

Artigo original**Efeito da estimulação elétrica transcutânea em alta frequência no músculo tríceps sural após esmagamento do nervo ciático em ratos Wistar*****Effect of high frequency transcutaneous electrical stimulation on triceps sural after sciatic nerve injury in Wistar rats***

Fabiana Abrahão, Rubens Meyer, Nathália Thalita Carvalho Vialle, Thatiane Gazzoli Farias, Raul Oscar Feitosa Marinho, Camila Madeira Tavares Lopes, Januário Gomes Mourão e Lima

.....
Laboratório de Morfologia da UNISUAM

Resumo

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da estimulação elétrica transcutânea de alta frequência nas alterações morfológicas do músculo tríceps sural depois da lesão nervosa periférica do nervo ciático em ratos. Quarenta ratos foram divididos em 4 grupos: controle negativo (sem lesão), controle positivo (com lesão), lesados e tratados com 4 mA e lesados e tratados com 6 mA. Entre o grupo controle positivo ($5,7 \pm 2,4$) e controle negativo ($36,3 \pm 6,15$) observamos uma diminuição significativa na densidade relativa de tecido muscular e conjuntivo, demonstrando a efetividade do modelo experimental. Entre os grupos tratados não houve diferença estatística, entretanto, ocorreu um aumento significativo na densidade relativa entre os grupos tratados com 4 mA ($16,35 \pm 0,46$) e 6 mA ($14,4 \pm 2,63$) em relação ao grupo controle positivo ($5,7 \pm 2,4$), indicando a diminuição da proliferação de tecido conjuntivo nas amostras analisadas. Nossos resultados indicam que a estimulação elétrica transcutânea de alta frequência, dentro desses parâmetros, foi efetiva na diminuição da proliferação de tecido conjuntivo no grupo muscular tríceps sural de ratos após lesão nervosa periférica por esmagamento do nervo ciático.

Palavras-chave: nervo ciático, estimulação elétrica transcutânea, tecido conjuntivo, ratos wistar.

Abstract

The aim of this study was to evaluate the effect of the transcutaneous electric stimulation of high frequency in the morphological alterations of the triceps surae muscle after peripheral nervous injury of the sciatic nerve in rats. Forty rats were divided into 4 groups: negative control (without injury), positive control (with injury), injured and treated with 4 mA and injured and treated with 6 mA. Between the positive control group (5.7 ± 2.4) and negative control group (36.3 ± 6.15) it was observed a significant decrease in relative density of muscular tissue and conjunctive tissue, showing the effectiveness of the experimental model. We did not observe difference between the treated groups. However, a significant increase in the relative density occurred between the treated groups with 4 mA (16.35 ± 0.46) and 6 mA (14.4 ± 2.63) in relation to the positive control group (5.7 ± 2.4), indicating the reduction of the conjunctive tissue proliferation in the analyzed samples. Our results indicate that the transcutaneous electric stimulation of high frequency, within these parameters, was effective in reducing conjunctive tissue proliferation in triceps surae muscle of rats after peripheral nervous injury for crushing of the sciatic nerve.

Key-words: sciatic nerve, transcutaneous electric stimulation, conjunctive tissue, Wistar rats.

Recebido em 10 de dezembro de 2007; aceito em 22 de janeiro de 2008.

Endereço para correspondência: Januário G. Mourão e Lima, Laboratório de Morfologia da UNISUAM, Avenida Paris, 72, 21041-020 Rio de Janeiro RJ, E-mail: januario@unisuam.edu.br

Introdução

Após lesões totais de um nervo periférico, as vias neurais sofrem degeneração ou atrofia, incluindo a perda das conexões centrais. Em lesões parciais é possível o restabelecimento de funções previamente perdidas. O grau de recuperação neural depende de alguns fatores como: número de axônios lesados, efeito do edema provocado pelo esmagamento e finalmente a manutenção ou não da membrana basal que protege os nervos (epineuro) [1].

Um modelo experimental amplamente utilizado para a reprodução de lesões nervosas periféricas é a lesão nervosa periférica por esmagamento [2,3], que é classificada como axoniotmese, sendo considerada uma lesão parcial que acarreta em degeneração walleriana pela ruptura do axônio, porém, a membrana basal, o tecido conectivo e as células satélites são preservados. Levando a um melhor prognóstico de recuperação funcional [4,5].

Esse tipo de lesão periférica provoca alterações no nervo lesionado e também no músculo desnervado e essas alterações atingem tanto a estrutura quanto a função muscular. De acordo com Ashley *et al.* [6], a desnervação carrega em efeitos deletérios no sistema muscular como a diminuição do trofismo e acúmulo excessivo de tecido gorduroso e conjuntivo nos interstícios das células [7].

Algumas das principais alterações morfológicas que ocorrem nos músculos são atrofia muscular, que é caracterizada pela diminuição da massa muscular [8,9], diminuição da área da secção transversa das fibras [10,11] e aumento do tecido conjuntivo ao redor da fibra muscular [12,13]. O acúmulo desse tecido conjuntivo intersticial é responsável, por exemplo, pela diminuição da troca de substâncias essenciais para o trofismo muscular, entre o leito vascular e as fibras musculares [14]. Esse tecido também atua afetando a extensão do crescimento axonal durante a reinervação, quando as fibras colágenas atuam como barreira fisiológica ao crescimento axonal, e dificultando a difusão de fatores de crescimento nervoso liberados após desnervação [15], refletindo, dessa forma, a incapacidade funcional causada pela desnervação.

Várias são as terapias indicadas para o tratamento de lesões periféricas com o intuito de preservação do trofismo muscular e regeneração das fibras nervosas [16-18], sendo uma delas o uso da eletroestimulação de baixa frequência [19,20]. Entretanto a estimulação elétrica transcutânea (TENS) de alta frequência geralmente é apontada para o tratamento de dores crônicas e agudas [21,22] e atualmente na regeneração de tecido cutâneo [23] indicando propriedades regenerativas desse tipo de corrente, devido possivelmente ao aumento do fluxo sanguíneo na área de aplicação quando utilizada na frequência de 80 Hz.

Ante esses fatos, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da estimulação elétrica transcutânea de alta frequência nas alterações morfológicas musculares do grupo muscular tríceps sural decorrentes da lesão nervosa periférica do nervo ciático em ratos.

Material e métodos

Animais

Foram utilizados 40 ratos Wistar (machos, peso corporal de 200 a 250 g) provenientes da BioCampo 2000 Produtos Biológicos Ltda. Mantidos sob condições de temperatura entre 25 e 28°C, ciclo de luz definido em 12 h de claro e 12 h de escuro e livre acesso à ração e água. Os animais foram divididos em quatro grupos experimentais. Grupo Controle Negativo (CN), que não sofreu a lesão do nervo Ciático; Grupo Controle Positivo (CP), animais que sofreram lesão no nervo Ciático; Grupo com lesão no nervo Ciático e tratado com 4 mA (4mA); e o Grupo com lesão no nervo Ciático e tratado com 6 mA (6mA). Os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da UNISUAM (CEPan/UNISUAM) sob o nº 003/07.

Protocolo experimental

Os animais foram sedados com Diazepan (5 mg i.p.) e anestesiados com Tiopental (20 mg/kg i.p.). Após a anestesia foi realizada cirurgia para exposição do nervo Ciático na região póstero-lateral da coxa direita, e esmagando o nervo com auxílio de uma pinça de relojoeiro por 30 segundos. Os animais dos grupos 4 mA e 6 mA foram tratados com dez sessões de TENS por trinta minutos por sessão, com uma frequência de 80 Hz, densidade de 1,6 (Grupo 4 mA) e 2,4 (Grupo 6 mA), a área do eletrodo era de 2,5 cm². Após o tratamento os animais foram sacrificados com alta dose de Tiopental (i.p.).

Análise histopatológica

Após o sacrifício foi realizada perfusão por meio de uma cânula intracardíaca com solução de salina e heparina (1:10) para a retirada do sangue. Posteriormente os animais receberam paraformaldeído tamponado a 4% pela mesma via. Em ambos os procedimentos os frascos com as soluções ficaram elevados a 110 cm de altura para que a pressão hidrostática reproduzisse as condições fisiológicas da circulação sanguínea. O músculo Tríceps Sural foi retirado e fixado em formol tamponado a 10% por 24 horas, desidratado em soluções crescentes de etanol, clarificado em xileno e incluídos em parafina. Cortes histológicos de 5 µm de espessura foram realizados transversalmente, utilizando-se blocos de parafina contendo fragmentos do tecido muscular. Para a análise dos aspectos gerais do tecido muscular e quantificação da área de fibras musculares e tecido conjuntivo, os cortes histológicos foram corados com hematoxilina-eosina, analisados em microscópio de luz (BX51, Olympus), e fotografados através de câmera digital (C-7070, Olympus).

Análise da densidade relativa de tecido muscular e tecido conjuntivo

Foram realizadas cinco fotos de áreas aleatórias por lâmina. A quantificação de tecido muscular e tecido conjuntivo foi feita através do software Image Pro Plus 4.0. Posteriormente, os valores, em μm^2 , de área de tecido muscular foram divididos pelos valores de área de tecido conjuntivo.

Análise estatística

Todos os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) e analisados estatisticamente através de análise de variância (ANOVA), seguida de teste de comparação múltipla de Newman-Keuls-Student. Para ambos os testes, os valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

Resultados

Os resultados encontrados estão representados na Figura 1. Podemos observar uma diminuição significativa da relação entre as fibras musculares e o tecido conjuntivo nos grupos controle positivo, tratados com 4 mA e com 6 mA, em relação ao grupo controle negativo. Entretanto, essa relação mostra uma significativa melhora nos dois grupos que receberam tratamento com o TENS.

Nos animais do grupo controle negativo (CN), observamos uma estrutura muscular normal quanto à quantidade de fibras musculares e de tecido conjuntivo ao seu redor (figura 2A), o grupo controle positivo (CP) apresentou um aumento na área de tecido conjuntivo com visível diminuição das fibras musculares (figura 2B). Observamos que após o tratamento com TENS, os grupos 4 mA e 6 mA (figura 2C e 2D, respectivamente) apresentaram uma importante reversão da relação entre as fibras musculares e o tecido conjuntivo. Não observamos diferenças importantes entre os dois grupos tratados.

Figura 1 - Quantificação da relação entre a área de fibras musculares e a área de tecidos conjuntivo. Grupo Controle Negativo (CN); Grupo Positivo (CP); Grupo tratado com 4mA (4mA); Grupo tratado com 6mA (6mA) * $p < 0,05$ em comparação com animais controle. * $p < 0,05$ em relação ao Grupo CN; # $p < 0,05$ em relação aos Grupos 4mA e 6mA.

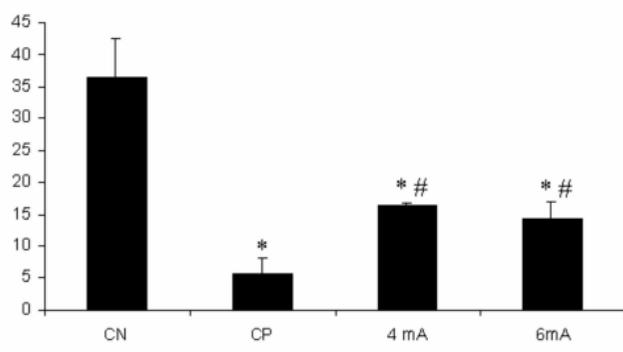
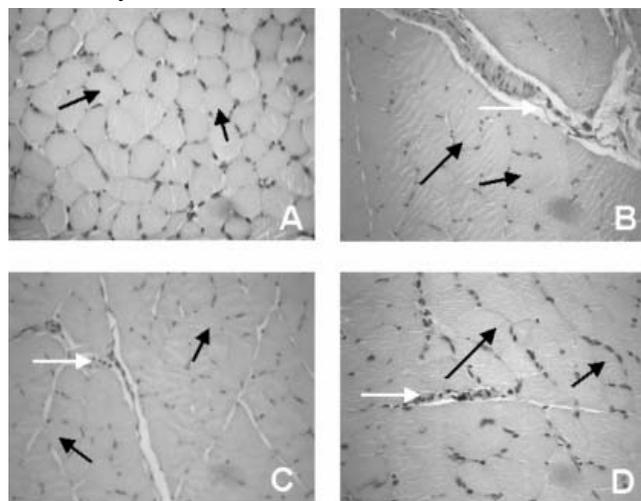


Figura 2 - Fotomicrografias do m. Triceps Sural de ratos corados com hematoxilina e eosina (aumento de 400X). A. Grupo Controle Negativo (CN), B. Grupo Controle Positivo (CP); C. Grupo Tratado com 4mA (4mA); e D. Grupo Tratado com 6mA (6mA). As setas brancas indicam as fibras musculares. As setas pretas mostram o tecido conjuntivo.



Discussão

A integridade da inervação é um fator crítico para a preservação das características estruturais dos músculos e o tipo de lesão determina o nível das alterações decorrentes assim como o grau de recuperação funcional. A lesão nervosa por esmagamento é propícia para esse tipo de estudo, pois possibilita o rompimento do suporte neurotrófico sem romper o perineuro, fato que possibilita o crescimento axonal até o músculo alvo [2].

Perante o exposto, os resultados encontrados em relação ao grupo CP e CN demonstram a efetividade do modelo experimental utilizado para a realização da lesão nervosa do nervo ciático sendo que seus valores apresentam uma diminuição estatisticamente significativa entre os grupos, corroborando com os resultados encontrados por Schmalbruch *et al.* [14] que afirma que o acúmulo de tecido conjuntivo tanto na região perifascicular quanto no interstício é uma alteração própria da presença de lesão nervosa periférica.

A corrente empregada nos grupos tratados foi utilizada nas intensidades de 4 mA e 6 mA, os resultados não indicaram uma diferença significativa entre os grupos tratados, entretanto, um aumento estatisticamente significativo foi encontrado na densidade relativa entre os grupos tratados e o grupo CP indicando a ocorrência de um declínio na taxa de proliferação de células de tecido conjuntivo no grupo muscular analisado. Durante as sessões foi possível observar discretas contrações musculares, que possivelmente interferiram nos resultados apresentados. Além disso, a eletroestimulação de alta frequência ocasiona um aumento do fluxo sanguíneo [24,25] o que possivelmente acarreta em uma melhor nutrição celular.

Esse retardo na proliferação do tecido conjuntivo assinala um possível efeito benéfico do uso da eletroestimulação de

alta frequência com os parâmetros utilizados. De acordo com Józsa *et al.* [26] ocorre um aumento do tecido conjuntivo e diminuição do tecido muscular após os processo de imobilização e de desnervação no músculo sóleo, que pertence ao grupo tríceps sural. Conseqüentemente, uma diminuição dessa taxa de crescimento de tecido conjuntivo infere que exista uma influência positiva ou na preservação das condições musculares ou no processo de regeneração das fibras nervosas, indicando novas possibilidades clínicas para o uso dessa corrente que vai além da ação analgésica habitual, focando objetivamente na recuperação funcional devido à melhora das condições morfológicas musculares.

Conclusão

A estimulação elétrica transcutânea de alta frequência, dentro dos parâmetros utilizados, foi efetiva na diminuição da proliferação de tecido conjuntivo no grupo muscular tríceps sural de ratos, inferindo um possível efeito benéfico do uso dessa corrente em lesões nervosas periféricas com o objetivo de minimizar a disfunção funcional auxiliando na recuperação funcional de sujeitos acometidos por essa patologia.

Referências

- Seddon HJ. Surgical disorders of the peripheral nerves. 2nd ed. Edinburgh: Churchill Livingstone; 1975.
- Bain JR, Mackinnon SE, Hunter DA. Functional evaluation of complete sciatic, peroneal, and posterior tibial nerve lesions in the rat. *Plast Reconstr Surg* 1989;83(1):129-38.
- Bridge PM, Ball DJ, Mackinnon SE, Nakao Y, Brandt K, Hunter DA, Hertl C. Nerve crush injuries – a model for axonotmesis. *Exp Neurol* 1994;127(2):284-90.
- Hare GMT, Evans PJ, Mackinnon SE, Best TJ, Bain JR, Szalai JB, Hunter DA. Walking track analysis: a long-term assessment of peripheral nerve recovery. *Plast Reconstr Surg* 1992;89(2):251-8.
- De Medinacelli L, Freed WJ, Wyatt RJ. An index of the functional condition of rat sciatic nerve based on measurements made from walking tracks. *Exp Neurol* 1982;77(3):663-443.
- Ashley Z, Sutherland H, Lanmüller H, Russold ME, Unger E, Bijak M, et al. Atrophy, but not necrosis, in rabbit skeletal muscle denervated for periods up to one year. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007;292(1):440-51.
- Muller FL, Song W, Jang YC, Liu Y, Sabia M, Richardson A, Van Remmen H. Denervation-induced skeletal muscle atrophy is associated with increased mitochondrial ROS production. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2007;293(3):1159-68.
- Jakubiec-Puka A, Ciechomska I, Morga J, Matusiak A. Contents of myosin heavy chains in denervated slow and fast rat leg muscles. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 1999;122(3):355-62.
- Zernicka E, Smol E, Langfort J, Górecka M. Time course of changes in lipoprotein lipase activity in rat skeletal muscles during denervation-reinnervation. *J Appl Physiol* 2002;92:535-40.
- Burkholder TJ, Fingado B, Baron S, Lieber RL. Relationship between muscle fiber types and muscle architectural properties in the mouse hindlimb. *J Morphol* 1994;221(2):177-90.
- Asmussen G, Schmalbruch I, Soukup T, Pette D. Contractile properties, fiber types, and myosin isoforms in fast and slow muscles of hyperactive japanese waltzing mice. *Exp Neurol* 2003;184(2):758-66.
- Salonen V, Lehto M, Kalimo H, Penttinen R, Aro H. Changes in intramuscular collagen and fibronectin in denervation atrophy. *Muscle Nerve* 1985;8(2):125-31.
- Lu DX, Huang SK, Carlson BM. Electron microscopic study of long-term denervated rat skeletal muscle. *Anat Rec* 1997;248(3):355-65.
- Schmalbruch H, Lewis DM. Dynamics of nuclei of muscle fibers and connective tissue cells in normal and denervated rat muscles. *Muscle Nerve* 2000;23(4):617-26.
- Carter AJ, Kristmundsdottir F, Gilmour J, Glasby MA. Changes in muscle cytoarchitecture after peripheral nerve injury and repair. *J Hand Surg* 1998;23B(3):265-69.
- Dennis RG, Dow DE, Faulkner JA. An implantable device for stimulation of denervated muscles in rats. *Med Eng Phys* 2003;25(3):239-53.
- Gigo-Benato D, Geuna S, Rochkind S. Phototherapy for enhancing peripheral nerve repair: a review of the literature. *Muscle Nerve* 2005;31(6):694-701.
- Mourad PD, Lazar DA, Curra FP, Mohr BC, Andrus KC, Avellino AM, et al. Ultrasound accelerates functional recovery after peripheral nerve damage. *Neurosurgery* 2001; 48(5):1136-40.
- Dow DE, Cederma PS, Hassett CA, Kostrominova TY, Faulkner JA, Dennis RG. Number of contractions to maintain mass and force of a denervated rat muscle. *Muscle Nerve* 2004;30(1):77-86.
- Hofer C, Mayr W, Stöhr H, Unger E, Kern H. A stimulator for functional activation of denervated muscles. *Artif Organs* 2002;26(3):276-9.
- Oosterhof J, Samwel HJ, de Boo TM, Wilder-Smith OH, Oostendorp RA, Crul BJ. Predicting outcome of TENS in chronic pain: A prospective, randomized, placebo controlled trial. *Pain* 2007; 27.
- Vance CG, Radhakrishnan R, Skyba DA, Sluka KA. Transcutaneous electrical nerve stimulation at both high and low frequencies reduces primary hyperalgesia in rats with joint inflammation in a time-dependent manner. *Phys Ther* 2007;87(1):44-51.
- Liebano RE, Ablá LEF, Ferreira LM. Effect of high frequency transcutaneous electrical nerve stimulation on viability of random skin flap in rats. *Acta Cir Bras* 2006;21(3):133-38.
- Owens S, Atkinson ER, Lees DE. Thermographic evidence of reduced sympathetic tone with transcutaneous nerve stimulation. *Anesthesiology* 1979;50(1):62-5.
- Kaada B. Vasodilation induced by transcutaneous nerve stimulation in peripheral ischemia (Raynaud's phenomenon and diabetic polyneuropathy). *Eur Heart J* 1982;3(4):303-14.
- Józsa L, Kannus P, Thöring J, Reffy A, Järvinen M, Kvist M. The effect of tenotomy and immobilisation on intramuscular connective tissue. A morphometric and microscopic study in rat calf muscles. *J Bone Joint Surg Br* 1990;72(2):293-7.