musculares.

O tratamento de lesões nervosas periféricas é prática comum na Fisioterapia. O método de tratamento mais utilizado é a eletroestimulação fásica, isto é, estimulação elétrica de modo intermitente, na qual o paciente recebe a estimulação elétrica por um curto período de tempo, no máximo 2x/dia, através de eletrodos transcutâneos

(NOLAN, 1991). Essa forma de aplicação do estímulo é mais prática e acessível que a estimulação crônica, a qual tem duração de 6 a 24 horas/dia e necessita de eletrodos implantados, provocando risco de infecção e alto custo ao paciente (um procedimento cirúrgico é necessário toda vez que o eletrodo é implantado ou retirado).

Para que a recuperação funcional de uma lesão nervosa periférica seja bem sucedida, a preservação do trofismo muscular, bem como suas características fenotípicas e bioquímicas, é necessária. Portanto, a análise da eletroestimulação na manutenção das características do músculo que aguarda a reinervação é de profundo interesse para a Fisioterapia.

Vários estudos apontam que a eletroestimulação preserva o trofismo muscular, retardando a atrofia decorrente da denervação (EBERSTEIN; EBERSTEIN, 1996; PETTE; STARON, 2001, POLACOW et al, 2003). Cabe investigar se a estimulação elétrica também preserva as cadeias pesadas de miosina, as quais caracterizam a fibra muscular em lenta ou rápida, favorecendo ou não a recuperação funcional após a reinervação.

Visando simular a prática clínica, este estudo propõe um modelo experimental de eletroestimulação fásica e analisa seus efeitos sobre o processo de atrofia e perfil fenotípico e bioquímico do músculo EDL denervado de ratos.

## **2 REVISÃO DA LITERATURA**

### **2.1 Lesões nervosas periféricas**

O nervo é formado por feixes de fibras nervosas que podem conter uma membrana protéico-lipídica, a bainha de mielina, a qual é produzida pela célula de Schwann, sendo interrompida a cada 1-2 mm pelos nódulos de Ranvier, permitindo a propagação do impulso nervoso pela transmissão de potenciais de ação de forma saltatória. Os axônios e as células de Schwann são envolvidos por uma membrana composta de colágeno, fibroblastos e suprimento sanguíneo, denominada endoneuro. Já o perineuro, composto de colágeno e fibras elásticas, envolve vários feixes de fibras nervosas e age como uma barreira difusora, ajudando a preservar o microambiente intrafascicular, enquanto que o epineuro envolve os nervos maiores. Tais revestimentos servem para proteger os nervos de traumas mecânicos e contato direto com substâncias nocivas (LUNDBORG, 1987; WELCH, 1996).

Quando ocorre uma lesão axonal, normalmente a célula nervosa sobrevive; no entanto, profundas mudanças ocorrem nas porções proximal e distal do axônio, bem como no corpo celular (BISHOP, 1982). O núcleo da célula descentraliza-se, as organelas celulares gradualmente assumem novas funções, o número e diâmetro dos dendritos diminuem e tem início a cromatólise (BISHOP, 1982; FAWCETT; KEYNES, 1990). A porção distal do axônio, assim como suas ramificações terminais, botões sinápticos e bainha de mielina, sofrem degeneração anterógrada ou também chamada de degeneração Walleriana (WELCH, 1996; BRODAL, 1997; GHALIB et al., 2001). A degeneração Walleriana acontece porque o fluxo normal de materiais do corpo

neuronal para o terminal axonal encontra-se interrompido e constitui-se de uma série de eventos fagocitários no axoplasma e axolema, o qual é completo em 24 horas em pequenas fibras e em 48 horas em fibras maiores, preparando o ambiente para a regeneração axonal (BISHOP, 1982; FAWCETT; KEYNES, 1990; BEAR; CONNORS; PARADISO, 2002; STOLL; JANDER; MYERS, 2002). Estudos *in vitro* demonstram que a debridação da mielina e da membrana axoplasmática estimulam a mitose das células de Schwann (FAWCETT; KEYNES, 1990) e que fatores neurotróficos, citocinas e células de adesão molecular são expressas de uma forma altamente coordenada (STOLL; JANDER; MYERS, 2002).

Além desta degeneração, ocorre a degeneração retrógrada, que envolve o segmento proximal à lesão, com distância de aproximadamente 1 a 3 nódulos de Ranvier (BISHOP, 1982; WELCH, 1996; BRODAL, 1997); quanto maior a proximidade entre a lesão e corpo celular, mais prolongada é a cromatólise e menores as chances de sobrevivência do neurônio (BISHOP, 1982).

Devido à lesão nervosa, a cronaxia muscular altera-se para um maior valor. Este evento é decorrente de alterações no potencial de membrana da célula nervosa e mudanças na permeabilidade dos canais de sódio e potássio e, conseqüentemente, não é mais possível obter-se excitação muscular (BISHOP, 1982).

Diferentes tipos de lesão podem ser observados no nervo periférico. Seddon (apud LUNDBORG, 1987) as classificou de 3 formas: neuropraxia, axoniotmese e neurotmese. A neuropraxia é o tipo de lesão mais leve: ocorre perda da transmissão nervosa, por bloqueio local da condução (ocorre obliteração de microvasos intraneurais – *vasa-nervorum*) e a recuperação acontece entre 3 e 6 semanas; ocorre preservação da continuidade axonal, da excitabilidade das estruturas nervosas, bem como do tecido

muscular distal à lesão, pois não há degeneração Walleriana. Na axoniotmese ocorre perda axonal, podendo haver graus de comprometimento variáveis: em sua forma mais branda, o endoneuro é preservado; entretanto, se a lesão for mais severa, até o epineuro pode ser afetado. Observa-se recuperação espontânea, porém, esta é mais lenta que na neuropraxia, devido à degeneração Walleriana e subsequente regeneração axonal. Na neurotmese, a secção nervosa é completa e a recuperação é possível apenas após neurorrafia ou enxerto nervoso. Na neurotmese também ocorre degeneração Walleriana (LUNDBORG, 1987; FAWCETT; KEYNES, 1990; WELCH, 1996).

A neurorrafia consiste na sutura do nervo, que promove uma melhor orientação dos brotos axonais durante a regeneração. Porém, a neurorrafia pode provocar tensão na região da sutura, aumentando a formação de tecido cicatricial e impedindo a regeneração axonal. Para evitar essa tensão, o auto-enxerto nervoso, entre outros, vem sendo utilizado, permitindo melhor orientação dos brotos axonais, além de promover um microambiente favorável constituído por colunas de células de Schwann (LUNDBORG, 1987). Ghalib et al. (2001) observaram que um microambiente favorável e fatores neurotróficos e neurotrópicos são determinantes na regeneração axonal e que enxertos com ramos motores, e não sensitivos como normalmente se utiliza, são mais eficazes nesse processo.

As principais características clínicas da lesão nervosa são alterações de sensibilidade, de habilidades motoras e funções autonômicas; quanto menor o tempo de reinervação, melhor é o prognóstico funcional (EBERSTEIN; EBERSTEIN, 1996; LUNDY-EKMANN, 2000).

A eletromiografia e o eletrodiagnóstico são utilizados atualmente para uma melhor caracterização da lesão nervosa. O aumento da atividade elétrica espontânea do músculo e a diminuição da atividade de estimulação nervosa (evocada) são características de lesão nervosa periférica. O músculo estriado normalmente inervado é eletricamente quiescente. Potenciais de fibrilação parecem ser induzidos por descargas espontâneas das fibras musculares hipersensíveis e persistem até o músculo ser reinervado ou até nenhuma fibra muscular viável permanecer. Observa-se também um decréscimo na amplitude e velocidade de condução, bem como da latência, na lesão nervosa periférica. Nervos que sofrem neuropraxia respondem bem a eletroestimulação; no entanto, nervos que estão sob degeneração Walleriana podem conduzir impulsos por 4-5 dias após a lesão e então se tornam não responsivos; porém, observam-se variações de indivíduo para indivíduo (WELCH, 1996; HEATON; KOBLER, 2005; PERRY, 2005).

## **2.2 Alterações no nervo decorrentes da denervação**

As células nervosas não se multiplicam após uma lesão, porém emitem prolongamentos com a finalidade de restaurar o volume axoplasmático perdido com a lesão do axônio original. Ocorre aumento do volume celular, descentralização do núcleo e cromatólise. A perda da continuidade axonal é seguida por uma intensa proliferação das células de Schwann no segmento distal do axônio, as quais se dispõem em forma de coluna, denominadas bandas de Büngner (LUNDBORG, 1987; GHALIB et al., 2001). Sabe-se que em apenas 10 dias após esmagamento nervoso,

nenhum axônio é visto no músculo através de impregnação por prata (GORIO et al., 1983).

A regeneração nervosa inicia-se poucas horas após a lesão e é associada à expressão de novos genes e proteínas (FAWCETT; KEYNES, 1990). O coto proximal do nervo produz grande número de brotos colaterais e terminais que avançam em sentido distal, através da zona lesionada. Assim que esses brotos penetram no músculo denervado, múltiplas sinapses se formam na mesma fibra muscular. Essas sinapses passam por um período de maturação e repressão dos terminais sinápticos excessivos, os quais se tornam silentes antes de sua eliminação (GORIO et al., 1983; LUNDBORG, 1987).

O ambiente através do qual os axônios se regeneram no Sistema Nervoso Periférico (SNP) consiste de células de Schwann e sua lâmina basal, fibroblastos e colágeno e, na fase precoce da regeneração, fragmentos axonais, mielina degenerada e fagócitos (FAWCETT; KEYNES, 1990). A fibronectina presente na matriz não é suficiente para promover o crescimento axonal, mas permite a migração de fibroblastos e células de Schwann dos segmentos distais e proximais. De todos, as células de Schwann constituem fator crítico na regeneração axonal, pois permitem que os brotos axonais atravessem o sítio de lesão para o restabelecimento do contato nervoso, além de possuírem a laminina em sua lâmina basal, facilitando este processo (LUNDBORG, 1987).

As mudanças que ocorrem no neurônio geralmente têm função de aumentar o suprimento de substâncias que serão usadas para reconstruir a parte lesada. Após alguns meses de regeneração axonal, alguns axônios aumentam de tamanho e

retornam a aproximadamente seu tamanho normal, enquanto que outros desaparecem (FAWCETT; KEYNES, 1990).

Sabe-se que o corpo celular depende de constante suplemento de fatores neurotróficos, que são sintetizados pelos órgãos-alvo dos neurônios e/ou por suas correspondentes células de Schwann; portanto, a recuperação funcional ocorre com maior frequência no SNP, pois a produção do fator de crescimento neural (*nerve growth factor* - *NGF*) contribui para a recuperação dos axônios periféricos, promovendo a sobrevivência do neurônio e estimulando o crescimento axonal (LUNDBORG, 1987; LUNDY-EKMANN, 2000).

Experimentos em animais demonstram que o crescimento axonal diário em lesões do tipo neurotmeze é de 2 - 3,5 mm/dia, enquanto que na axoniotmeze é de 3 - 4,5 mm/dia. No homem, este crescimento não é linear, pois apresenta gradual decréscimo na taxa de regeneração, tendo como média diária 1 – 2 mm/dia (LUNDBORG, 1987; GORDON; SULAIMAN; BOYD, 2003).

Gorio et al. (1983) observaram que o processo de reinervação muscular começa 2 semanas após esmagamento nervoso, sendo que, após o primeiro contato de um broto axonal com a fibra muscular, esta passa a liberar neurotransmissores e a repressão sináptica se inicia. Em 60 dias, observou-se que os contatos sinápticos excessivos eram eliminados e a fibra muscular encontrava-se monoinervada.

### **2.3 Aspectos fenotípicos da fibra muscular e as conseqüências pós- denervação**

As fibras musculares são classificadas de acordo com sua MHC, sendo consideradas puras, quando apresentam uma única isoforma de MHC, ou híbridas,

quando contém 2 ou mais isoformas. Apresentam-se como formas puras a fibra tipo I (contração lenta) e as do tipo IIA, IID (IID/X) e IIB (fibras de contração rápida). As formas híbridas são as do tipo IC, IIC, IIAC, IIAD e IIBD. Devido à estrutura altamente dinâmica destas fibras, a transformação das isoformas lentas para rápidas e rápidas para lentas parece seguir uma ordem, decorrente do gradiente de fosforilação do ATP: **I** ↔ IC ↔ IIC ↔ IIAC ↔ **IIA** ↔ IIAD ↔ **IID** ↔ IIBD ↔ **IIB** (STARON; PETTE, 1993; PETTE; STARON, 2001). Cabe ressaltar que as fibras híbridas não representam somente uma fase de transição de uma fibra pura para outro tipo puro e sim uma população distinta, adaptada a padrões específicos e mantida sob circunstâncias normais (STARON et al., 1999). No entanto, os tipos de fibra muscular não são somente caracterizados devido à composição de suas MHC, mas também devido às suas propriedades fisiológicas e bioquímicas (DELP; DUAN, 1996).

O tecido muscular pode ser caracterizado através de reações histoquímicas, as quais permitem que as enzimas encontradas na fibra muscular reajam a certos produtos permitindo evidenciar sua atividade. Os 3 métodos histoquímicos mais utilizados atualmente são: mATPase (*myofibrillar actomyosin ATPase*), SDH (*succinate dehydrogenase*) e  $\alpha$ -GP ( *$\alpha$ -glycerophosphate dehydrogenase*) (LIEBER, 2002).

O processo histoquímico da mATPase distingue fibras de contração rápida e lenta, podendo verificar a coexistência de 2 isoformas de MHC em uma única fibra muscular. As diferentes tonalidades produzidas em diferentes pHs correlacionam-se com a variação na expressão das isoformas de MHC (STARON et al., 1999). No processo da mATPase, a tonalidade das fibras tipo IIB e IID é similar na pré-incubação ácida e diferente na alcalina, pois possuem atividades metabólicas diferentes. No pH ácido (4.3), as fibras tipo I evidenciam-se pela tonalidade escura; no pH ácido (4.6), as fibras

do tipo I permanecem escuras, enquanto as fibras tipo IIA aparecem brancas e as IIB e IID aparecem com tons intermediários entre o claro e escuro. Somente no pH alcalino (10.4) é que os tipos IIB e IID podem ser diferenciados, sendo que a fibra IIB torna-se pálida, a IID tem tonalidade intermediária e a IIA torna-se escura (HÄMÄLÄINEN; PETTE, 1993).

Delp e Duan (1996) determinaram através de reação histoquímica a população relativa e respectivo tamanho das fibras I, IIA, IID e IIB de toda a musculatura do rato Sprague-Dawley e observaram que a fibra IIB é o tipo predominante, tanto em termos de composição quanto em massa absoluta. Outro achado refere-se ao músculo extensor longo dos dedos (EDL), que possui 38% de fibras tipo IID/X, 38% IIB, 20% IIA e 4% I.

A análise bioquímica permite identificar visualmente, através da intensidade de fixação por *Comassie Blue*, a quantidade de cadeias pesadas de miosina, apontando as diferenças existentes entre os músculos e também, por exemplo, alterações decorrentes da denervação (JAKUBIEC-PUKA et al., 1999).

Hämäläinen e Pette (1993) citam 3 subtipos de MHC rápidas, que são classificadas por ordem crescente, de acordo com sua mobilidade eletroforética: MHCIIa → MHCIIId → MHCIIb. A capacidade oxidativa destas fibras decresce também na seqüência: IIA > IID > IIB.

Alterações hormonais, o processo de envelhecimento, alterações na demanda funcional e a denervação provocam mudanças nos tipos de fibra muscular (WINDISCH et al., 1998). Quando a atividade muscular é alterada, as MHC acompanham essa mudança. Por exemplo: quando há sobrecarga funcional, a concentração das MHC I

torna-se elevada, enquanto a concentração das isoformas rápidas, especialmente a MHCIIb, diminui (JAKUBIEC-PUKA et al., 1999).

Quando o suprimento nervoso de um músculo é interrompido, diversas mudanças morfológicas e bioquímicas são desencadeadas na fibra muscular (GERMINARIO et al., 2002; LIEBER, 2002; ZERNICKA et al., 2002). O músculo se torna flácido e sofre atrofia; o formato poligonal das fibras altera-se, bem como as áreas de secção transversa, devido ao aumento do tecido conjuntivo e adiposo no interstício das células (LUNDBORG, 1987; LU; HUANG; CARLSON, 1997; CARTER et al., 1998; DECHERCHI et al., 2003; SCHAVLAKADZE et al., 2005). Um período de 18 a 24 meses de denervação induz alterações irreversíveis nas células musculares, com pouca chance de recuperação na função motora (LUNDBORG, 1987). No entanto, as mudanças causadas pela denervação variam entre músculos lentos e rápidos (JAKUBIEC-PUKA, 1992).

Após a denervação ocorre dispersão de receptores de acetilcolina (ACh) por toda membrana muscular, com desaparecimento da acetilcolinesterase (AChE), tornando-a inteiramente responsiva à ACh. Esse parece ser um tipo de “sinal” que estimula o brotamento de novos axônios e prepara o músculo para a formação de novas junções neuromusculares. A dispersão de receptores de ACh e a presença de fibrilações caracterizam mudanças adaptativas do músculo denervado para a manutenção da fibra muscular até a reinervação (BISHOP, 1982; EBERSTEIN; EBERSTEIN, 1996; LIEBER, 2002).

Com a denervação, a taxa de degradação das proteínas musculares torna-se maior que a de síntese: a quantidade de miosina decai mais aceleradamente que a de actina, sendo que a quantidade de actina permanece maior que a de miosina por

longos períodos após a denervação (JAKUBIEC-PUKA; KULESKA-LIPKA; KRAJEWSKI, 1981).

A atrofia muscular torna-se proeminente no segundo mês pós-denervação no rato e pode ser vista como um mecanismo adaptativo, na tentativa de reduzir a sobrecarga numa região com pouca funcionalidade, ou como uma resposta das fibras musculares ao pobre microambiente. A fraqueza muscular pode ser consequência desta atrofia muscular e/ou proliferação do tecido conjuntivo, o qual torna-se presente tanto na região perifascicular quanto nos espaços intersticiais, podendo interferir na troca de metabólitos entre o leito vascular e a fibra muscular e na proliferação dos brotos axonais durante a reinervação (LU; HUANG; CARLSON, 1997).

O processo de atrofia atinge tanto as fibras musculares rápidas quanto as lentas e acarreta diminuição no diâmetro da fibra e força muscular (LIEBER, 2002). A proporção da atrofia varia consideravelmente entre espécies, entre indivíduos de mesma espécie, entre músculos do mesmo indivíduo e até mesmo entre as fibras do mesmo músculo (EBERSTEIN; EBERSTEIN, 1996). A área média de secção transversa de músculos de ratos normalmente inervados segue uma ordem crescente: tipo I < tipo IIA < tipo IID/X < tipo IIB (DELP; DUAN, 1996).

A inabilidade dos músculos se contraírem ou manterem uma atividade prolongada pode ser consequência de uma mudança nos tipos de fibras presentes no músculo (CARTER et al., 1998). No músculo de contração lenta, a denervação provoca diminuição das MHC lentas, enquanto que no músculo de contração rápida, as primeiras isoformas que diminuem são as do tipo rápido; no entanto, a perda total de MHC é maior no músculo lento denervado que no músculo rápido, apesar do progresso da atrofia ser similar em ambos (PETTE; STARON, 2001; JAKUBIEC-PUKA, 1992).

Adicionalmente a este processo, MHC embrionárias e neonatais começam a se expressar após a denervação (LU; HUANG; CARLSON, 1997; JAKUBIEC-PUKA et al., 1999).

Transcorrido um longo período de denervação, os músculos mistos no rato são transformados quase que totalmente em músculos rápidos. No entanto, a conversão dos tipos de fibras musculares de lenta para rápida pode não ser completa em ratos, diferentemente do que ocorre em coelhos, que possuem uma transformação de rápida para lenta mais completa (EBERSTEIN; EBERSTEIN, 1996).

Germinario et al. (2002) sugerem que durante os estágios iniciais da denervação, quando as modificações nas MHC ainda não são evidentes, alterações significantes no retículo sarcoplasmático e nas propriedades miofibrilares das fibras IIB de músculos rápidos já estão instaladas.

Para que a reinervação e a regeneração muscular sejam bem sucedidas, não só o suprimento nervoso deve ser restabelecido, mas também a capacidade da fibra muscular responder com aumento de massa e capacidade de contração, bem como a recuperação de funções bioquímicas (LU; HUANG; CARLSON, 1997; ZERNICKA et al., 2002).

#### **2.4 Efeitos da eletroestimulação em músculos inervados e denervados**

A estimulação elétrica muscular, amplamente utilizada em modelos experimentais, tem como objetivo a verificação das mudanças na expressão gênica e conseqüente alteração fenotípica do músculo, bem como seus mecanismos regulatórios (LIEBER; FERRO; HARGENS, 1988; PETTE; VRBOVÁ, 1999; LIEBER, 2002). Ela também é

freqüentemente empregada com a finalidade de minimizar a atrofia e fraqueza muscular decorrente a denervação (EBERSTEIN; EBERSTEIN, 1996; PETTE; STARON, 2001; POLACOW et al, 2003; DENNIS; DOW; FAULKNER, 2003; DOW; DENNIS; FAULKNER, 2005).

Pette e Vrbová (1999) apontam que a eletroestimulação de músculos normais em modelos experimentais é segura e destacam 3 razões: a) as fibras musculares podem ser ativadas por um novo padrão de impulso, sem alteração em sua inervação normal; b) não é comum que um padrão tônico de estimulação ative fibras sensoriais, causando dor ao animal e, c) é menos comum ainda que a transmissão neuromuscular seja bloqueada por um padrão de estimulação de baixa freqüência, quando comparado a um protocolo de alta freqüência.

A eficácia da eletroestimulação depende dos parâmetros de estímulo e do padrão da estimulação. Os parâmetros de estímulo incluem amplitude e duração do estímulo, freqüência de pulso, duração dos trens de pulso e intervalo entre os trens. Entretanto, existem controvérsias entre os autores sobre qual o melhor padrão de estimulação a fim de reverter os efeitos deletérios da denervação (EBERSTEIN; EBERSTEIN, 1996).

O tecido muscular pode responder diferentemente ao protocolo de eletroestimulação dependendo da espécie do animal e da composição de suas fibras (DENNIS; DOW; FAULKNER, 2003). A eletroestimulação dos músculos sóleo e extensor longo dos dedos com padrões em que os períodos de descanso entre os trens de pulso, o período do trem de pulso e, conseqüentemente a porcentagem de tempo de eletroestimulação foram os mesmos para ambos os músculos evidenciou que tanto a freqüência quanto o período de estimulação influenciaram as propriedades contráteis dos músculos analisados (GUNDERSEN; EKEN, 1992).

O aumento da atividade neuromuscular provocada pela estimulação elétrica crônica de baixa frequência no músculo de contração rápida promove transição na expressão das miofibrilas rápidas para lentas, dos tipos de fibras musculares e das propriedades contráteis do músculo (JASCHINSKY et al., 1998; ASMUSSEN et al., 2003). O perfil metabólico da fibra muscular também se altera: ocorre decréscimo na atividade de enzimas glicolíticas e glicogenolíticas, com concomitante aumento da capilaridade e atividade enzimática mitocondrial (SKORJANC; TRAUB; PETTE, 1998; EGGINTON; HUDLICKÁ, 2000).

A conversão das fibras rápidas para lentas envolve um processo coordenado de repressão e indução de proteínas com estrutura celular idêntica ou diferente; em apenas 8 a 10 dias de estimulação observa-se acúmulo de proteínas recém-sintetizadas. Mudanças nos níveis de mRNA são as primeiras a serem notadas após a eletroestimulação crônica, antes mesmo da alteração fenotípica, demonstrando que a fibra muscular responde à alteração de atividade muito mais rapidamente que as refletidas pelas mudanças na composição de suas proteínas (PETTE; VRBOVÁ, 1999). Segundo Martin et al. (1992) este tipo de estimulação pode aumentar consideravelmente a resistência à fadiga; entretanto, não tem impacto sobre a força muscular e pode até induzir a atrofia muscular.

A estimulação elétrica no músculo denervado promove alterações em várias propriedades da fibra muscular, tais como, potencial de repouso da membrana, propriedades contráteis do músculo, distribuição dos receptores de ACh e brotamento terminal (NIX; HOPF, 1983).

A utilização da eletroestimulação crônica em músculos de contração lenta durante o processo de denervação, minimiza a transição de fibras lentas para rápidas;

contrariamente, a estimulação elétrica fásica de alta frequência acelera essa transição. No músculo de contração rápida do rato, como é o caso do músculo EDL, onde a isoforma predominante é a MHCIIb, a seqüência de transição das fibras musculares ocorre de MHCIIb → MHCII(x), que corresponde à conversão da fibra tipo IIB para IID (X) (PETTE; STARON, 2001). Eken e Gundersen (1988) propuseram 4 tipos de eletroestimulação crônica no músculo EDL denervado, somente alterando o padrão de frequência, a fim de verificarem as alterações evidentes nas propriedades contráteis do músculo. Concluíram que a alta frequência (150 Hz), com descargas triplas de pulso, proporcionavam melhor manutenção das propriedades contráteis musculares.

Uma controvérsia existente sobre a eletroestimulação em músculos denervados é sobre seu possível efeito deletério sobre a reinervação. Ainda é obscuro o fato da eletroestimulação inibir ou não os brotamentos axonais (NIX; HOPF, 1983; EBERSTEIN; EBERSTEIN, 1996; AL-MAJED et al., 2000; ZEALER et al., 2000; TAM et al., 2001; BRUSHART et al., 2002; ZEALER et al., 2002).

Outro ponto ainda muito discutido é a aplicação da eletroestimulação em humanos (DECHERCHI et al., 2003). Alguns autores acreditam que estimulação crônica de baixa frequência afeta a musculatura de humanos da mesma maneira que nos animais, aumentando a capacidade oxidativa do músculo, número de capilares e produzindo alguma transição entre os subtipos rápidos da fibra muscular (PETTE; VRBOVÁ, 1999; PÉREZ et al., 2002). Há relatos de que a eletroestimulação fásica também promove benefícios ao tecido em relação ao volume muscular, fluxo sanguíneo, perfusão, temperatura e redução de edema (WOODCOCK; TAYLOR; EWINS, 1999).

Outros autores sugerem que a eletroestimulação transcutânea, usada em programas de reabilitação após o reparo de uma lesão nervosa não é eficaz,

apresentando pobres resultados na manutenção do trofismo e função muscular, primeiramente devido ao limitado nível de estimulação (paciente sente desconforto com altos níveis de estimulação) e, secundariamente, à inadequada frequência de estimulação (NICOLAIDIS; WILLIAMS, 2001). Outra desvantagem apontada seria o acúmulo de tecido conjuntivo e adiposo, que agem como “isolante elétrico”, reduzindo a diferença de potencial elétrico necessária para a excitação da membrana muscular e, conseqüentemente, produzindo resultados insatisfatórios (KERN et al., 2002).

### **3 OBJETIVO**

Este trabalho teve por objetivo investigar a influência da estimulação elétrica muscular sobre o perfil fenotípico, bioquímico e morfométrico do músculo EDL denervado por esmagamento do nervo isquiático em ratos.

## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 Animais e grupos experimentais**

Foram utilizados 18 ratos Wistar machos, com idade entre 6 e 7 semanas e peso médio de 190g ( $\pm 24$ g), obtidos no Biotério da Universidade Metodista de Piracicaba (UNIMEP), subdivididos em 3 grupos (n=6):

- Grupo I: lesado/eletroestimulado (EE);
- Grupo II: lesado/não-eletroestimulado (NEE);
- Grupo III: controle (CON).

### **4.2 Procedimento Experimental**

#### **Grupo I: Lesado/eletroestimulado (EE)**

Os animais receberam anestesia intramuscular com uma mistura de Ketalar<sup>®</sup> (cloridrato de cetamina) (50mg/ml) e Rompun<sup>®</sup> (cloridrato de tiazina) (2g/100ml), na proporção de 1:1, na dose de 0,3 ml/100g de peso corporal, no músculo glúteo do membro posterior direito. Realizou-se tricotomia das regiões glútea e anterior do membro posterior esquerdo e, em seguida, o animal foi posicionado em decúbito ventral na prancha cirúrgica. Uma incisão de aproximadamente 2 cm foi feita na região glútea, próxima à emergência do nervo isquiático na coluna vertebral e o plano muscular foi divulsionado para a exposição do nervo. O nervo foi então esmagado com uma pinça hemostática de 15cm (Figura 1A), adaptada e envolvida por esparadrapo (Cremer<sup>®</sup>), para evitar lesões do epineuro, com 4 pinçamentos durante 20 segundos

cada um e intervalo de 1 segundo entre eles, segundo Marques (1992). Após o esmagamento, os planos muscular e cutâneo foram suturados com fio de algodão 6-0 (ETHICON).

O protocolo de eletroestimulação foi iniciado 24 após a denervação e realizado no período matutino, utilizando-se o eletroestimulador Dualpex961-Quark®, e prosseguiu por 20 dias consecutivos, com duração de 30 minutos/dia. Para o procedimento de eletroestimulação, os animais foram anestesiados por inalação de éter etílico e posicionados em decúbito dorsal. Utilizou-se 2 eletrodos auto-adesivos, com 1 cm<sup>2</sup> de área, sendo 1 posicionado na região inguinal e outro sobre o músculo tibial anterior (Figura 2). Os seguintes parâmetros de eletroestimulação foram empregados: 50 Hz de frequência, 3 ms de largura de pulso e intensidade inicial de 5 mA (padronizada a partir da visualização de contração vigorosa do músculo), sendo acrescida em 1 mA a cada 10 minutos, para evitar acomodação, com Ton/Toff de 4 segundos, para evitar a fadiga muscular. O protocolo de eletroestimulação, utilizado pelo grupo de pesquisa da UNIMEP, foi estabelecido a partir das características do músculo EDL (músculo rápido e denervado) e seu modo de aplicação (1x/dia, 30 minutos) por ser prática comum do Fisioterapeuta na clínica.

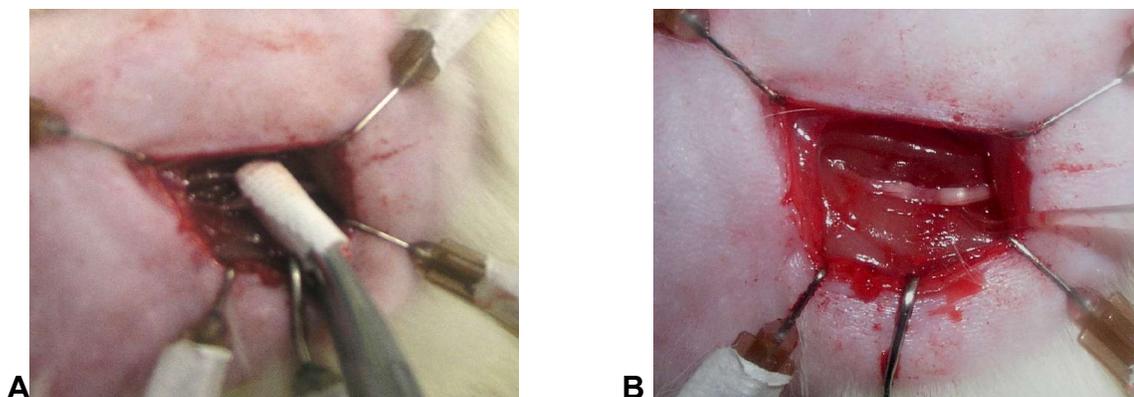
### **Grupo II: Lesado/não-eletroestimulado (NEE)**

Os animais deste grupo foram submetidos aos mesmos procedimentos realizados com o Grupo I, com exceção do protocolo de eletroestimulação.

### Grupo III: Controle (CON)

Os animais deste grupo não sofreram qualquer intervenção e permaneceram nas mesmas condições que os animais dos demais grupos experimentais.

Todos os ratos foram mantidos em gaiolas individuais de polietileno, submetidos a ciclo claro/escuro de 12 horas, com ração e água *ad libitum*, no Biotério da UNIMEP, durante 21 dias.



**Figura 1.** (A) Procedimento cirúrgico para esmagamento do nervo isquiático; (B) Aspecto macroscópico do nervo isquiático após esmagamento.

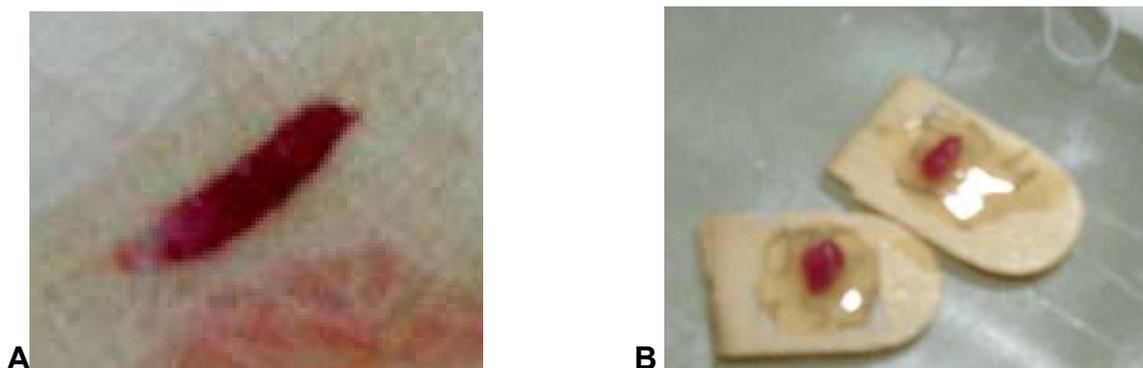


**Figura 2.** Posicionamento dos eletrodos durante a eletroestimulação.

### 4.3 Coleta do material

Após os 20 dias de eletroestimulação, os animais foram novamente anestesiados por injeção intramuscular com uma mistura de Ketalar® (cloridrato de cetamina) (50mg/ml) e Rompun® (cloridrato de tiazina) (2g/100ml), na proporção de 1:1, na dose de 0,3 ml/100g de peso corporal, no músculo glúteo do membro posterior direito. O músculo EDL do membro posterior esquerdo foi retirado em toda sua extensão (Figura 3A), seccionado em seu terço médio, orientado em “*tragacanth gum*” (Figura 3B) e imediatamente congelado em isopentano resfriado em nitrogênio líquido a -159°C, para acondicionamento em *biofreezer* e subsseqüente análise.

Após a retirada do músculo, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical.



**Figura 3. (A)** Preparação do músculo EDL para congelamento; **(B)** Fixação do fragmento em “*tragacanth gum*” para congelamento e microtomia.

#### **4.4 Microtomia**

Cortes transversais de 12 µm de espessura do músculo EDL foram obtidos através de um criostato Microm<sup>®</sup> HM505E, a -24°C, coletados em lamínulas e estas armazenadas em *biofreezer* para subsequente reação histoquímica.

#### **4.5 Análise Histoquímica**

Para a realização da análise histoquímica utilizou-se a técnica da mATPase, (*myofibrillar adenosine triphosphatase*) (STARON; PETTE, 1993), após pré-incubação em pH 4.30, 4.62 e 10.55, modificado de Guth e Samaha (1970).

Utilizando-se um sistema de análise de imagens “Image Pró-Plus 4.0 Media Cybernetics” foram feitas fotomontagens de 2 campos aleatórios (640 µm x 480µm), com objetiva de 10x, de um corte por lâmina em pH 4.62 para, em combinação com os cortes da mesma região do músculo em pH 4.30 e 10.55, serem determinados o número e a porcentagem de cada um dos tipos de fibra, segundo Staron e Pette (1993).

#### **4.6 Análise Bioquímica**

Seis cortes transversais de 12 µm foram obtidos para o estudo bioquímico, sendo colocados em *ependorffs* com 0,5 ml do seguinte meio: 10% (w/v) glycerol, 5% (v/v) 2 mercaptoethanol e 2,3% (w/v) sodium dodecylsulfate (SDS) em 62,5 mM Tris/HCL buffer (pH-6,8), e posteriormente agitados por 1 minuto e aquecidos por 10 minutos a 60°C. Pequenas porções do extrato (5-7 µl) foram submetidas à eletroforese em gel (gradiente de 7-10%) de poliacrilamida (SDS) com 17-18 horas de corrida a 120V. Os géis foram então corados com *Comassie Blue* (BAR; PETTE, 1988). As cadeias

pesadas de miosina (MHC) foram identificadas de acordo com sua aparente massa molecular comparadas com marcadores para proteína.

## **4.7 Análise Morfométrica**

### **4.7.1 Área de secção transversa das fibras musculares**

Para a análise morfométrica utilizou-se o analisador de imagens “Image - Pró Plus 4.0 Media Cybernetics”. As medidas da área de secção transversa de aproximadamente 400 fibras foram obtidas de forma semi-automática, em micrômetros. Dois campos de mesma dimensão foram aleatoriamente definidos em cada lâmina histológica (os mesmos campos utilizados para a análise histoquímica) e focalizados em objetiva de 5x.

### **4.7.2 Densidade de área dos tecidos conjuntivo e muscular**

Cortes de 12  $\mu\text{m}$  de espessura foram corados com Hematoxilina por 15 minutos e Eosina por 3 minutos. Após secagem em estufa, as lâminas foram montadas em bálsamo do Canadá.

Para cada animal foram escolhidos 3 cortes não seriados. Em cada corte foram delimitadas 3 áreas aleatoriamente (2560  $\mu\text{m}$  x 1920  $\mu\text{m}$ ), com objetiva de 40x (microscópio Nikon), onde através de um sistema de análise de imagens (Image - Pró Plus 4.0 Media Cybernetics) foram computados os pontos de intersecção de retas que incidiram sobre o tecido conjuntivo e aqueles que incidiram sobre o músculo. Esses

dados permitiram conhecer a densidade de área (em porcentagem) do tecido conjuntivo e do músculo EDL.

#### **4.8 Análise Estatística**

A análise da porcentagem dos tipos de fibras e da área de secção transversa individual foi realizada através da análise de variância utilizando o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis a fim de se verificar a diferença entre os grupos. Quando esta diferença era apontada, deu-se continuidade a análise através do teste de comparações múltiplas de Bonferroni.

Para a análise das áreas de secção transversa e densidade de área dos tecidos conjuntivo e muscular, inicialmente foram verificados os pressupostos de normalidade, através do teste de Kolmogorov-Smirnov e homogeneidade entre as variâncias, através do teste de Bartlett. As diferenças entre os grupos foram analisadas através da ANOVA e teste F e, quando a diferença apresentada era significativa, aplicou-se o teste de Tukey HSD para as comparações múltiplas.

Em todos os testes o nível crítico de 5% foi estabelecido e os dados foram processados com o auxílio do sistema computacional SPSS 7.5.

## **5 RESULTADOS**

### **5.1 Análise histoquímica**

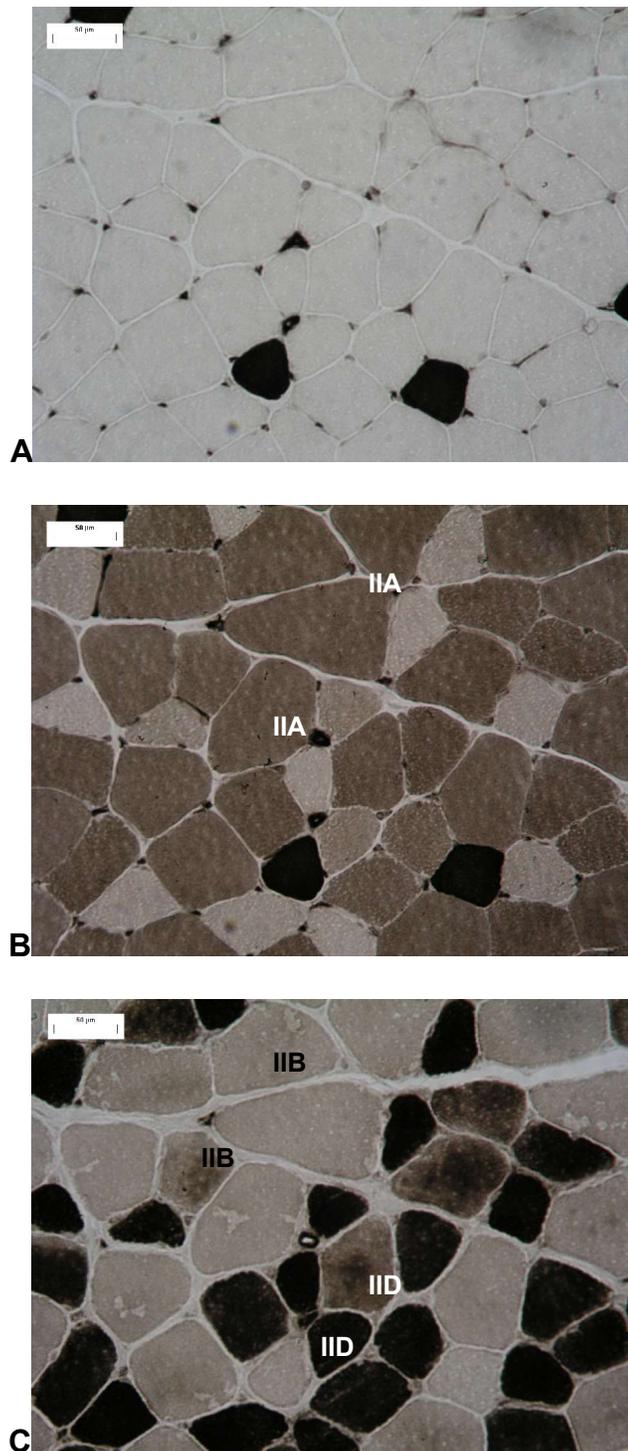
#### **5.1.1 Tipagem das fibras**

Em pH 4.3, as fibras tipo I do músculo EDL são observadas em tom escuro (Figura 4A). Essa tonalidade mantém-se no pH 4.62 (Figura 4B) e modifica-se no pH 10.55 (Figura 4C) onde são evidenciadas pela tonalidade clara.

Em pH 4.62, as fibras IIA se apresentaram totalmente claras e em pH 4.3 e 10.55, apresentam tonalidade clara e escura, respectivamente.

Em pH 10.55, as fibras IIB e IID apresentaram uma tonalidade intermediária entre clara e escura, sendo que a IIB é ligeiramente mais clara que a IID.

As fibras híbridas também foram tipadas: no pH 4.3 as fibras IIAC e IIC foram encontradas; no pH 4.62 observou-se a fibra IIAD e no pH 10.55 as fibras IIBD.



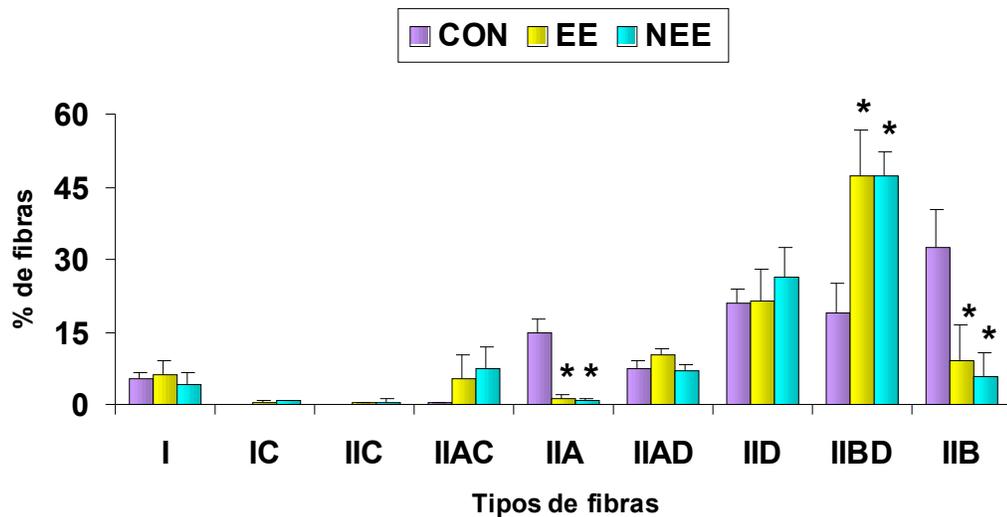
**Figura 4:** Fotomicrografias de cortes transversais do músculo EDL após pré-incubação em pH 4.3 (A), pH 4.62 (B) e pH 10.55 (C). Notar as diferentes tonalidades das fibras nos 3 pHs. Bar= 50 µm.

### 5.1.2 Porcentagem dos tipos de fibras

A tabela 1 resume os resultados encontrados em relação à porcentagem dos tipos de fibras nos diferentes grupos deste estudo. Observa-se manutenção da porcentagem de fibras lentas nos grupos EE e NEE, apesar do processo de denervação. Entretanto as fibras rápidas, particularmente as fibras IIA e IIB, mostram queda significativa na porcentagem nos grupos EE e NEE ( $p=0,00$ ), enquanto que as fibras IIBD mostram aumento também significativo nesses mesmos grupos ( $p=0,00$ ), caracterizando o processo de transição fenotípica conseqüente à denervação (Figura 5).

**Tabela 1:** Porcentagem dos tipos de fibras nos grupos experimentais: CON (controle), EE (eletroestimulado) e NEE (não eletroestimulado) ( $n=6$ ;  $p<0,05$ ). (\*) Difere significativamente do CON.

	CON	EE	NEE
I	5,15 ± 1,28	6,11 ± 3,01	4,15 ± 2,37
IC		0,44 ± 0,20	0,73 ± 0,27
IIC		0,25 ± 0,04	0,57 ± 0,65
IIAC	0,33 ± 0,17	5,29 ± 5,00	7,28 ± 4,53
IIA	14,88 ± 2,80	1,26 ± 0,91 *	0,90 ± 0,41 *
IIAD	7,47 ± 1,71	10,15 ± 1,41	7,18 ± 1,18
IID	20,98 ± 3,04	21,36 ± 6,63	26,33 ± 6,16
IIBD	18,81 ± 6,43	47,15 ± 9,46 *	47,35 ± 4,98 *
IIB	32,58 ± 7,73	8,95 ± 7,55 *	5,83 ± 4,97 *

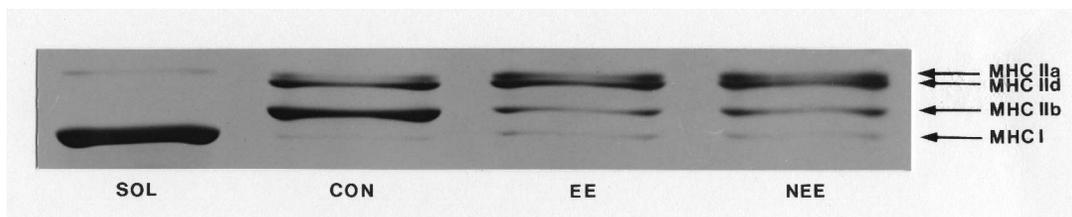


**Figura 5.** Porcentagem dos diferentes tipos de fibras no músculo EDL nos grupos: controle (CON), eletroestimulado (EE) e não-eletroestimulado (NEE); (n=6;  $p < 0,05$ ). (\*) Difere significativamente do CON.

## 5.2 Análise bioquímica

A análise bioquímica sugere diminuição das MHCIIb nos grupos EE e NEE, com concomitante aumento das MHCIIc e MHCIIa. Observa-se também discreto aumento na quantidade de MHC I em ambos os grupos (Figura 6).

Numa abordagem visual, quando comparados isoladamente os grupos EE e NEE, não se observa diferença.



**Figura 6.** Transição das cadeias pesadas de miosina. Separação eletroforética das MHC do músculo EDL nos grupos: CON (controle), EE (eletroestimulado) e NEE

(não-eletoestimulado). Observar separação eletroforética das MHC do músculo sóleo (SOL).

### 5.3 Análise morfométrica

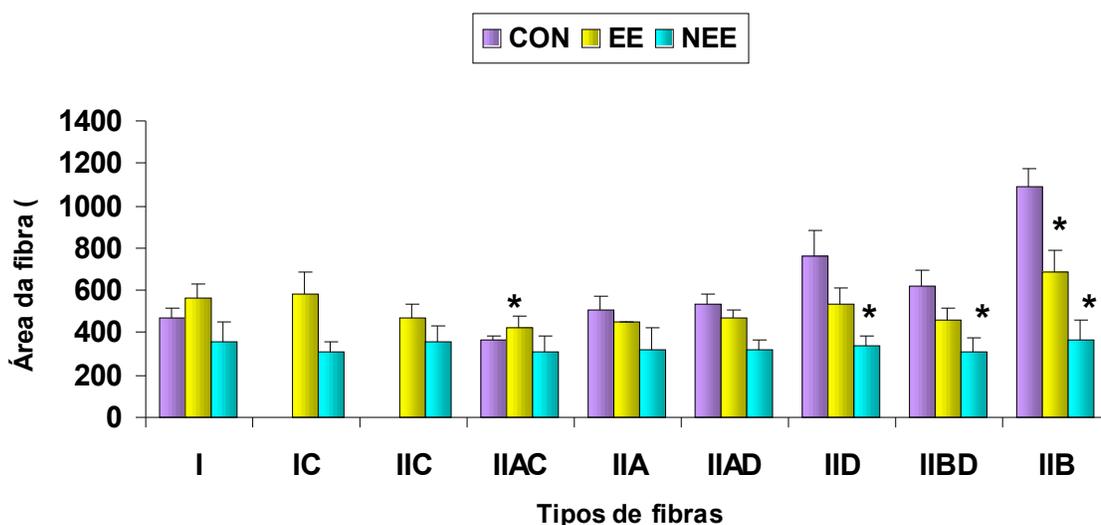
#### 5.3.1 Área de secção transversa das fibras musculares

Em relação à área de secção transversa por tipo de fibra muscular, a tabela 2 mostra a manutenção dos valores em todos os grupos de fibras, com exceção das fibras IIB, IIBD e IID e IIAC.

**Tabela 2:** Valores da área média de secção transversa ( $\mu\text{m}^2$ ) dos diferente tipos de fibras do músculo EDL nos grupos experimentais: CON (controle), EE (eletroestimulado) e NEE (não-eletroestimulado); (n=6;  $p<0,05$ ). (\*) Difere significativamente do CON.

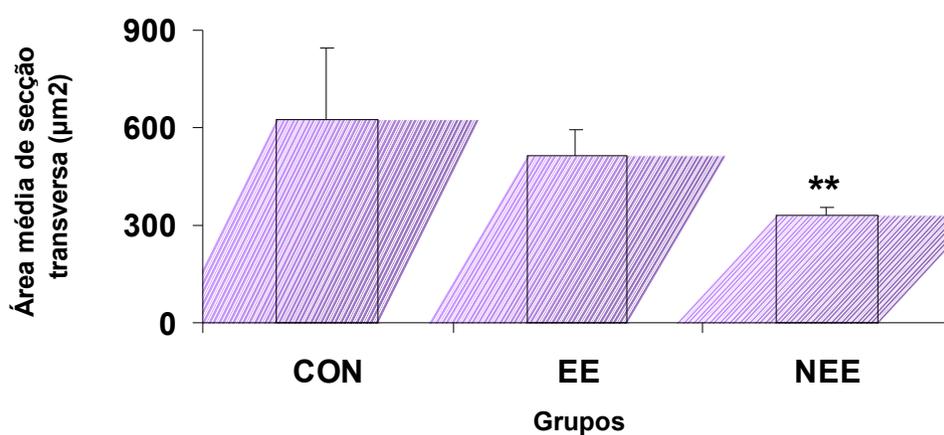
	CON	EE	NEE
I	471 ± 48,02	562 ± 69,88	361 ± 86,95
IC		587 ± 97,72	307 ± 50,21
IIC		471 ± 66,56	355 ± 76,22
IIAC	369 ± 16	427 ± 56,22 *	307 ± 74,70
IIA	504 ± 65,66	449 ± 2,05	323 ± 98,17
IIAD	532 ± 53,47	468 ± 35,79	321 ± 47,95
IID	762 ± 123,41	539 ± 68,56	335 ± 53,47 *
IIBD	621 ± 75,03	464 ± 52,20	313 ± 63,73 *
IIB	1094 ± 77,53	683 ± 104,65*	367 ± 97,83 *

Nota-se que as fibras IIBD e IID apresentaram diminuição significativa da área de secção transversa no grupo NEE em relação ao CON ( $p=0,00$ ); a área das fibras IIB diminuiu significativamente tanto no grupo EE quanto no NEE em relação ao CON ( $p=0,00$ ). No entanto, a área das fibras IIAC do grupo EE aumentaram significativamente ( $p=0,05$ ) em relação ao CON (Figura 7).



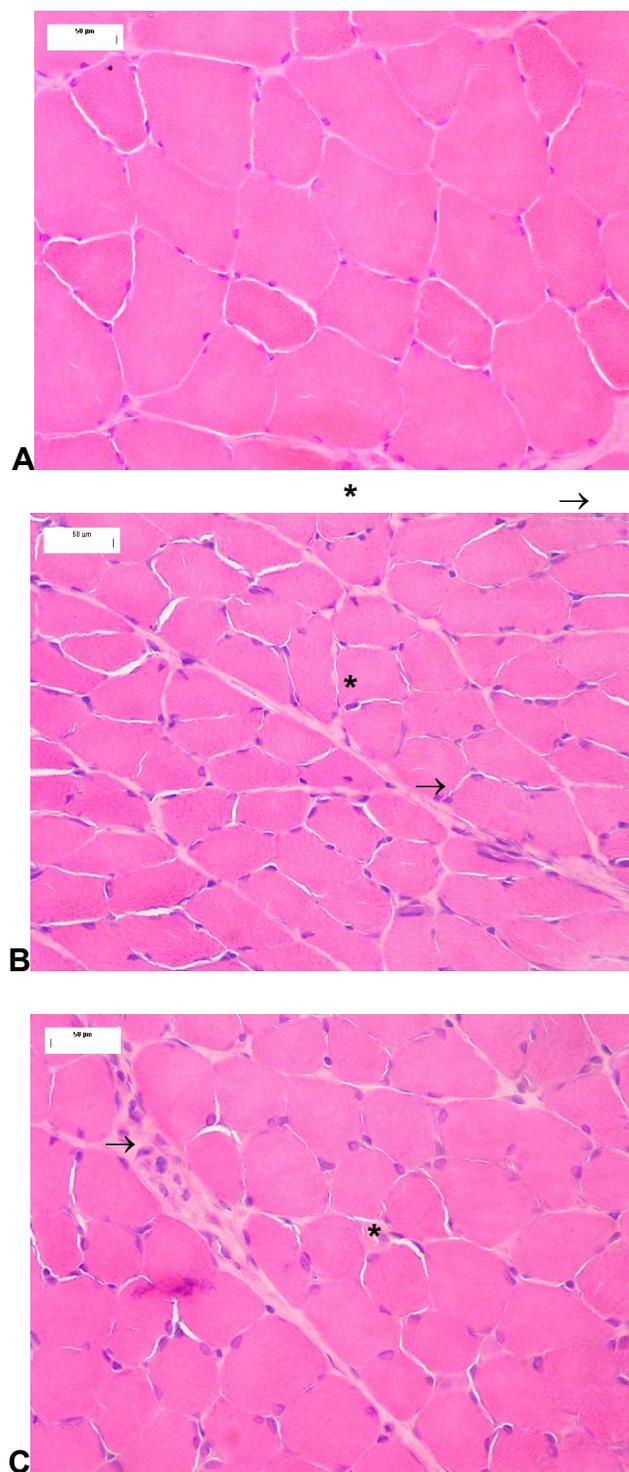
**Figura 7.** Área de secção transversa ( $\mu\text{m}^2$ ) dos diferentes tipos de fibras musculares nos 3 grupos experimentais: controle (CON), eletroestimulado (EE) e não-eletroestimulado (NEE); ( $n=6$ ;  $p < 0,05$ ). (\*) Difere significativamente do CON.

Quando a área média de secção transversa é analisada por grupo (figura 8), observa-se que o grupo NEE teve diferença significativa em relação ao grupo EE (Anexo A).



**Figura 8.** Área média de secção transversal do conjunto de fibras do músculo EDL ( $\mu\text{m}^2$ ) nos grupos controle (CON), eletroestimulado (EE) e não-eletroestimulado (NEE). (\*\*) Diferença significativa em relação ao EE ( $n=6$ ;  $p=0,00$ ).

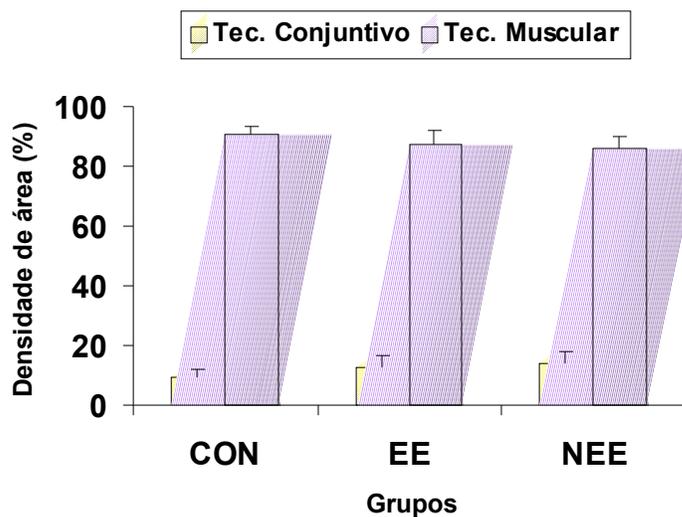
A análise histológica das fibras musculares pode ser observada na figura 9. O grupo CON (figura 9-A) mostra fibras musculares normais, de formato poligonal, com tecido perimisial normal. A figura 9-B mostra fibras de tamanho menor e contornos ovalados, caracterizando fibras denervadas (grupo EE), além de leve aumento de tecido conjuntivo. O grupo NEE (figura 9-C) também apresenta fibras de contornos ovalados e tamanho menor, com acúmulo de tecido perimisial.



**Figura 9:** Fotomicrografias de cortes transversais do músculo EDL, demonstrando o tamanho das fibras (\*) e o tecido conjuntivo perimisial (→). (A) grupo CON, (B) grupo EE, (C) grupo NEE. Coloração HE. Bar= 50 µm.

### 5.3.2 Densidade de área dos tecidos conjuntivo e muscular

O grupo CON apresentou média de densidade de área de 9,30%  $\pm$ 2,93 de tecido conjuntivo e 90,69%  $\pm$ 2,93 de tecido muscular (Anexo B). O grupo EE teve densidade de área de tecido conjuntivo de 12,59%  $\pm$ 4,34 e de tecido muscular de 87,40%  $\pm$ 4,34, enquanto que o grupo NEE apresentou 13,83%  $\pm$ 4,05 de tecido conjuntivo e 86,16%  $\pm$ 4,05 de tecido muscular. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os 3 grupos experimentais ( $p=0,14$ ), conforme mostra a figura 10.



**Figura 10.** Média da densidade de área (%) dos tecidos conjuntivo e muscular nos 3 grupos experimentais: controle (CON), eletroestimulado (EE) e não-eletroestimulado (NEE). Nota-se que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ( $p=0,14$ ,  $n=6$ ).

## 6 DISCUSSÃO

A inervação é considerada fator crítico na preservação das condições metabólicas e estruturais de um músculo. Após um processo de denervação seguem-se alterações bioquímicas, estruturais e funcionais, como acúmulo de tecido conjuntivo (SALONEN et al., 1985; VIGUIE et al., 1997; SCHMALBRUCH; LEWIS, 2000), atrofia (EKEN; GUNDERSEN, 1988; EBERSTEIN; EBERSTEIN, 1996; PETTE; STARON, 2001; POLACOW et al., 2003), alteração dos tipos de fibras musculares através da transição das cadeias pesadas de miosina (JAKUBIEC-PUKA et al., 1999; PETTE; STARON, 2001; LIEBER, 2002) e perda da funcionalidade muscular (BISHOP, 1982; FAWCET; KEYNES, 1990; WELCH, 1996, GORDON; SULAIMAN; BOYD, 2003).

Dependendo do grau de lesão nervosa a recuperação funcional poderá ser breve e completa ou demandará tempo mais prolongado, com recuperação total ou parcial. A axoniotmese é um tipo de lesão de grau médio, onde ocorre perda axonal e degeneração Walleriana, interrompendo a condução nervosa; no entanto, há preservação dos envoltórios conjuntivos do nervo, facilitando e direcionando o crescimento axonal diretamente ao músculo alvo (LUNDBORG, 1987; FAWCETT; KEYNES, 1990). A degeneração nervosa por esmagamento inicia-se por falta de suporte neurotrófico vindo do corpo celular e não pela entrada de substâncias deletérias no sítio da lesão, com no caso da neurotmeze, uma vez que na axoniotmese o perineuro é preservado (LUNN; BROWN; PERRY, 1990). Por este motivo, a

axoniotmese é considerada um bom modelo experimental de denervação (GORDON; SULAIMAN; BOYD, 2003).

Ao avaliar a reinervação muscular que se segue à axoniotmese, Marques (1992) observou que após 18 dias do esmagamento do nervo isquiático de camundongos, os sítios juncionais do músculo EDL apresentavam-se reinervados. Gorio et al. (1983) também apontaram que entre 21 e 25 dias após esmagamento nervoso em ratos, as junções neuromusculares encontram-se poliinervadas e, após 60 dias, estas mesmas junções estão monoinervadas, caracterizando o processo de eliminação de contatos sinápticos excessivos. Neuritos em regeneração se ramificam continuamente após deixarem o tronco nervoso e penetrarem no músculo, mas “imediatamente após a reinervação de uma fibra muscular, liberam neurotransmissores” (CARMIGNOTO et al., 1983), o que permite que o impulso nervoso seja liberado ao músculo. Jakubiec-Puka et al. (1990) também verificaram que 20 dias após o esmagamento, o músculo já se encontra reinervado e Zernicka et al. (2002) apontaram que entre 2 a 3 semanas após esmagamento nervoso em ratos, a recuperação funcional já é observada e, em 6 semanas, 80% da condução nervosa é recuperada. Tais dados justificam a duração do período de eletroestimulação neste estudo.

Desta forma a axoniotmese possibilitou a continuidade dos envoltórios conjuntivos do nervo neste estudo, direcionando os brotos axonais durante a regeneração nervosa. Quanto ao tempo de duração do procedimento experimental, é considerado suficiente para que a reinervação seja obtida no modelo animal utilizado (CARMIGNOTO et al., 1983; GORIO et al., 1983; GORDON; SULAIMAN; BOYD, 2003).

A denervação e conseqüente reinervação influenciam as propriedades e distribuição dos tipos de fibras musculares (IJKEMA-PASSEN; MEEK;

GRAMSBERGEN, 2001). A eletroestimulação pode influenciar o padrão fenotípico e o trofismo das fibras musculares, conforme demonstrado em diversos modelos experimentais (DELP; PETTE, 1994; PETTE; STARON, 2001; PETTE et al., 2002; ASMUSSEN et al., 2003). Entretanto, tais modelos de eletroestimulação referem-se somente à eletroestimulação crônica de baixa frequência (frequência de pulso não-tetânica, 6-24 hs/dia), não se utilizando padrões físicos de eletroestimulação, que consistem em sessões diárias de tratamento por curto período de tempo (menos de 1 hora por sessão). Ressalta-se também que a maioria dos trabalhos emprega a eletroestimulação crônica com parâmetros de estimulação similares a descargas de um motoneurônio lento, tanto em músculos lentos quanto em músculos rápidos (SKORJANC; TRAUB; PETTE, 1998; WINDISCH et al., 1998; PETTE et al., 2002), o que acarreta nestes últimos, aceleração da transição de fibras rápidas para lentas, além de aumento da densidade capilar e da perfusão de oxigênio (SKORJANC et al., 1998).

A manutenção das propriedades contráteis do músculo acontece quando a eletroestimulação simula o tipo de descarga que as fibras recebem normalmente de seu motoneurônio (EKEN; GUNDERSEN, 1988).

No presente estudo, optou-se por verificar a influência da eletroestimulação física de baixa frequência no músculo EDL, com parâmetros específicos para o EDL denervado (frequência de pulso tetânica: 50 Hz; largura de pulso adequada: 3ms) (LOW; REED, 2001). Esta proposta parte da necessidade de base teórica concreta para fundamentar a conduta na clínica fisioterapêutica, uma vez que a eletroestimulação física é prática freqüente no tratamento de lesões nervosas e ainda

não há relatos na literatura científica sobre benefícios adicionais ao músculo, além de minimizar a atrofia.

Várias análises foram realizadas a fim de se verificar amplamente os efeitos de tal procedimento. Inicialmente uma análise histoquímica permitiu observar a transição dos tipos de fibras perante a denervação, associada ou não à eletroestimulação. Em seguida, uma análise bioquímica (eletroforética) foi realizada para a verificação das MHC do músculo EDL após denervação, submetidos ou não à eletroestimulação, uma vez que os tipos de fibras musculares são relacionados à expressão das MHC, ou seja, a MHC $\beta$  corresponde à fibra tipo I, a MHCIIa corresponde à fibra tipo IIA e assim sucessivamente (STARON; PETTE, 1993).

Uma análise morfométrica também foi realizada, onde se verificou a área de secção transversa das fibras musculares e densidade de área dos tecidos conjuntivo e muscular, permitindo assim a observação de ambos frente a denervação e após eletroestimulação, ou seja, verificando o grau de atrofia apresentado pelas fibras musculares denervadas e a proliferação do tecido conjuntivo.

### **6.1 Análise histoquímica**

Analisando-se a porcentagem de fibras musculares do grupo EE e NEE em relação ao grupo controle no presente estudo, observa-se alterações significantes somente nas fibras IIB, IIBD e IIA, sendo que ambos os grupos denervados diferem do controle, mas não diferem entre si.

Carter et al. (1998) também provocaram denervação por axoniotmese no músculo EDL de ratos e observaram que após 50 dias de lesão, a transição das fibras

musculares não apresentou diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle: o perfil fenotípico do músculo denervado permaneceu o mesmo, com grande quantidade de fibras IIB e poucas fibras tipo I.

Os autores consideram que devido ao tipo de lesão, o número de axônios que atingiram seu alvo durante o processo de reinervação foi grande. Tal fato também pode ser explicado pelo tempo de estudo proposto, pois após 22 dias de esmagamento nervoso, as junções neuromusculares já se encontram poliinervadas (GORIO et al., 1983) e, provavelmente tenha havido recuperação do controle nervoso do músculo, ou seja, o músculo voltou a receber influência do neurônio motor e, com o tempo, pode ter recuperado suas propriedades histoquímicas e bioquímicas.

No presente estudo, o mesmo tipo de lesão provocou transição fenotípica. Talvez isso tenha sido observado porque a duração do estudo foi de 20 dias, tempo suficiente para a que reinervação acontecesse, porém insuficiente para a readequação das condições bioquímicas e histoquímicas do músculo. No entanto, nota-se que o protocolo de eletroestimulação não influenciou a transição fenotípica quando comparado ao grupo não-eletroestimulado.

Utilizando-se de um protocolo de eletroestimulação crônica (24hs/dia, 4 meses), num padrão de descarga similar ao do músculo sóleo (20 Hz; Ton= 10 segundos, Toff= 20 segundos), Windisch et al. (1998) observaram que a partir da 2<sup>a</sup>. semana de eletroestimulação do músculo denervado, a fibra híbrida IC começou a aparecer em pequenas porcentagens. Na 3<sup>a</sup>. semana houve desaparecimento das fibras tipo IIB, enquanto que as porcentagens das fibras tipo IIA e tipo I aumentaram 75% e 10%, respectivamente; as fibras tipo IID apresentaram queda acentuada neste mesmo período e desapareceram ao longo do estudo. Tais resultados demonstram que o

protocolo de eletroestimulação crônica acelerou o processo de transição fenotípica do músculo EDL, principalmente em relação às fibras IIB, IID e IIA. No presente estudo pode-se considerar que a denervação induziu a transição de rápida para lenta nas fibras do músculo EDL, pois houve diminuição da porcentagem de fibras IIA e IIB, com conseqüente aumento na porcentagem das fibras IIBD, nos 2 grupos denervados.

Contrastando com o período e intervalo da eletroestimulação utilizada por Windisch et al. (1998), a eletroestimulação, com características adequadas ao músculo EDL denervado utilizada neste estudo, não impediu a transição dos tipos de fibras musculares; no entanto, o padrão de eletroestimulação aplicado não acelerou esse processo.

Nix (1990) discute que a estimulação elétrica imitando o padrão de disparo do neurônio motor correspondente não substitui a influência do neurônio motor rápido, referindo-se à eletroestimulação intermitente (4 semanas, 100 Hz; média diária de 1.6 Hz) de alta freqüência em EDL denervado de coelhos. Tais achados corroboram o fato de que os efeitos da eletroestimulação fásica ainda são incertos no sentido de impedir a transição fenotípica, devido a grande variabilidade dos parâmetros normalmente empregados e das características bioquímicas e estruturais do músculo em estudo.

## **6.2 Análise bioquímica**

A análise bioquímica demonstrou decréscimo das MHCIIb, em ambos os grupos denervados, com concomitante aumento das MHCIIId, MHCIIa e MHCI, resultado similar ao de Germinario et al. (2002) que observaram após 7 dias de neurotmesa do músculo EDL, queda das MHCIIb e aumento das MHCIIId, IIa e I, apesar de não

significantes. Observaram também alterações no retículo sarcoplasmático e proteínas miofibrilares tipo IIB, além de perda de massa muscular. Essas alterações nas MHC decorrem da denervação em si. Do ponto de vista qualitativo, a eletroestimulação aplicada no presente estudo parece não ter modificado o ritmo de transição das fibras, quando se compara com o grupo NEE.

A expressão das MHC em músculos submetidos ou não à eletroestimulação foi verificada por Ausoni et al. (1990), a partir de um protocolo proposto por Eken e Gundersen (1988), em que a eletroestimulação simulava as descargas elétricas normais recebidas pelo músculo através do neurônio intacto. Os autores apontam que o músculo EDL normal possui predominantemente MHCIIb (73,1%), enquanto que este mesmo músculo denervado apresenta maiores quantidades de MHCIIa/IIId (79,2%). Dependendo da frequência de eletroestimulação imposta ao EDL denervado, a quantidade de MHC variava: com 20 Hz (padrão de músculo lento) o músculo apresentou 91,3% de MHCIIa/IIId; com 150 Hz (1 trem de pulso a cada 15 segundos), apresentou 89% de MHCIIa/IIId, e com 150 Hz (1 trem de pulso a cada 15 minutos) as proporções de MHCIIb e MHCIIa/IIId eram semelhantes (45,2% e 52,6%, respectivamente). Os autores ressaltam que a estimulação elétrica intensa (150 Hz com 1 trem de pulso a cada 15 segundos) afeta a expressão das MHC, aumentando a quantidade de MHCIIId e diminuindo a expressão de MHCIIa.

Cabe ressaltar que a eletroestimulação a 150 Hz (1 trem de pulso a cada 15 segundos) aplicada por Ausoni et al. (1990) propiciou ao músculo um total de 144.000 pulsos/dia, enquanto que a eletroestimulação a 150 Hz (1 trem de pulso a cada 15 minutos) proporcionou 2.400 pulsos/dia. No presente estudo, utilizando-se eletroestimulação de baixa frequência de modo fásico, o músculo EDL denervado

recebeu 90.000 pulsos/dia, totalizando 225 contrações, num período de 30 minutos. Devido aos resultados qualitativos deste estudo se assemelharem aos de Ausoni et al. (1990) em relação ao aumento das MHCIIId e decréscimo das MHCIIb, com a aplicação a 150 Hz (144.000 pulsos/dia), pode-se inferir que na prática clínica do fisioterapeuta a necessidade da eletroestimulação é suprida com períodos curtos de aplicação, através de eletrodos transcutâneos, não sendo necessária uma aplicação crônica, com implantação de eletrodos.

Jaschinski et al. (1998) presumiram que a transição das MHCIIb para MHCIIId, devido a aumento da atividade neuromuscular, ocorra sincronicamente com a transição das MHCIIId para MHCIIa, o que explicaria a manutenção dos níveis de MHCIIId; outra possibilidade apontada pelos autores é que as mudanças das MHC não sigam uma seqüência rigorosa (MHCIIb ↔ MHCIIId ↔ MHCIIa ↔ MHCI), mas ocorram continuamente, o que resulta na expressão de várias fibras híbridas. Tais suposições justificariam o resultado encontrado no presente estudo, que apontou decréscimo na quantidade de MHCIIb e aumento na quantidade de MHCIIa e MHCIIId.

Nota-se que as alterações das MHC ocorrem no músculo denervado, independentemente se ele foi eletroestimulado ou não. Entretanto, a eletroestimulação parece afetar de modo variável a porcentagem desta alteração, uma vez que os parâmetros utilizados (ex: frequência e duração diária) podem ser modificados de acordo com o objetivo do estudo. A forma de eletroestimulação utilizada neste experimento parece não ter influenciado de modo intenso a transição das MHC no músculo EDL denervado. Uma análise quantitativa poderia fornecer dados mais precisos para a comparação das MHC entre o grupo EE e NEE.

### 6.3 Análise morfométrica

Delp e Duan (1996) apontaram diferentes áreas de secção transversa entre as fibras musculares normais de ratos, as quais decresciam na seguinte ordem: IIB> IID> IIA> I, resultado semelhante ao grupo CON deste estudo.

Estudos com tempo de denervação prolongado no músculo EDL de rato (LU et al., 1997; WINDISCH et al., 1998) apontam maior atrofia nas fibras tipo II em relação às tipo I. Isto também foi observado neste estudo.

As fibras IID, IIBD e IIB do grupo NEE, quando analisadas individualmente sofreram atrofia significativa em relação ao CON, o que caracteriza o efeito de denervação sobre o trofismo das fibras. No entanto, apesar da área das fibras IIBD e IID do grupo EE não diferirem do grupo NEE, também não diferiram do CON, sugerindo que tal atrofia foi menos expressiva no grupo EE e, conseqüentemente, sinalizando alguma influência da eletroestimulação na preservação de seu trofismo. Quando o conjunto de tipos de fibras musculares é analisado por grupo, evidencia-se o papel da eletroestimulação em minimizar a atrofia muscular. Tais resultados são compatíveis com as observações de diversos autores (LIEBER; FERRO; HARGENS, 1988; PETTE; VRBOVÁ, 1999; LIEBER, 2002; DENNIS; DOW; FAULKNER, 2003; POLACOW et al., 2003; DOW et al., 2004), que admitem a eletroestimulação como fator de prevenção da atrofia muscular e manutenção das condições metabólicas do músculo.

A manutenção da massa muscular é representada pelo equilíbrio entre síntese e degradação de proteínas. Estudos recentes têm sugerido que a denervação promove ativação de enzimas proteolíticas, o que afeta esse equilíbrio e caracteriza a diminuição da área das fibras (LIEBER, 2002), e decréscimo na atividade de enzimas oxidativas mitocondriais, com queda no conteúdo de fosfato (ZERNICKA et al., 2002). Entretanto,

a eletroestimulação protegeria a mitocôndria e o retículo sarcoplasmático da degeneração, promovendo menor redução no diâmetro da célula muscular e na área de secção transversa (XU; TU; GU, 2003). Provavelmente esses efeitos fisiológicos da eletroestimulação tenham favorecido menor atrofia no grupo EE.

É interessante que, a despeito da diferença na área média de secção transversa observada entre os grupos EE e NEE, quando se analisa a densidade de área dos tecidos conjuntivo e muscular nos 3 grupos, não se observa diferença significativa. Apesar do aumento da densidade de área do tecido conjuntivo nos 2 grupos denervados, não houve diferença em relação ao CON.

Após uma lesão nervosa ocorre aumento de colágeno intramuscular, principalmente no endomísio e perimísio, enquanto que o epimísio permanece normalmente inalterado (JÓZSA et al., 1990). Tanto os estudos de Józsa et al. (1990) como de Fernandes (2004), que avaliaram os resultados da imobilização e denervação, respectivamente, no músculo sóleo, apontam aumento significativo do tecido conjuntivo, com concomitante diminuição do tecido muscular. Józsa et al. (1990) discutem que em músculos vermelhos a quantidade de capilares por fibra é maior em relação aos músculos brancos, citando que o músculo sóleo apresenta 2 capilares/fibra, enquanto que o músculo gastrocnêmio apresenta 0,9 capilares/fibra, sendo que o aumento do tecido conjuntivo é proporcional à queda da densidade capilar.

Por se tratar de um músculo branco, o músculo EDL analisado neste estudo, no aspecto de atrofia e proliferação conjuntiva, provavelmente não tenha apresentado diminuição significativa na área de secção transversa e densidade de área de tecido muscular e conjuntivo, o qual foi verificado no músculo sóleo, em função das diferentes características entre os músculos de contração rápida e lenta. O músculo sóleo é

antigravitacional, de contração lenta (predomínio de fibras vermelhas), cuja composição no rato é de: 84% fibras tipo I, 7% fibras tipo IIA, 9% fibras tipo IID e 0% fibras tipo IIB, enquanto que o EDL é um músculo gravitacional, de contração rápida (predomínio de fibras brancas), cuja composição no rato é de: 4% fibras tipo I, 20% fibras tipo IIA, 38% fibras tipo IID e 38% fibras tipo IIB (DELP; DUAN, 1996).

Assim, a eletroestimulação no sóleo denervado teria um papel mais efetivo que no EDL denervado, como foi demonstrado neste estudo.

Um aspecto que deve ser considerado a partir deste estudo são as vantagens da eletroestimulação na clínica em casos de lesão nervosa. Ainda há controvérsia sobre a influência da eletroestimulação sobre o processo de reparo nervoso. Da mesma forma que alguns trabalhos relatam que a eletroestimulação acelera o crescimento axonal (GORDON; SULAIMAN; BOYD, 2003), outros apontam efeitos inibitórios sobre o brotamento axonal (LIEBER, 2002; TAM; GORDON, 2003).

É urgente a necessidade de novas pesquisas que possam elucidar o papel da eletroestimulação no músculo denervado, seja no que se refere à preservação das condições musculares ou na influência sobre o processo de regeneração nervosa, visando a utilização segura deste recurso da Fisioterapia para promover a recuperação funcional e melhora da qualidade de vida dos pacientes.

Estudos com animais experimentais, como é o caso deste, podem subsidiar discussões e condutas voltadas à soluções de problemas clínicos.

## 7 CONCLUSÃO

O protocolo de eletroestimulação aplicado ao músculo EDL denervado:

- a) não influenciou a transição fenotípica das fibras;
- b) não desacelerou o processo de transição das MHC;
- c) minimizou a atrofia muscular conseqüente à denervação;
- d) não influenciou a proliferação de tecido conjuntivo após denervação.

Outros estudos são necessários para investigar também a influência da eletroestimulação no processo de regeneração nervosa.

## 8 BIBLIOGRAFIA

AL-MAJED, A. A. et al. Brief electrical stimulation promotes the speed and accuracy of motor axonal regeneration. **The Journal of Neuroscience**, [S.L.], v. 20, n. 7, p. 2602-2608, 2000.

ASMUSSEN, G. et al. Contractile properties, fiber types, and myosin isoforms in fast and slow muscles of hyperactive Japanese waltzing mice. **Experimental Neurology**, [S.L.], v. 184, p. 758-766, 2003.

AUSONI, S. et al. Expression of myosin heavy chain isoforms in stimulated fast and slow rat muscle. **The Journal of Neuroscience**, [S.L.], v. 10, n. 1, p.153-160, jan., 1990.

BAR, A.; PETTE, D. Three fast myosin heavy chain in adult rat skeletal muscle. **FEBS Letters**, [S.L.], v. 235, p. 153-155, 1988.

BEAR, M.; CONNORS, B. W.; PARADISO, M. A. **Neurociências: desvendando o sistema nervoso**. 2.ed. Porto Alegre: Artmed, 2002. 855p.

BISHOP, B. Responses to lesions in the peripheral nervous system. **Physical Therapy, USA**, v. 62, n. 9, p. 1275-1282, sept., 1982.

BRODAL, A. **Anatomia neurológica com correlações clínicas**. 3.ed. São Paulo: Roca, 1997. 888p.

BRUSHART, T. M. et al. Electrical stimulation promotes motoneuron regeneration without increasing its speed or conditioning the neuron. **The Journal of Neuroscience**, [S.L.], v. 22, n. 15, p. 6631-6638, 2002.

CARMIGNOTO et al. Muscle reinnervation- I. **Neuroscience**, [S.L.], v.8, p.393-401, 1983.

CARTER, A-J. et al. Changes in muscle cytoarchitecture after peripheral nerve injury and repair. **The journal of hand surgery**, Great Britain, v. 23B, n. 3, p. 365-369, 1998.

DECHERCHI, et al. Muscle electrostimulation and functional recovery of a denervated muscle. **Science and Sport**, [S.L.], v. 18, p. 253-263, 2003.

DELPE, M. D.; DUAN, C. Composition and size of type I, IIA, IID/X and IIB fibers and citrate synthase activity of rat muscle. **Journal of Applied Physiology**, [S.L.], v. 80, n. 1, p. 261-270, 1996.

DELP, M. D.; PETTE, D. Morphological changes during fiber type transitions in low-frequency-stimulated rat fast-twitch muscle. **Cell & Tissue Research**, [S.L.], v. 277, p. 363-371, 1994.

DENNIS, R. G.; DOW, D. E.; FAULKNER, J. A. An implantable device for stimulation of denervated muscles in rats. **Medical Engineering & Physics**, [S.L.], v. 25, p. 239-253, 2003.

DOW, D. E.; DENNIS, R. G.; FAULKNER, J. A. Electrical stimulation attenuates denervation and age-related atrophy in extensor digitorum longus muscles of old rats. **The Journal of Gerontology**, [S.L.], v. 4, p. 416-424, 2005.

DOW, D. E. et al. Number of contractions to maintain mass and force of a denervated rat muscle. **Muscle and Nerve**, [S.L.], v. 30, p. 77-86, 2004.

EBERSTEIN, A.; EBERSTEIN, S. Electrical stimulation of denervated muscle: is it worthwhile? **Medicine and Science in Sports and Exercise**, New York, v. 28, n. 12, p. 1463-1469, 1996.

EGGINTON, S.; HUDLICKÁ, O. Selective long-term electrical stimulation of fast fibers increases capillary supply but not oxidative enzyme activity in rat skeletal muscles. **Experimental Physiology**, [S.L.], v. 85, n. 5, p. 567-574, 2000.

EKEN, T.; GUNDERSEN, K. Electrical stimulation resembling normal motor-unit activity: effects on denervated fast and slow rat muscles. **Jornal of Physiology**, Great Britain, v. 402, p. 651-669, 1988.

FAWCETT, J. W.; KEYNES, R. J. Peripheral nerve regeneration. **Annual Review Neuroscience**, [S.L.], n. 13, p. 43-60, 1990.

FERNANDES, K. C. B. G. **Eletroestimulação de baixa frequência e o perfil bioquímico e morfométrico do músculo sóleo denervado de ratos**. Piracicaba, 2004. 52p. (Tese de mestrado – Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade Metodista de Piracicaba).

GERMINARIO, E. et al. Early changes of type 2B fibers after denervation of rat EDL skeletal muscle. **Journal of Applied Physiology**, [S.L.], v. 92, p. 2045-2052, 2002.

GHALIB, N. et al. Morphometric analysis of early regeneration of motor axons through motor and cutaneous nerve grafts. **Annals of Anatomy**, [S.L.], v. 183, p. 363-368, 2001.

GORDON, T.; SULAIMAN, O.; BOYD, G. Experimental strategies to promote functional recovery after nerve injuries. **Journal of the Peripheral Nervous System**, [S.L.], v. 8, p. 236-250, 2003.

GORIO, A. et al. Muscle reinnervation II: sprouting, synapse formation and repression. **Neuroscience**, [S.L.], v. 8, n. 3, p. 403-416, 1983.

GUNDERSEN, K.; EKEN, T. The importance of frequency and amount of electrical stimulation for contractile properties of denervate rat muscles. **Acta Physiologica Scandinavica**, [S.L.], v. 145, p. 49-57, 1992.

GUTH, L.; SAMAHA, F. J. Procedure for the histochemical demonstration of actomyosin ATPase. **Experimental Neurology**, [S.L.], v. 28, p. 365-367, 1970.

HÄMÄLÄINEN, N.; PETTE, D. The histochemical profiles of fast fiber types IIB, IID and IIA in skeletal muscles of mouse, rat and rabbit. **The Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, [S.L.], v. 41, n. 5, p. 733-743, 1993.

HEATON, J. T.; KOBLER J. B. Use of muscle fibrillation for tracking nerve regeneration. **Muscle and Nerve**, [S.L.], v. 31, n. 2, p. 235-41, 2005.

IJKEMA-PAASSEN, J.; MEEK, M. F.; GRAMSBERGEN, A. Muscle differentiation after sciatic nerve transection and reinnervation in adult rats. **Annals of Anatomy**, [S.L.], v. 183, p. 369-377, 2001.

JAKUBIEC-PUKA, A. Changes in myosin and actin filaments in fast skeletal muscle after denervation and self-reinnervation. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Great Britain, v. 102-A, n. 1, p. 93-98, 1992.

JAKUBIEC-PUKA, A. et al. Contents of myosin heavy chains in denervated slow and fast rat leg muscles. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Great Britain, v. 122-B, p. 355-362, 1999.

JAKUBIEC-PUKA, A. et al. Myosin heavy chain isoform composition in striated muscle after denervation and self-reinnervation. **European Journal of Biochemistry**, [S.L.], v. 193, p. 623-628, 1990.

JAKUBIEC-PUKA, A.; KULESKA-LIPKA, D.; KRAJEWSKI, K. The contractile apparatus of striated muscle in the course of atrophy and regeneration. **Cell and Tissue Research**, [S.L.], v. 220, p. 651-663, 1981.

JASCHINSKI, F. et al. Changes in myosin heavy chain mRNA and protein isoforms of rat muscle during forced contractile activity. **American Journal of Physiology**, [S.L.], v. 274, p. C365-C370, 1998.

JÓZSA, L. et al. The effect of tenotomy and immobilisation on intramuscular connective tissue. **The Journal of Bone and Joint Surgery**, [S.L.], v. 72-B, n.2, p.293-297, 1990.

KERN, H. et al. Denervated muscles in humans: limitations and problems of currently used functional electrical stimulation training protocols. **Artificial Organs**, [S.L.], v. 26, n. 3, p. 216-218, 2002.

LIEBER, R. L. **Skeletal muscle structure, function & plasticity**. 2.ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 2002. 369p.

LIEBER, R. L.; FERRO, T. D.; HARGENS, A. R. Differential effects of 10 Hz and 50Hz stimulation of the tibialis anterior on the ipsilateral, unstimulated soleus muscle. **Experimental Neurology**, [S.L.], v. 100, p. 426-435, 1988.

LOW, J.; REED, A. **Eletroterapia explicativa**. 3.ed. São Paulo: Manole, 2001. 472p.

LU, D. X.; HUANG, S. K.; CARLSON, B.M. Electron microscopic study of long-term denervated rat skeletal muscle. **The Anatomical Record**, [S.L.], v. 248, p. 355-365, 1997.

LUNDBORG, G. Nerve regeneration and repair: a review. **Acta Orthopedic Scandinavica**, [S.L.], n. 58, p. 145-169, 1987.

LUNDY-ECKMANN, L. **Neurociência: fundamentos para a reabilitação**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. 347p.

LUNN, E. R.; BROWN, M. C.; PERRY, V.H. The pattern of axonal regeneration in the peripheral nervous system varies with different types of lesion. **Neuroscience**, [S. L.], v. 35, n. 1, p. 157-165, 1990.

MARQUES, M. J. **Estudo ultra-estrutural da junção neuromuscular após regeneração nervosa no interior de próteses tubulares**. São Paulo, 1992. 139p. (Tese de doutorado - Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo).

MARTIN, T. P. et al. Influence of electrical stimulation on the morphological and metabolic properties of paralyzed muscle. **Journal of Applied Physiology**, [S.L.], v. 72, n. 4, p. 1401-1406, 1992.

NICOLAIDIS, S. C.; WILLIAMS, H. B. Muscle preservation using an implantable electrical system after nerve injury and repair. **Microsurgery**, [S.L.], v. 21, p. 241-247, 2001.

NIX, W. A.. Effects of intermittent high frequency electrical stimulation on denervated EDL muscle of rabbit. **Muscle and Nerve**, [S. L.], v. 13, p. 580-585, 1990.

NIX, W. A.; HOPF, H. C. Electrical stimulation of regenerating nerve and its effect on motor recovery. **Brain Research**, [S.L.], v. 272, p. 21-25, 1983.

NOLAN, F. M. Conductive differences in electrodes used with transcutaneous electrical nerve stimulation. **Physical Therapy**, [S.L.], v. 71, n. 10, p. 746-751, 1991.

PÉREZ, M. et al. Effects of transcutaneous short-term electrical stimulation on m. vastus lateralis characteristics of healthy young men. **Pflügers Archives**, [S.L.], v. 443, p. 866-874, 2002.

PERRY, J. D. Electrodiagnosis in musculo-skeletal disease. **Best Practice and Research Clinical Rheumatology**, [S.L.], v.19, n. 3, p. 453-466, 2005.

PETTE, D.; STARON, R. S. Transitions of muscle fiber phenotypic profiles. **Histochemistry and Cell Biology**, [S.L.], v. 115, p. 359-372, 2001.

PETTE, D. et al. Partial fast-to-slow conversion of regenerating rat fast-twitch muscle by chronic low-frequency stimulation. **Journal of Muscle Research and Cell Motility**, Netherlands, v. 23, p. 215-221, 2002.

PETTE, D.; VRBOVÁ, G. What does chronic stimulation teach us about muscle plasticity? **Muscle & Nerve**, [S.L.], v. 22, p. 666-677, 1999.

POLACOW, M. L. O. et al. Estudo morfométrico do músculo sóleo denervado de ratos tratados pela associação de metformina e estimulação elétrica. **Revista Brasileira de Fisioterapia**, São Carlos, v. 7, n. 1, p. 77-84, 2003.

SALONEN, V. et al. Changes in intramuscular collagen and fibronectin in denervation atrophy. **Muscle & Nerve**, [S.L.], v. 8, p. 125-131, 1985.

SCHAVLAKADZE et al. Insulin-like growth factor I slows the rate of denervation induced skeletal muscle atrophy. **Neuromuscular disorders**, [S.L.], v. 15, n.2, p. 139-146, 2005.

SCHMALBRUCH, H.; LEWIS, D. M. Dynamics of nuclei of muscle fibers and connective tissue cells in normal and denervated rat muscles. **Muscle & Nerve**, [S.L.], v. 23, p. 617-626, 2000.

SKORJANC, D.; TRAUB, I.; PETTE, D. Identical responses of fast muscle to sustained activity by low-frequency stimulation in young and aging rats. **Journal of Applied Physiology**, [S.L.], v. 85, n. 2, p. 437-441, 1998.

SKORJANC, D. et al. Sequential increases in capillarization and mitochondrial enzymes in low-frequency –stimulated rabbit muscle. **American Journal of Physiology**, [S.L.], v.274, C810-C818, 1998.

STARON, R. S.; PETTE, D. The continuum of pure and hybrid myosin heavy chain based fiber types in rat skeletal muscle. **Histochemistry**, [S.L.], v. 100, p. 149-153, 1993.

STARON, R. S. et al. Fiber type composition of four hindlimb muscles of adult Fischer 344 rats. **Histochemistry and Cell Biology**, [S.L.], v. 111, p. 117-123, 1999.

STOLL, G.; JANDER, S.; MYERS, R.R. Degeneration and regeneration on the peripheral nervous system: from Augustus Waller's observations to neuroinflammation. **Journal of Peripheral Nervous System**, [S.L.], v. 7, p. 13-27, 2002.

TAM, S.L. et al. Increased neuromuscular activity reduces sprouting in partially denervated muscles. **The Journal of Neuroscience**, [S.L.], v. 21, n. 2, p. 654-667, 2001.

TAM, S. L.; GORDON, T. Neuromuscular activity impairs axonal sprouting in partially denervated muscles by inhibiting bridge formation of perisynaptic Schwann cells. **Journal of Neurobiology**, [S.L.], v. 57, p. 221-234, 2003.

VIGUIE, C. A. et al. Quantitative study of the effects of long-term denervation on the extensor digitorum longus muscle of the rat. **The Anatomical Record**, [S.L.], v.248, p.346-54, 1997.

XU, J. G.; TU, Y. Q.; GU, Y.D. Effect of electric stimulation on denervated skeletal muscle atrophy. **Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi**, [S.L.], v. 17, n.5, p. 396-399, 2003.

WINDISCH, A. et al. Fast to slow transformation of denervated and electrically stimulated rat muscle. **Journal of Physiology**, [S.L.], v. 510-2, p. 623-632, 1998.

WELCH, J. Peripheral nerve injury. **Seminars in Veterinary Medicine and Surgery (Small Animal)**, [S.L.], v. 11, n. 4, p. 273-284, nov., 1996.

WOODCOCK, A. H.; TAYLOR, P. N. Long pulse biphasic electrical stimulation of denervated muscle. **Artificial Organs**, [S.L.], v. 23, n. 5, p. 457-459, 1999.

ZEALEAR, D. L. et al. The effects of chronic electrical stimulation on laryngeal muscle reinnervation. **Journal for Oto-Rhyno-Laryngology**, [S.L.], v. 62, p. 87-95, 2000.

ZEALEAR, D. L. et al. Electrical stimulation of a denervated muscle promotes selective reinnervation by native over foreign motoneurons. **Journal of Neurophysiology**, [S.L.], v. 87, p. 2195-2199, 2002.

ZERNICKA, E. et al. Time course of changes in lipoprotein lipase activity in rat skeletal muscles during denervation-reinnervation. **Journal of Applied Physiology**. [S.L.], v. 92, p. 535-540, 2002.

## 9 ANEXOS

**ANEXO A:** Área média de secção transversa ( $\mu\text{m}^2$ ) por grupo experimental: controle (CON), eletroestimulado (EE) e não-eletroestimulado ( $n=6$ ;  $p=0,00$ ). (\*\*) Difere significativamente em relação ao EE.

CON	EE	NEE
621,85 $\pm$ 223,99	516,66 $\pm$ 78,18	332,11 $\pm$ 22,15**

**ANEXO B:** Tabela de valores médios da densidade de área (em %) dos tecidos conjuntivo e muscular no músculo EDL nos grupos controle (CON), eletroestimulado (EE) e não-eletroestimulado ( $n=6$ ).

Grupos	Tec. Conjuntivo	Tec. Muscular
CON	9,30 $\pm$ 2,93	90,69 $\pm$ 2,93
EE	12,59 $\pm$ 4,34	87,40 $\pm$ 4,34
NEE	13,83 $\pm$ 4,05	86,16 $\pm$ 4,05