

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE (CCBS)
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOTERAPIA**

**EFEITOS DA ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA NA ADAPTAÇÃO DO MÚSCULO
ESQUELÉTICO DESNERVADO: IMPLICAÇÕES SOBRE A EXPRESSÃO GÊNICA.**

THIAGO LUIZ DE RUSSO

**SÃO CARLOS
2008**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE (CCBS)
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOTERAPIA**

**EFEITOS DA ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA NA ADAPTAÇÃO DO MÚSCULO
ESQUELÉTICO DESNERVADO: IMPLICAÇÕES SOBRE A EXPRESSÃO GÊNICA.**

THIAGO LUIZ DE RUSSO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Doutor em Fisioterapia.

Orientadora: Profa. Dra. Tania de Fátima Salvini.

**SÃO CARLOS
2008**

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

R969ee

Russo, Thiago Luiz de.

Efeitos da estimulação elétrica na adaptação do músculo esquelético desnervado : implicações sobre a expressão gênica / Thiago Luiz de Russo. -- São Carlos : UFSCar, 2008.

131 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2008.

1. Reabilitação. 2. Lesão nervosa periférica. 3. Estimulação elétrica. 4. Alongamento (Fisioterapia). 5. Estresse oxidativo. 6. Plasticidade muscular. I. Título.

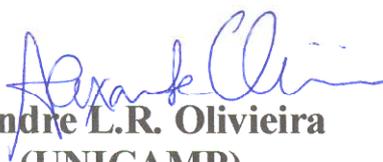
CDD: 615.82 (20^a)

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA PARA DEFESA DE TESE DE DOUTORADO DE Thiago Luiz de Russo, APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOTERAPIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS, EM 16 DE OUTUBRO DE 2008.

BANCA EXAMINADORA:



**Tânia de Fátima Salvini
(UFSCar)**



**Alexandre L.R. Oliveira
(UNICAMP)**



**Elen Haruka Miyabara
(UNICID)**



**Heloisa Sobreiro Selistre de Araújo
(UFScar)**



**Maria Julia Marques
(UNICAMP)**

Dedico este trabalho a todos aqueles que me
fazem querer ser uma pessoa melhor: minha
família e meus queridos amigos.

AGRADECIMENTOS

Acredito que o ato de agradecer faz com que quem escreve pare e pense em todas as dificuldades e alegrias que o trouxeram até este exato momento de sua vida. Há um temor de ser injusto. Esquecer alguém neste momento seria gravíssimo! O pior é ser tão tomado pela emoção em um momento em que deveria ser formal e sucinto. No entanto, parece proposital todos estes sorrisos e mãos amigas começam a invadir sua mente, abrindo todas as gavetas em que estavam guardados.

Gostaria de em primeiro lugar agradecer a todos que de uma forma ou de outra estiveram ao meu lado e me ajudaram a completar mais esta etapa. Todos as pessoas que fazem diferença na minha vida, levo-as comigo sempre, qualquer ausência aqui será um mero deslize. E agradecer um mais que outros seria quase injusto. A todos um muito obrigado com o mesmo carinho.

Agradeço imensamente a minha família, em especial a minha mãe Sandra, minha avó Cidinha Cidoquinha e minha irmã Francine pelo carinho incondicional e a corujice absoluta. Amo todas vocês. Não menos importante, agradeço a você, Davilene, por estar sempre ao meu lado e me apoiando. Sou muito grato pelo carinho e amor.

À querida Tania, que mais que uma orientadora é minha amiga, subornando ou não para ganhar títulos no tênis (brincadeira), ela é a pessoa em que me inspiro não apenas profissionalmente, mas também como exemplo de caráter. Uma pessoa que a competência é equivalente a sua grandeza como ser humano. Obrigado por nos ensinar sobre o músculo esquelético, sobre como é importante ser politizado, sobre decência e preocupação social. Meu muito obrigado por me traçar o caminho, pois eu tentei sempre seguir seus conselhos!

Aos meus amigos de laboratório, ao pequeno grupo dos malhéculas, Sabrina (Cabecinha), Jonas (João), Gabriel, Carolina, obrigado por tudo e desculpe pelo mau humor

que de vez enquanto acontece, mas tenho certeza que tivemos mais momentos felizes do que tristes juntos. Como é bom trabalhar com esta equipe: um bando de loucos por músculo! Cabecinha, obrigado de coração por tudo o que você me ensinou! O pescoço aqui aprendeu! (rs) Aos não menos importantes amigos Maria Cristina, Esperanza, Mari, Paula, Chris, Marcela, Lúcia, Jamacy, Dório, Anninha, Ana Morena, Jamilson, André, Nuno, Fabinho, Eliane, Carol, Clara, Marcela e Giovana o meu muito obrigado pela convivência. Vocês serão sempre muito importantes para mim. Meu muito obrigado também à técnica que eu mais infernizei na vida Teresa. Eu adoro você Teresa e é por isso que eu pego no seu pé o dia todo! Muito obrigado. Você realmente fez parte desta tese.

Obrigado Bia Beret e Anielle pela amizade incondicional em todos estes anos! A você também Lu, que mesmo longe sei do seu carinho!

Agradeço também às minhas alunas de IC, Camila, Bia e Marcela pela dedicação e a responsabilidade que tiveram com o nosso trabalho. Trabalhar com vocês foi um prazer.

Muito obrigado aos amigos dos laboratórios de cárdio, preventiva, agregados da Stela e Nivaldo, neuro e aos funcionários da USE (Dona Rosa, Bete e Lili). Agradeço também em especial aos alunos do curso de Fisioterapia. Muito obrigado!

À professora Heloísa que sempre abriu seu laboratório para o nosso grupo meu muito obrigado. Agradeço também a sua equipe, sempre muito gentil conosco. Igualmente gentil, agradeço também ao Prof. Anselmo e seus alunos por terem nos ajudado tanto durante estes anos. Obrigado aos meus queridos professores Carlão e Stela pela amizade e pelos ensinamentos.

Al professore Antonio Musarò voglio dire grazie per sua gentilezza quando mi ha ricevuto nel suo laboratorio, senza anche parlassi l'italiano. Ho imparato tantissime cose e spero di rivederci presto. Grazie anche a Michela e Gabriella perche mi avete aiutato, sono molto grato. Laureta, Mary Gracy, Silvia e tanti altre grazie per la vostra amicizia. Mario,

Mattia, Giordano, Don Giovanni siete grandi amici vi porterò con me per tutta la mia vitta!

Grazie di tutto!

Obrigado Dona Cleonice, Seu Ademar, Tati, Ricardo, Daniel, Marcela, Miriam, Taci, Camila prima, Danilo... vocês me ajudaram muito sempre, não sabem quanto!

A Deus já agradeço, pois pela minha concepção, Ele esta dentro de cada uma destas pessoas.

Agradeço também a CAPES e FAPESP que viabilizaram este projeto e meus estudos.

RESUMO

Recuperar o músculo esquelético desnervado é um desafio para a reabilitação. As modificações degenerativas no tecido muscular decorrentes da desnervação causam atrofia das fibras musculares e perda na capacidade de geração de força prejudicando as atividades de vida diária do indivíduo. Desenvolver estratégias de tratamento destes músculos é importante para a Fisioterapia. A estimulação elétrica (EE) é um recurso amplamente utilizado no tratamento de músculos desnervados em seres humanos, contudo seus efeitos e mecanismos de atuação sobre a adaptação muscular ainda não são claros. O objetivo desta tese foi avaliar os efeitos da EE, aplicada como recomendada na prática clínica, isto é, em sessões de tratamento, usando eletrodos de superfície e considerando as alterações de excitabilidade muscular, sobre a adaptação do músculo esquelético desnervado em ratos. A caracterização do padrão de excitabilidade muscular foi utilizada para a escolha dos parâmetros elétricos. Técnicas de histoquímica e imunohistoquímica foram usadas para averiguar a morfologia dos músculos desnervados submetidos ao tratamento elétrico. Além disso, a análise da reação em cadeia de polimerase (PCR) em tempo real foi utilizada para avaliar a expressão de importantes genes musculares, como myoD, atrogina-1, metaloproteinase-2 de matriz e miostatina. A EE é capaz de regular a expressão de diversos genes no músculo desnervado de rato, contudo ela não detém a atrofia das fibras musculares e nem impede a proliferação de tecido conjuntivo nestes músculos. Os resultados desta tese trouxeram significativa contribuição para o entendimento dos mecanismos de ação da EE, como preconizado na reabilitação, sobre o músculo desnervado.

Palavras-chave: Estimulação elétrica, lesão nervosa periférica, reabilitação, expressão gênica e músculo esquelético.

ABSTRACT

Recovery denervated skeletal muscles is a challenge to rehabilitation. The degenerative changes on muscle tissue due to denervation cause muscle fiber atrophy and force generating incapacity impairing the individual daily life activities. Design strategies to treat denervated muscles are important to Physical Therapy. Electrical stimulation (ES) is a resource largely recommended to treat denervated muscles in humans, nevertheless, its effects and mechanisms on muscle adaptation are unclear. The aim of this thesis was to evaluate the effects of ES, applied as used in clinical-like situations, e.g., during single sessions, using surface electrodes and considering the changes in muscle excitability, on the denervated skeletal muscle adaptation in rat. The characterization of the muscle excitability pattern was used to choose the best electrical parameters. Histochemistry and immunohistochemistry tecnic were used to verify the morphology of denervated muscles submitted to ES. Furthermore, the real time polymerase chain reaction (PCR) analysis was used to evaluate the expression of important muscular genes, such as myoD, atrogin-1, metalloproteinase-2 and myostatin. ES was able to regulate many genes on rat denervated muscles; however ES neither avoid muscle fiber atrophy nor detain connective tissue proliferation in theses muscles. The results of this thesis have brought significative contributions to understand the mechanisms of ES, as recommended in rehabilitation, on denervated muscle.

Key-words: Electrical stimulation, peripheric nerve injury, rehabilitation, gene expression, skeletal muscle.

SUMÁRIO

1. APRESENTAÇÃO	10
2. CONTEXTUALIZAÇÃO	11
3. ATIVIDADES NO PERÍODO	15
4. OBJETIVOS	19
4.1 Objetivos gerais	19
4.2 Objetivos específicos	19
PARTE I	20
5. MANUSCRITO I	21
6. MANUSCRITO II	52
7. MANUSCRITO EM PREPARAÇÃO	74
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS	109
PARTE II	110
9. APRESENTAÇÃO	111
10. CONSIDERAÇÕES FINAIS	129

1. APRESENTAÇÃO

A maneira como foi organizada esta tese reflete a produção intelectual durante o período de doutorado direto, sendo aceita e recomendada pelo Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia da UFSCar. Inicialmente serão descritas a contextualização do trabalho e as atividades em que estive envolvido durante o período de doutorado. A seguir os objetivos da tese são apresentados. A tese é dividida em duas partes. A primeira e mais volumosa parte da tese refere-se aos trabalhos realizados no laboratório de Plasticidade Muscular pelo Departamento de Fisioterapia da UFSCar, sob orientação da Profa. Dra. Tania de Fátima Salvini. Nesta parte, são apresentados três trabalhos, dois artigos já publicados e um outro manuscrito em fase final de preparação. Ao final da primeira parte estão as considerações e conclusões destes trabalhos. Já na segunda parte da tese, os resultados parciais do trabalho desenvolvido no Departamento de Histologia e Embriologia Médica da Universidade de Roma (Roma, Itália), sob a orientação do Prof. Antonio Musarò, são apresentados.

2. CONTEXTUALIZAÇÃO

A linha de plasticidade muscular dentro do Departamento de Fisioterapia da UFSCar, liderada pela Profa. Tania, preza por estudos na área básica dos recursos ou procedimentos comumente utilizados na Fisioterapia. Entender como reabilitar o músculo esquelético envolve o estudo dos mecanismos por trás da adaptação muscular aos diferentes estímulos, contribuindo desta forma para a solidificação dos conhecimentos que regem a nossa profissão.

Os efeitos da estimulação elétrica (EE) sobre o músculo desnervado já foram bastante descritos na literatura. Contudo, seu uso é ainda controverso. Diversos trabalhos mostraram que a EE teria um papel fundamental na manutenção da homeostase do músculo desnervado até que a reinervação ocorresse. A indústria que rege a venda dos equipamentos de eletroestimulação dá como certa a eficácia destas correntes sobre os mais diversos tipos de afecções. A ação de tais correntes elétricas sobre certas condições é eficiente como, por exemplo, no controle da dor e no processo de aprendizagem neuromuscular, contudo, ainda é incerto se elas são eficazes no tratamento de diversas condições comuns à prática do fisioterapeuta, como na reabilitação do músculo desnervado.

Trabalhos que obtiveram sucesso ao deter a atrofia muscular causada pela desnervação geralmente avaliaram protocolos de EE que pouco se assemelham ao que é recomendado para a reabilitação de pacientes com lesões nervosas periféricas. Geralmente, os trabalhos na literatura que usam modelos animais adotam longos períodos de estimulação, sendo a EE realizada ao longo de dias, semanas ou meses, ou seja, feita de uma forma crônica, diferente do que é preconizado na prática clínica em que o paciente realiza sessões de tratamento, muitas vezes em dias alternados (modo intermitente).

Além disso, o tipo de eletrodos utilizado nos trabalhos científicos é bastante diverso do que é feito na prática. Eletrodos implantados que estão diretamente em contato com os

músculos são os utilizados pelos trabalhos, ao invés disso, durante uma sessão de Fisioterapia, eletrodos de superfície, auto-adesivos ou de borracha, são posicionados sobre a pele e acima do músculo alvo para a estimulação elétrica.

Por fim, um grande problema que reflete diretamente em conseguir ou não que o músculo desnervado se contraia é a escolha dos parâmetros elétricos. Somente com a caracterização da excitabilidade muscular norteando os parâmetros da corrente elétrica é possível induzir uma contração do músculo desnervado.

A questão então proposta para esta tese foi investigar a ação de protocolos de EE, semelhantes aos realizados na reabilitação de músculos desnervados de seres humanos, ou seja, realizados em sessões de estimulação, usando eletrodos de superfície e respeitando as modificações de excitabilidade muscular, sobre a adaptação do músculo desnervado de rato. A escolha do modelo animal foi realizada devido aos óbvios problemas éticos relacionados com a retirada de amostras musculares (biópsias) de indivíduos com lesão nervosa periférica, cujo prognóstico é geralmente de recuperação parcial e limitação nas atividades de vida diária.

Deste modo, nosso primeiro estudo deu origem a um artigo intitulado “A estimulação elétrica, baseada na cronaxia, reduz a expressão gênica da atrogina-1 e myoD em músculo desnervado de rato” (Russo TL, Peviani SM, Freria CM, Gigo-Benato D, Geuna S, Salvini TF. *Muscle Nerve*. 2007;35:87-97) e mostrou que 20 contrações induzidas eletricamente a cada 48 h durante 28 dias é capaz de regular a expressão de dois importantes genes, myoD e atrogina-1, relacionados respectivamente com vias de hipertrofia e atrofia no músculo desnervado. Contudo, sua ação não foi efetiva para deter ou ao menos amenizar a perda de massa muscular causada pela desnervação.

Este primeiro estudo gerou algumas perguntas sobre os mecanismos de ação da EE. Uma delas foi saber se a EE seria capaz de modificar a resposta do tecido conjuntivo muscular frente a desnervação, visto que a proliferação de tecido conjuntivo, culminando na

formação de fibrose, é um fator que atrapalha a capacidade de geração de força muscular e é refletida na incapacidade de realização das atividades de vida diária. Para tal, foi realizado o segundo estudo publicado como “A estimulação elétrica aumenta a expressão gênica da matriz metaloproteinase-2, mas não muda sua atividade em músculo desnervado de rato” (Russo TL, Peviani SM, Durigan JLQ, Salvini TF. *Muscle Nerve*. 2008;37:593-600). Neste trabalho, observamos que o mesmo protocolo de EE usado no primeiro estudo promoveu um aumento na expressão da MMP-2, uma metaloproteinase importante no processo de remodelamento da matriz extracelular e crescimento axonal. Entretanto, a EE não foi capaz de induzir aumento na atividade da MMP-2 nos músculos desnervados.

Diante dos resultados encontrados nestes dois estudos, observamos que a EE apresenta a capacidade de regular a expressão gênica de importantes genes do trofismo muscular, como myoD, atrogina-1 e MMP-2, contudo ela não é capaz de deter a atrofia muscular que é o sinal mais claro do processo de desnervação e também o que mais traz complicações para os indivíduos que tiveram lesões nervosas periféricas. A nova pergunta gerada seria se um maior número de contrações musculares seria capaz de deter essa atrofia.

Um trabalho bastante importante (Dow et al. *Muscle Nerve*. 2004;30(1):77-86) mostrou que 200 contrações diárias eletricamente induzidas são suficientes para deter a atrofia muscular decorrente da desnervação. Partindo deste pré-suposto, acreditamos que o número de contrações diárias seria o fator chave no controle da massa no músculo desnervado. Deste modo, decidimos investigar o efeito de 200 contrações induzidas eletricamente, mas aplicadas como realizado na reabilitação. Todas as contrações foram feitas ao longo de 4 séries de 50 estimulações cada, em uma sessão de tratamento diária. Tal trabalho deu origem ao manuscrito em fase final de preparação (“A estimulação elétrica, o alongamento e sua combinação regulam a expressão gênica em músculo desnervado de rato” Russo TL, Peviani SM, Durigan JLQ, Salvini TF).

Neste terceiro estudo, resolvemos testar além da EE, os efeitos do alongamento intermitente, outro importante recurso usado durante a reabilitação do músculo desnervado e também da associação entre a EE e o alongamento. Todos estes recursos e procedimentos têm sido amplamente utilizados no tratamento das lesões nervosas periféricas, contudo seus efeitos não são bem esclarecidos.

Assim, pudemos observar que a EE, o alongamento, bem como a associação destes recursos, diminuem o acúmulo de RNA mensageiro da atrogina-1 e myoD em músculo desnervado de rato. Outro gene chamado miostatina (importante agente no controle da massa muscular) também foi regulado pelos recursos físicos e manteve-se em níveis normais nos músculos desnervados. Sozinhos, estes resultados mostraram efeitos protetores dos recursos físicos sobre o músculo desnervado. Entretanto, todas as intervenções não detiveram a perda de massa muscular causada pela desnervação.

A interpretação que fica do conjunto destes resultados é que a eletroestimulação e o alongamento são capazes de gerar modificações na resposta gênica destes músculos, mas que estas alterações não são capazes de impedir o principal problema gerado pela desnervação que é a atrofia muscular.

Novos trabalhos deverão buscar protocolos de estimulação que contemplem duas ou mais sessões ao longo do dia, a fim diminuir o tempo que o músculo passa sem estimulação contrátil em uma tentativa de impedir as modificações degenerativas destes músculos. Além disso, o revezamento entre sessões de eletroestimulação e alongamento ao longo dia poderia ser uma alternativa, uma vez que tanto a EE como o alongamento possuem efeitos sobre a expressão gênica do músculo desnervado.

3. ATIVIDADES NO PERÍODO

Durante o período do doutorado, além dos trabalhos apresentados, também estive envolvido em uma série de outros estudos dentro da linha de plasticidade muscular.

Projetos de Pesquisa

O primeiro projeto de pesquisa que tive contato foi o desenvolvido pela aluna de doutorado do nosso laboratório, Eliane L. Coutinho. Em seu estudo, avaliamos o efeito do alongamento intermitente no período pós-imobilização sobre o número de sarcômeros em série, tamanho do sarcômero, comprimento e peso muscular e área da fibra muscular. Observamos que o alongamento realizado três vezes por semana é capaz de induzir síntese de novos sarcômeros em série após três semanas. Este trabalho deu origem ao artigo “*One-minute bouts of passive stretching after immobilization increases sarcomerogenesis in rat soleus muscle*” (Salvini TF, Coutinho EL, Russo TL, DeLuca C. ***Braz J Morphol Sci.*** 2006;23:271-277).

Outro estudo importante também desenvolvido no período foi uma parceria com o laboratório de eletrotermofototerapia do Departamento de Fisioterapia da UFSCar sob supervisão do professor Nivaldo A. Parizotto e o laboratório do Prof. Stefano Geuna da Universidade de Turim (Turim, Itália). Nele avaliamos os efeitos do laser de baixa intensidade e de um protocolo de eletroestimulação sobre a regeneração nervosa pós-esmagamento. Tal estudo deu origem a dois artigos, dos quais sou co-autor, atualmente submetidos à revistas internacionais indexadas (“*Lack of lasertherapy effects on early rat sciatic nerve recovery after crush injury*” Gigo-Benato D, Geuna S, Russo TL, Cillo G, Gonçalves H, Raimondo S, Salvini TF, Giacobini-Robecchi MG, Parizotto NA. Submetido à ***Lasers in Medicine & Surgery.*** “*Electrical stimulation impairs early functional recovery and accentuates skeletal*

muscle atrophy after sciatic nerve crush injury in rat” Gigo-Benato D, Geuna S, Russo TL, Domingues NSR, Parizotto NA. Submetido à *Neurorehabilitation and Neural Repair*).

Além disso, também estive envolvido em outros trabalhos de alunos do nosso laboratório de plasticidade muscular. O primeiro, uma parceria com o laboratório da Profa. Heloísa S. S. Araújo, do departamento de Fisiologia da UFSCar, em que avaliamos o efeito de uma desíntegrina (a alternagina-C) isolado do veneno de cobra sobre o processo de regeneração do músculo esquelético deu origem ao trabalho aceito pela revista *Toxicon* (“*Effects of alternagin-C from Bothrops alternatus on gene expression and activity of metalloproteinases in regenerating skeletal muscle*” Durigan JLQ, Peviani SM, Russo TL, Delfino GB, Ribeiro JU, Cominetti MR, Araújo HSS, Salvini TF. *Toxicon*, in press).

O segundo estudo, uma parceria com o laboratório do Prof. Celso Ricardo Carvalho da USP-SP, avaliamos o efeito de diferentes intensidades de treinamento aeróbico sobre a adaptação dos músculos esqueléticos e respiratórios de animais com inflamação pulmonar alérgica crônica, dando origem a outros dois trabalhos que estão submetidos e passam por revisões (1. “*Effects of aerobic training on atrophy gene expression in mouse skeletal muscle with chronic allergic lung inflammation*” Durigan JLQ, Peviani SM, Russo TL, Duarte AC, Vieira RP, Martins MA, Carvalho CRF, Salvini TF. Submetido à *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2. “*MMPs, aerobic physical training and asthma in diaphragm muscle*” Durigan JLQ, Peviani SM, Russo TL, Duarte AC, Vieira RP, Martins MA, Carvalho CRF, Salvini TF. Submetido à *International Journal of Sports Medicine*).

Ainda trabalhando com os alunos do laboratório, uma segunda parte do estudo da eletroestimulação e o alongamento sobre o músculo desnervado foi gerenciada pela aluna Sabrina M. Peviani, que investigou os efeitos do alongamento intermitente sobre o tecido muscular, dando origem a um outro artigo submetido à revista *Neurorehabilitation and Neural Repair*. (“*Stretching and electrical stimulation regulate the metalloproteinase-2 in rat*

denervated muscle” Peviani SM, Russo TL, Durigan JL, Vieira BS, Pinheiro CM, Galassi MS, Salvini TF).

Por fim, contamos ainda com a colaboração da Profa. Viviane Minamoto da UNIMEP, dando origem a um manuscrito já aceito (“*Muscle and nerve responses after different intervals of electrical stimulation sessions on denervated rat muscle*” Lima SC, Caierão QM, Peviani SM, Russo TL, Somazz MC, Salvini TF, Teodori RM, Minamoto VB. *American Journal of Physical Medicine and Rehabilitation*. 2008, in press). Neste estudo avaliamos diferentes protocolos de eletroestimulação sobre o reparo nervoso e muscular. Observamos que sessões em dias alternados ou diariamente possuem efeitos diferentes, mostrando que a quantidade de estimulação é importante para a resposta destes tecidos.

Atividades didáticas

Durante o doutorado também estive envolvido com o atendimento voluntário de pacientes com lesão nervosa periférica na Unidade de Saúde Escola da UFSCar. Além disso, fui aprovado como professor substituto (TP20) para ministrar ao lado do Prof. Carlos E. S. Castro a disciplina de Eletroterapia e Crioterapia, além de participar do estágio supervisionado em traumatologia e ortopedia ao lado da Prof. Stela M. G. Mattiello-Rosa e o Prof. Fábio V. Serrão. Também auxiliei em vários módulos da disciplina de Cinesioterapia com a Profa. Tania de Fátima Salvini. Todas as atividades desenvolvidas dentro da Universidade Federal de São Carlos. Todas as experiências foram muito enriquecedoras as quais me auxiliaram muito na aplicação dos meus conhecimentos adquiridos com a pesquisa junto à extensão e ao ensino.

Estágio no exterior

No período de Julho à Dezembro de 2007 fui contemplado com uma bolsa doutorado sanduíche. Tive a oportunidade de estagiar no laboratório do Prof. Antonio Musarò, um pesquisador com produção bastante expressiva e relevante para a área de músculo esquelética. O estágio foi realizado no Departamento de Histologia e Embriologia Médica da Universidade de Roma – La Sapienza (Roma, Itália), onde tive a oportunidade de trabalhar com diversas técnicas importantes para o estudo do tecido muscular, complementando minha formação.

Brevemente, avaliamos o efeito do aumento do estresse oxidativo, provocado por uma mutação da enzima superóxido dismutase restrita ao tecido muscular, sobre o processo de regeneração deste tecido. Observamos que o aumento do estresse oxidativo causa um atraso na expressão de marcadores moleculares de reparo muscular como myoD, desmina, pax-7 e miogenina (Os resultados parciais são apresentados na segunda parte da tese). Tais achados trazem importantes contribuições para o entendimento dos efeitos aumento do estresse oxidativo sobre o músculo esquelético, como é normalmente encontrado durante o envelhecimento ou em doenças neuromusculares como a esclerose lateral amiotrófica (ELA).

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivos gerais:

Avaliar os efeitos da estimulação elétrica sobre o músculo esquelético desnervado de rato.

4.2 Objetivos específicos:

Investigar os efeitos da estimulação elétrica sobre a área de secção transversa das fibras musculares em músculo desnervado de rato;

Avaliar e caracterizar o padrão de excitabilidade do músculo esquelético durante a desnervação e verificar se a estimulação elétrica pode alterá-lo;

Avaliar a ação da estimulação elétrica sobre a expressão de importantes genes alterados durante a desnervação;

PARTE I

5. MANUSCRITO I

Artigo publicado em periódico internacional indexado A (Muscle & Nerve 35: 87-97, 2007).
Aceito em 11 de Agosto de 2006.

ELETROESTIMULAÇÃO BASEADA NA CRONAXIA REDUZ A EXPRESSÃO GÊNICA DA ATROGINA-1 E MYOD EM MÚSCULO DESNERVADO DE RATO.

Thiago Luiz Russo¹, Sabrina Messa Peviani¹, Camila Marques Freria¹, Davilene Gigo-Benato¹, Stefano Geuna², Tania Fátima Salvini¹.

¹Departamento de Fisioterapia, Universidade Federal de São Carlos, Rodovia Washington Luís, Km 235. CEP: 13565-905.

²Departamento de Ciências Clínicas e Biológicas, Universidade de Torino, Ospedale di San Luigi, Torino, Itália.

Abreviaturas: a-NF, anti-neurofilamento-200kDa; bHLH, hélice-alça-hélice básica; CSA, área de secção transversa; EDL, extensor longo dos dedos; ES, eletroestimulação, MAFbx, F-box de atrofia do músculo; MRFs, fatores regulatórios miogênicos; mRNA, ácido ribonucléico mensageiro; myoD, diferenciação miogênica-1; nAChR, receptor de acetilcolina nicotínico; PBS, tampão fosfato-salina; PCR, reação em cadeia de polimerase; PKC, proteína quinase C; RT, transcrição reversa; SCFs, Skp1, culim e F-box; TA, músculo tibial anterior; TFIID, fator de transcrição II D.

RESUMO

A desnervação induz à atrofia da fibra muscular e mudanças nas taxas de expressão gênica no músculo desnervado. A eletroestimulação (EE) é um procedimento geralmente utilizado para tratar músculos desnervados em humanos. Este estudo avaliou o efeito da EE baseada na cronaxia e reobase sobre a expressão de genes como a myoD e atrogina-1 em músculo tibial anterior (TA) desnervado de ratos Wistar. Cinco grupos foram examinados: (1) desnervado (D); (2) D+EE; (3) sham desnervação; (4) normal (N); e (5) N+EE. Vinte contrações musculares foram estimuladas a cada 48h usando eletrodos de superfície. Após 28 dias, a EE diminuiu significativamente a expressão da myoD e atrogina-1 em D+EE comparado a D. Entretanto, a EE não preveniu a atrofia da fibra muscular após desnervação. Deste modo, a EE baseada nos valores de cronaxia e aplicada em músculos desnervados usando eletrodos de superfície, como normalmente usado na reabilitação de humanos, foi capaz de reduzir a expressão gênica da myoD e atrogina-1, relacionados ao crescimento muscular e atrofia respectivamente. Os resultados deste estudo trazem novas informações sobre o tratamento do músculo esquelético desnervado usando EE de superfície.

Palavras-chave: atrogina-1; desnervação; estimulação elétrica; myoD; músculo esquelético.

A inervação é um fator crítico que suporta a integridade estrutural e funcional dos músculos esqueléticos.^{19,21,23} A desnervação resulta em rápida e profunda perda de massa^{2,3,8,21,23} e habilidade de geração de força em músculos esqueléticos.⁸ Além disso, a desnervação induz apoptose de miofibras³² e aumento da proliferação de células satélites, que são células precursoras miogênicas que residem na periferia do músculo esquelético adulto.^{19,38} Estas observações estão de acordo com a idéia que a plasticidade muscular, isto é, a capacidade inerente do músculo esquelético a se adaptar a diferentes estímulos, é afetada por substâncias neurotróficas e atividade elétrica.¹⁹

Músculos desnervados apresentam um aumento na expressão de genes músculo-específicos, notadamente os fatores regulatórios miogênicos (MRFs)^{4,10,19,20,23,37} e também de genes relacionados as vias atrofia, em particular a via ubiquitina-proteossoma.^{3,13,22}

Os MRFs formam uma família de fatores de transcrição alça-volta-alça básica, em que os membros (myoD, miogenina, MRF-4 e myf-5) possuem um importante papel na coordenação do programa de desenvolvimento muscular, bem como no processo de adaptação do músculo adulto.^{29,37} Os genes alvos da myoD contêm um E-box em suas regiões promotoras. MyoD e os outros membros são tradicionalmente pensados como marcadores do crescimento e hipertrofia muscular, porque eles podem modular a divisão de células satélites e a incorporação destas células, como novos mionúcleos, em fibras musculares maduras.¹⁹ Além do mais, myoD *in vivo* é expressa no músculo esquelético adulto em resposta a diversos estímulos, como sobrecarga,²⁹ desnervação,^{4,21,37} e alongamento,¹⁵ sugerindo que a myoD apresenta um papel na plasticidade dos músculos esqueléticos.

A rápida expressão do ácido ribonucléico mensageiro (RNAm) e proteína de myoD na fase inicial após a desnervação^{4,10} sugere que a indução de myoD deva prevenir a atrofia muscular induzida pela desnervação.²¹ É bem estabelecido que a desnervação acelera a proteólise via ubiquitina-proteossoma de atrofia muscular.^{3,12,13} Em músculos desnervados, a

quebra protéica ocorre mais rapidamente que a produção,^{3,21,24} levando a perda de massa muscular como um resultado do aumento da atrogina-1, uma ubiquitina-ligase músculo-específica, também chamada de MAFbx (F-box de atrofia muscular).^{6,35}

Atrogina-1 contém um domínio F-box, um motivo característico observado na família de ubiquitina ligases E3 chamado SCFs (para Skp1, Culim e F-box).^{6,12,13} As ubiquitina ligases E3 são os componentes que conferem a especificidade da reação.¹²⁻¹⁴ A adição de ubiquitina ao substrato protéico tem sido reconhecido como um processo de sinalização regulatório.^{12,13}

Adicionalmente, a excitabilidade muscular está alterada. A excitabilidade de um tecido pode ser definida por uma relação entre a amplitude do estímulo e sua duração, também conhecida como curva de intensidade-duração.¹ Quando o músculo é desnervado, ele se torna menos responsável a estimulação direta.^{9,30} e mudanças ocorrem nos índices elétricos do tecido muscular, como a reobase,^{1,28} cronaxia^{1,27,28} e acomodação.^{27,28} Cronaxia é um parâmetro de excitabilidade tecidual que permite a escolha de uma duração de pulso elétrico ótima para a estimulação de qualquer tecido excitável.¹¹ A cronaxia encontra-se também aumentada depois da desnervação,^{1,25,27,28,30} e essa modificação de excitabilidade representa um problema prático que dificulta a escolha de um tratamento elétrico eficiente.³⁰

O uso da estimulação elétrica (EE) no tratamento do músculo desnervado é controverso.^{9,26,28,33} alguns estudos indicam que a EE pode retardar o processo de reinervação e não é efetiva para prevenir a atrofia muscular,^{9,33} enquanto outros estudos encontraram melhora na excitabilidade de tecidos desnervados,^{25,28} prevenção na perda da massa^{8,23} e força,⁸ em alguns casos, restauração da função^{30,33} e controle das taxas de expressão gênica.^{4,10,23} Entretanto, a maioria dos estudos avaliaram a eficiência da EE em músculos desnervados de animais usando EE crônica e eletrodos implantados. Este tipo de EE não é o modo mais comum de tratamento de músculo desnervado em humanos. Durante a reabilitação,

os músculos desnervados de humanos são usualmente tratados com sessões de ES aplicadas diariamente ou em dias alternados, usando eletrodos de superfície.³⁰ Para nosso conhecimento, não há estudos prévios que avaliaram o efeito da ES aplicada usando eletrodos de superfície e baseada nas mudanças de excitabilidade em músculos desnervados com modelos animais. Assim, o propósito do presente estudo foi avaliar o efeito de um tratamento de EE semelhante ao empregado na clínica baseado nas mudanças das variáveis elétricas (reobase e cronaxia) sobre a expressão gênica da atrogina-1 e myoD e a área de secção transversa (AST) de músculo desnervado de rato. Considerando as similaridades entre os músculos de mamíferos, os resultados deste estudo podem fornecer novas informações para o tratamento de músculo desnervado usando EE de superfície.

MATERIAL E MÉTODOS

Cuidados com os animais e grupos experimentais.

Trinta e quatro ratos Wistar machos, 3 meses de idade ($356 \pm 38,7\text{g}$), foram usados. Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas em uma sala com controle de temperatura e livre acesso à água e ração peletizada. O Comitê de Ética da Universidade aprovou os procedimentos experimentais e o estudo foi conduzido de acordo com normas nacionais para cuidado e experimentação de animais de laboratório.

Os animais foram randomizados e divididos em cinco grupos: (1) tibial anterior (TA) direito desnervado (D, $n = 8$); (2) TA desnervado e submetido a avaliação da excitabilidade muscular e a estimulação elétrica (EE) a cada 48 h (D+EE, $n = 8$); (3) sham ($n = 5$), isto é, animais submetidos aos procedimentos cirúrgicos sem lesão nervosa; (4) TA normal submetido a avaliação de excitabilidade elétrica e também a EE a cada 48 h (N+EE, $n = 8$); and (5) normal (N, $n = 5$) animais não tratados.

O músculo TA foi escolhido porque quase todas suas fibras atravessam o meio do ventre do músculo e são distribuídas de tendão a tendão.²⁶ Além disso, ele é um músculo superficial, tornando fácil a identificação da mínima contração visível e permitindo que a EE fosse aplicada diretamente na pele acima do músculo (tratamento seletivo do músculo) usando eletrodos de superfície.

Os ratos foram anestesiados com uma injeção intraperitoneal de xilazina (12 mg/Kg) e quetamina (95 mg/Kg) para os procedimentos cirúrgicos, desnervação, avaliação dos parâmetros elétricos, tratamento com EE e remoção dos músculos. Eles foram sacrificados com overdose de anestésico no 28^o dia dos procedimentos experimentais. Este período de desnervação foi escolhido porque a atrofia dos músculos esqueléticos de rato é maior durante as primeiras semanas depois da desnervação.^{3,33}

Processo de desnervação.

Uma pequena incisão foi feita na pele e fáscia próxima ao trocânter direito, entre os músculos glúteo máximo e bíceps femoral. Os músculos foram separados a fim de isolar o nervo ciático e cerca de 1 cm do nervo foi cortado e removido como previamente descrito.³⁶ A fáscia e a pele foram então suturadas, de distal para proximal, com um fio de sutura. Este procedimento promove a desnervação da musculatura do membro inferior, incluindo o músculo TA.

A desnervação do TA foi confirmada durante o período experimental pela mensuração da cronaxia. O músculo TA foi considerado desnervado quando apresentava valores de cronaxia superiores a 1 ms como previamente descrito.^{9,16,27,28} Músculos TA desnervados foram descartados quando os valores de cronaxia foram inferiores ou iguais a 1 ms no 28^o dia.

Avaliação elétrica e procedimentos para a estimulação elétrica.

Um equipamento para a estimulação elétrica que permitiu mudanças nos parâmetros elétricos foi usado para avaliar a excitabilidade muscular e para o tratamento com EE. Antes de fixar os eletrodos, a pele foi depilada e limpa, e uma camada de gel condutor foi aplicada entre os eletrodos e a pele. Dois eletrodos foram usados. Um eletrodo indiferente (eletrodo auto-adesivo circular, 5 cm de diâmetro) foi posicionado nas costas do animal; ele apresentava uma grande área, permitindo uma diminuição na concentração das cargas elétricas sobre a pele, e nenhuma hiperemia foi observada depois dos procedimentos elétricos. Um segundo eletrodo ativo (metálico, 3 mm de diâmetro) foi usado para estimular o músculo TA; ele era pequeno o bastante para estimular apenas este músculo.²⁵ Durante o procedimento de EE, este eletrodo foi mantido em contato com a pele diretamente acima do músculo TA, perpendicular as fibras musculares.

Antes de cada avaliação dos parâmetros elétricos, o local sobre o músculo TA onde a mínima amplitude de estímulo para ativar o músculo foi identificada. Os parâmetros elétricos foram avaliados antes de cada tratamento de EE para fornecer os valores de reobase, cronaxia e acomodação. Após isso, os valores de cronaxia foram usados para determinar os parâmetros de EE aplicados no músculo TA. Reobase é a mínima intensidade de estímulo elétrico necessária para produzir uma contração muscular (corrente retangular fásica; intervalo de pulso, 1 s; intervalo interpulso, 2 s).^{1,28} Cronaxia é a mínima duração de pulso necessária para induzir uma contração muscular (corrente retangular fásica; intervalo interpulso, 2s; amplitude: duas vezes o valor da reobase).^{1,27,28} Acomodação é a capacidade do músculo em não responder a pulsos de crescimento lento (corrente monofásica exponencial; intervalo de pulso, 1 s; intervalo interpulsos, 2s), e.g., acomodação descreve a resposta da excitabilidade das membranas para correntes de despolarização lenta sem a geração de um potencial de ação.^{27,28}

Os valores identificados durante as avaliações elétricas foram usados para determinar os parâmetros de EE para cada sessão, como previamente descrito.²⁸ Quando os valores de cronaxia eram ≤ 1 ms, uma corrente Farádica foi usada (frequência, 50 Hz; intervalo de pulso, 1 ms; tempo on de 3 s e off de 6 s). Para cronaxia > 1 ms, uma corrente monofásica exponencial foi usada (frequência, 20 Hz; duração de pulso, duas vezes o valor da cronaxia; tempo on, 3 s; e tempo off, 6 s). No dois casos, a amplitude do pulso necessária para induzir uma contração muscular visível foi selecionada. A escolha da frequência de estimulação permitiu uma contração muscular vigorosa usando baixas intensidades de corrente, como previamente descrito.⁷

Depois da avaliação da excitabilidade muscular, a intensidade de estímulo (amplitude) necessária para induzir uma contração máxima do músculo TA foi identificada. Esta máxima contração foi considerada quando uma total dorsiflexão do tornozelo direito foi observada.

Cada sessão de EE produzia 20 contrações máximas do músculo TA, aplicadas a cada 48 h durante 28 dias e iniciando 72 h após a desnervação. O mesmo procedimento foi usado para o músculo TA normal que foi submetido ao tratamento elétrico.

No presente estudo, um pequeno número de contrações musculares foi usado para mimetizar o que é usualmente realizado durante uma única sessão para a reabilitação de músculos desnervados em seres humanos. Normalmente, em uma única sessão de tratamento, a EE dos músculos desnervados é associada com outras intervenções como os exercícios físicos, alongamentos musculares e movimentos passivos. Além disso, 20 contrações foram escolhidas devido ao longo tempo de estimulação usado (tempo on = 3 s) o que poderia provocar fadiga muscular, uma vez que todas as contrações foram realizadas em um curto período de tempo e durante uma única sessão de tratamento.

Avaliação muscular.

Os ratos foram pesados e os músculos TA direitos foram removidos e pesados. Os músculos foram divididos em dois pedaços a partir da região média do ventre muscular, o fragmento proximal foi usado para a análise histológica e o distal para o RNAm. Para a avaliação histológica, o fragmento muscular foi imediatamente congelado em isopentano, pré-resfriado em nitrogênio líquido, e armazenado em freezer a -80°C (Forma Scientific, Marietta, Ohio). Cortes transversais seriados (10 µm) foram obtidos da porção média do ventre dos músculos TA congelados usando um micrótomo criostato (Microm HE 505, Jena, Alemanha) e corados com 1% de azul de toluidina/1% bórax. Para a análise de RNAm, o fragmento muscular foi congelado em nitrogênio líquido e também armazenado a -80°C.

Área da fibra muscular.

Um corte histológico transversal da região central do ventre de cada músculo TA foi usada para avaliar a morfologia das fibras e para medir a área de secção transversa (AST) das mesmas. Para a obtenção das fotos dos cortes, um microscópio (Axiolab, Carl Zeiss, Jena, Alemanha) equipado com uma câmera digital (Sony DSC S75, Tóquio, Japão) foi usado. As ASTs de 200 fibras foram aleatoriamente medidas usando o software Axiovision 3.0.6 SP4 (Zeiss).

Isolamento e análise do RNA.

Um fragmento de cada músculo foi homogeneizado e o RNA total isolado usando o reagente Trizol (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia) de acordo com as instruções do fabricante. O RNA foi dissolvido em tris-HCl e ácido etilenodiaminotetracético pH 7,6, e quantificado por espectrofotometria. A pureza foi avaliada pela determinação da relação entre as absorvâncias a 260 e 280 nm. Todas as amostras tinham relações acima de 2,2. A integridade do RNA foi então confirmada por inspeção com brometo de etídio (Invitrogen) corando o RNA ribossômico 18S e 28S quando expostos à luz ultravioleta.

Transcrição reversa (RT).

Nós transcrevemos reversamente 1 µg de RNA para sintetizar cDNA. A mistura da reação para transcrição reversa continha 1 µg de RNA celular, 5x o tampão de RT, uma mistura de dNTP (Promega, Madison, Wisconsin) contendo 0,2 mmol.L⁻¹ cada de dATP, dCTP, dGTP e 0,1 mol.L⁻¹ de dTTp, 1 µl de oligo (dT) primer (Invitrogen) e 200U da enzima M-MLV RT (Promega). A reação foi encubada a 70°C por 10 min, 42°C por 60 min e finalmente aquecida a 95°C por 10 min antes de serem colocadas rapidamente em gelo.

Oligonucleotídeos primers.

Os primers foram desenhados para atrogina-1 (GenBank, AF441120) e TFIID (GenBank, DO1034) usando o software Primer Express 2,0 (Applied biosystems, Foster City, Califórnia). Hill e Goldspink¹⁷ descreveram myoD. Todos foram sintetizados pela Imprint. As seqüências usadas foram: fator de transcrição II D de camundongo (TFIID) (senso: CCACC-ACTGCTTAGCACC; antisenso: GCCAAATTCGTTGTCATACC); myoD de rato (senso: GGAGACATCCTCAAGCGATGC; antisenso: AGCACCTGGTAAATCGGATTG); e para atrogina-1 de rato (senso: TACTAAGGAGCGCCATGGATACT; antisenso: GTTGAAT-CTTCTGGAATCCAGGAT).

Análise por reação em cadeia de polimerase em tempo real.

Os níveis de RNA transcritos para os diferentes músculos dos grupos experimentais e controle foram analisados simultaneamente e as reações foram feitas em duplicata em um Lightcycler (GeneAMP 5700 Sequence Detection System, Applied Biosystems) usando o SYBR green, um fluorófilo para detecção (Applied Biosystems).

A técnica usada para estimar os valores relativos os níveis de RNAm de cada gene testado (myoD e atrogina-1) pela comparação de todas as amostras e controles em duplicata foi baseada nos produtos das reações em cadeia de polimerase (PCR) em tempo real medidos pela fluorescência e quantificados pelo ABI Prism 5700 sequence detector (Applied Biosystems), baseado em recente metodologia.⁵ TFIID, um fator de transcrição, foi usado no presente estudo como um controle endógeno porque os seus níveis de expressão mantiveram-se constantes em modelos de regeneração.³⁴ Os resultados foram expressos como uma relação entre o nível de RNAm do gene alvo (myoD e atrogina-1) por nível de RNAm do TFIID.

Histologia do nervo ciático, imunohistoquímica e microscopia confocal.

Os cotos removidos do nervo ciático foram preparados para microscopia de luz e confocal. As amostras foram fixadas em formalina 10% por 3 h e depois lavadas em PBS. O material foi desidratado e montado em parafina para cortes de 7 μ m, transversais ao nervo. Para as análises de microscopia de luz, os cortes foram corados com hematoxilina e eosina e observados com um microscópio Leica DM400 equipado com uma câmera digital Leica DFC320 (Leica, Wetzlar, Alemanha).

Para a imunohistoquímica e microscopia a laser confocal, os cortes foram incubados overnight em uma solução contendo o anti-neurofilamento-200 kDa (a-NF) (monoclonal, camundongo, que reconhece subunidades de neurofilamento de porco 200 kDa, diluição 1:200; Sigma, St Louis, Missouri) e anti-S100 (policlonal, coelho, que reconhece a unidade monomérica da proteína ligante ao cálcio S-100 de gado com 21 kDa, diluição 1:800; Sigma). Depois de lavados em PBS, a dupla marcação foi feita com a incubação dos cortes por 1 h em solução contendo dois anticorpos secundários diferentes: TRITC-conjugado anti-coelho IgG (diluição 1:200; Dako, Milão, Itália) e cabra anti-camundongo IgG Alexa-Fluor-488-conjugado (diluição 1:200; Molecular Probes, Eugene, Oregon). Os cortes foram finalmente montados em meio para fluorescência Dako e analisado em um sistema a laser confocal LSM 510 (Zeiss), que apresenta dois lasers (argônio e HeNe).

Para a avaliação da especificidade,³¹ os dois anticorpos foram checados por Western blotting, que mostrou uma única banda de reação, e os secundários não apresentavam reações quando o anticorpo primário era retirado, não representando imunopositividade. Além disso, nós também realizamos a morfologia baseada no teste de especificidade, consistindo do mesmo protocolo de imunoreações usado em nervos periféricos normais, onde as duas proteínas são expressas claramente, sendo facilmente detectadas suas localizações

morfológicas. Este teste mostrou a especificidade de cada reagente demonstrando marcações apenas onde a proteína alvo está presente.

Estatística.

O teste de Levene foi aplicado primeiramente para avaliar a homogeneidade dos resultados. Para dados com distribuição paramétrica (peso corporal e dos músculos TA, e expressão gênica), o ANOVA one-way foi usado para identificar possíveis diferenças entre os grupos. Quando estas diferenças eram observados, o teste de Tukey foi usado. Para dados com distribuição não paramétrica (AST e variáveis elétricas), o teste Kruskal-Wallis one-way foi usado. Para testar eventuais diferenças entre os grupos, o teste de Newman-Keulls de múltiplas comparações foi usado (AST). O teste de Mann-Whitney foi usado para as variáveis elétricas. Para todos os testes, o nível de significância de 5% foi adotado ($P \leq 0,05$).

RESULTADOS

Variáveis elétricas.

As medidas de pré-desnervação dos grupos D e D+EE foram obtidas e consideradas como valores normais para rebase, cronaxia e acomodação. Todas as variáveis elétricas foram comparadas aos valores normais e também entre si no 28^o dia (Fig. 1).

Os valores de rebase diminuíram em todos os grupos investigados (D: $28,6 \pm 22\%$, $P = 0,03$; D+EE: $54 \pm 10,9\%$, $P = 0,003$; N+EE: $34,4 \pm 22,6\%$, $P = 0,01$) comparado aos valores normais ($0,85 \pm 0,26$ mA). Entretanto, não houve diferença entre os grupos no 28^o dia (Fig. 1A).

Os valores de cronaxia permaneceram constantes no grupo N+EE ($0,38 \pm 0,2$ ms), indicando que a EE não afetou seus valores. Contudo, a desnervação promoveu um importante aumento nos valores de cronaxia nos grupos desnervados (D: aumento de 12,3 vezes, $P = 0,0001$; D+EE: aumento de 15,1 vezes, $P = 0,0001$) comparado aos valores normais ($0,4 \pm 0,2$ ms; Fig. 1B). Não houve diferença entre D e D+EE no 28^o dia (Fig. 1B).

Todos os grupos mostraram valores normais de acomodação (N: $1,44 \pm 0,7$ mA) depois de 28 dias (N+EE: $0,86 \pm 0,38$ mA; D: $1,32 \pm 0,23$ mA; D+EE: $0,79 \pm 0,4$ mA), sem nenhuma diferença entre eles ($P > 0,05$; Fig. 1C).

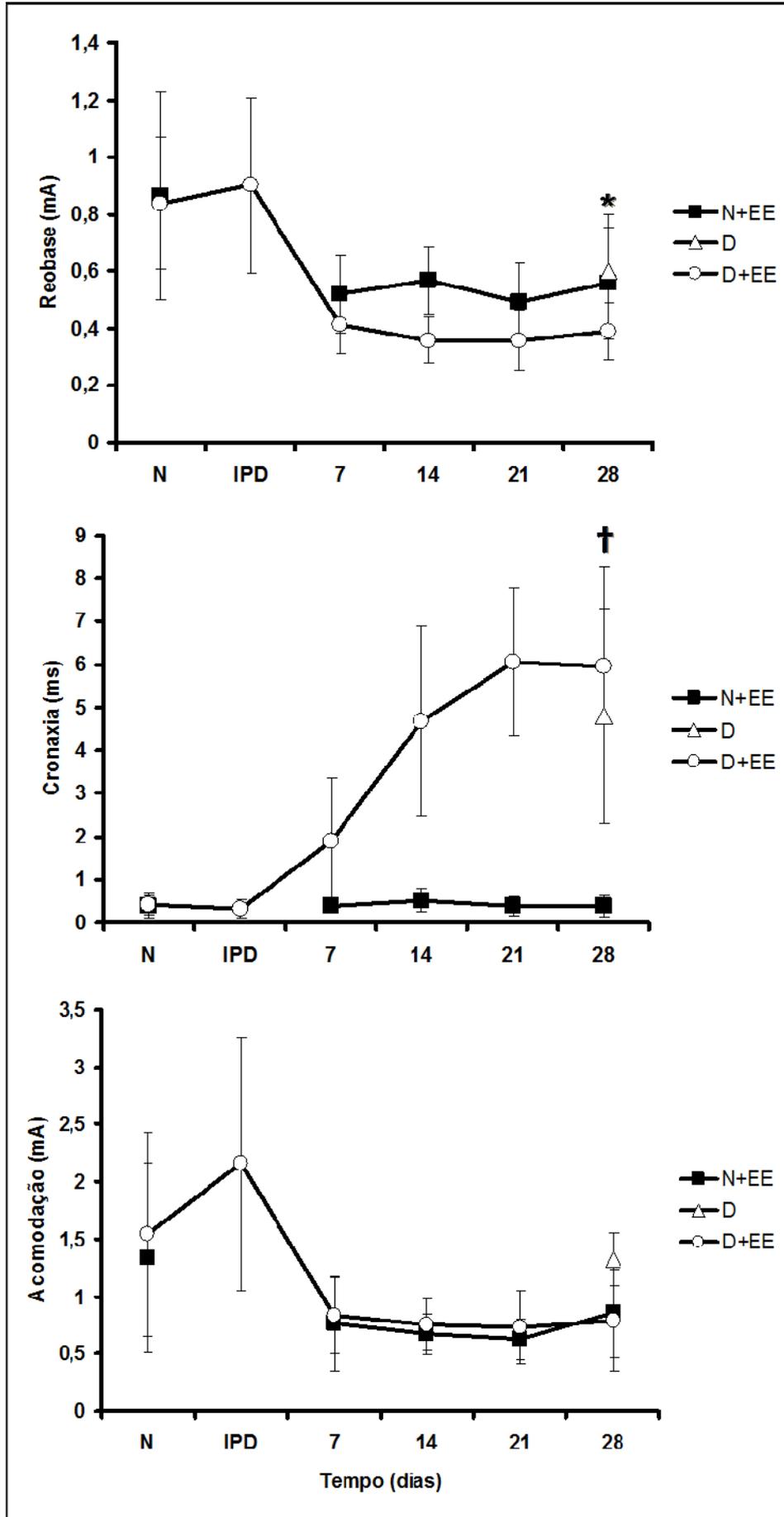


FIGURA 1. Variáveis elétricas dos músculos Tibial anterior (TA) obtidas da avaliação elétrica ao longo de 28 dias de desnervação. Os dados são apresentados em média \pm desvio padrão. N, Valores normais obtidos pré-desnervação; IPD, valores imediatamente pós-desnervação; N+EE, músculo TA normal submetido a avaliação elétrica e a estimulação elétrica (EE) a cada 48 h; D, músculos TA desnervados submetidos a avaliação elétrica apenas no 28^o dia; D+EE, músculos TA desnervados submetidos a avaliação elétrica e a EE a cada 48 h. **(A) Valores de Reobase:** *P < 0,05 quando todos os grupos foram comparados ao valor normal. **(B) Valores de Cronaxia:** †P < 0,05 quando os grupos desnervados (D e D+EE) foram comparados aos valores normais. **(C) Valores de Acomodação:** Não houve diferença entre os grupos no 28^o dia comparado aos valores normais. Observe que todos os grupos mostraram uma redução nos valores de reobase. A cronaxia aumentou nos grupos D e D+EE, e foi mantida em valores acima de 1 ms, confirmando que os músculos estavam desnervados. Todos os grupos mostraram valores normais de acomodação no 28^o dia.

Amplitude usada na estimulação elétrica.

Uma análise da amplitude do pulso durante as primeiras sessões de EE mostrou valores elevados de corrente no grupo D+EE comparado a N+EE ($2,7 \pm 0,3$ mA e $2,1 \pm 0,3$ mA, respectivamente, P = 0,001). Entretanto, não houve diferença entre estes grupos na última sessão de tratamento ($2 \pm 0,3$ mA e $1,8 \pm 0,2$ mA, respectivamente, P = 0,25).

Peso corporal e do músculo TA.

Apenas três grupos apresentaram um aumento do peso corporal quando comparados os pesos inicial e final: o grupo sham aumentou $11,9 \pm 2,67\%$ (de $339,6 \pm 16,2$ g para $380,2 \pm 23,2$ g, P = 0,0008), D aumentou $12,21 \pm 3,19\%$ (de $358 \pm 13,48$ g para $401,7 \pm 19,9$ g, P = 0,01), e N+EE apresentou um aumento de $6,18 \pm 3,17\%$ (de $313,1 \pm 29,6$ g para $331,8 \pm 25$ g, P = 0,004).

Como houve diferenças entre o peso corporal dos grupos, o peso dos músculos de cada animal foi expresso como uma porcentagem do seu peso corporal final.

Três grupos apresentaram um declínio no peso do músculo TA (sham, $0,7 \pm 0,09$, P = 0,02; D, $0,3 \pm 0,07$, P = 0,001; D+EE, $0,2 \pm 0,02$, P = 0,001) comparado a valores normais ($0,73 \pm 0,06$). Embora os músculos desnervados apresentaram uma importante diminuição no

peso muscular quando comparado ao grupo N (D, perda de $62,5 \pm 1\%$; D+EE, perda de $66 \pm 0,5\%$) nenhuma diferença foi encontrada entre eles.

Área de secção transversa das fibras musculares.

Devido às diferenças de peso corporal entre os grupos, os dados de AST foram normalizados pelo peso corporal de cada animal em todos os grupos e expressos em μm^2 por grama de peso corporal. A Figura 2 mostra uma intensa atrofia das fibras musculares dos músculos TA desnervados nos grupos D e D+EE comparados a N. A atrofia das fibras musculares foi também confirmada pela diminuição da AST das fibras musculares nos grupos desnervados (Fig. 3) comparado ao grupo N, mas nenhuma diferença foi encontrada entre D e D+EE ($P = 0,63$). Os grupos sham e N+EE não apresentaram diferenças na AST comparados ao grupo normal (Fig. 3).

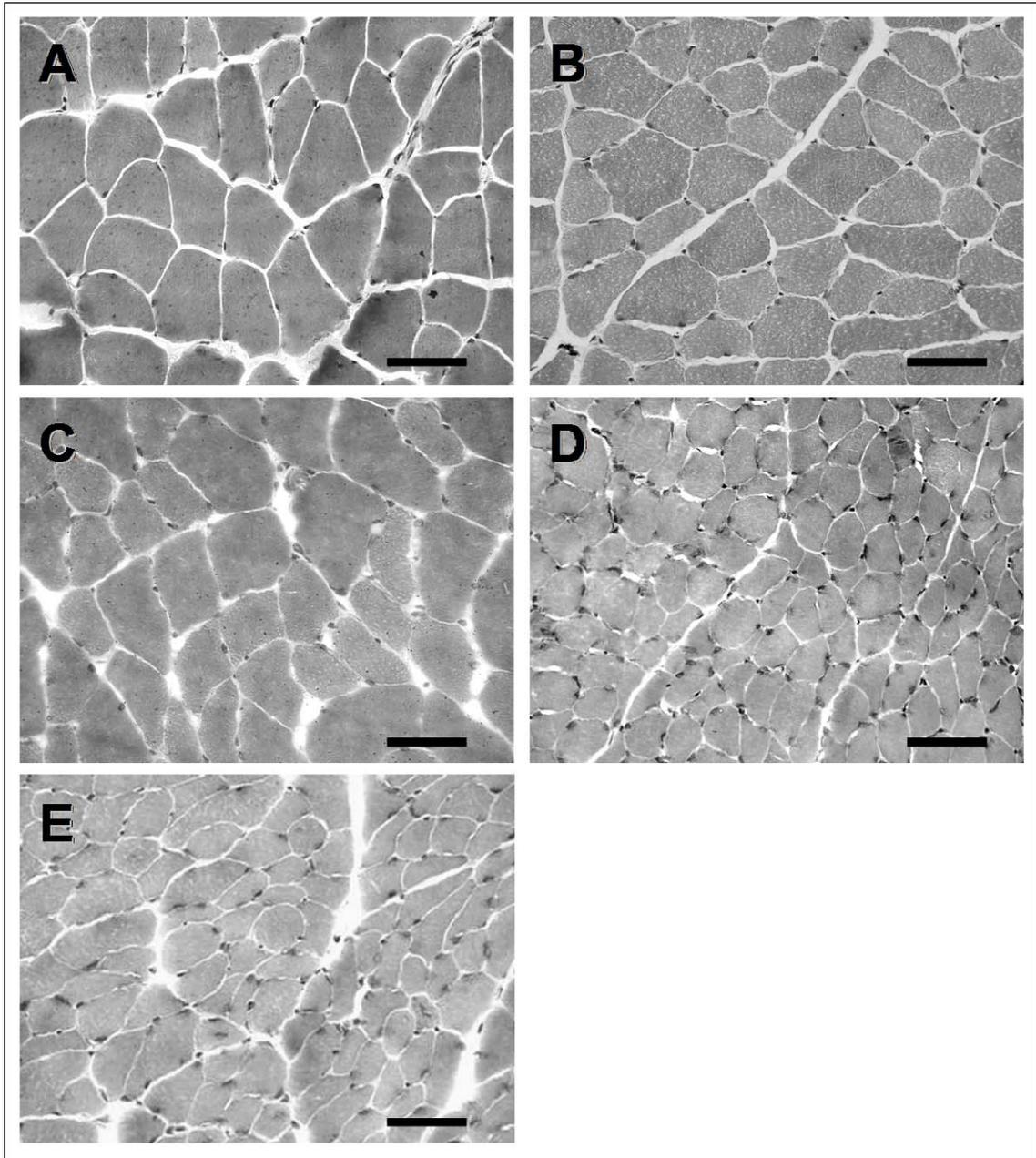


FIGURA 2. Cortes transversais das fibras musculares dos músculos tibial anterior (TA) corados com azul de toluidina. (A) Normal, músculos TA normais; (B) Sham, grupo submetido ao procedimento de desnervação sem lesão nervosa; (C) N+EE, músculos TA normais submetidos a avaliação elétrica e a estimulação elétrica (EE) a cada 48 h; (D) D+EE, músculo TA desnervado submetido a avaliação elétrica e a EE a cada 48 h; (E) D, músculos TA desnervados. Observe a atrofia das fibras musculares dos músculos TA nos grupos desnervados (D, E). Barra, 40 μ m.

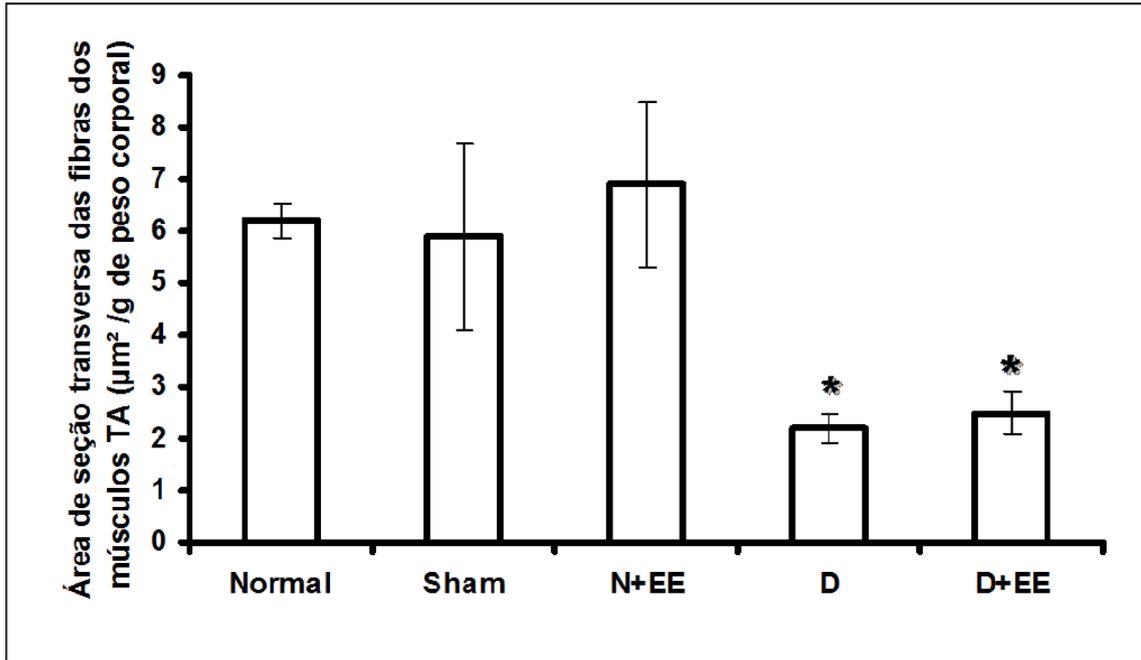


FIGURA 3. Área de secção transversa das fibras musculares do tibial anterior (TA). Os dados são apresentados em média \pm desvio padrão. Normal, músculos TA normais; Sham, grupo submetido ao procedimento de desnervação sem lesão nervosa; N+EE, músculos TA normais submetidos a avaliação elétrica e a estimulação elétrica (EE) a cada 48 h; D, músculos TA desnervados; D+EE, músculo TA desnervado submetido a avaliação elétrica e a EE a cada 48 h. *P < 0,05 quando os grupos desnervados (D e D+EE) foram comparados com o grupo N. Observe que a EE não foi capaz de prevenir a atrofia das fibras musculares após a desnervação.

Expressão gênica de myoD e atrogina-1 por RT-PCR em tempo real.

A desnervação aumentou sensivelmente os níveis de RNAm de myoD e atrogina-1 comparado a valores normais (Fig. 4). Semelhantemente, o grupo D+EE também aumentou a expressão de myoD e atrogina-1 (Fig. 4). Estes níveis foram significativamente mais baixos quando os músculos estimulados eletricamente foram comparados aos músculos desnervados não estimulados (myoD, P = 0,0001; atrogina-1, P = 0,0002), indicando que a EE é capaz de reduzir a expressão de myoD e atrogina-1 em músculos desnervados (Fig. 4). Além disso, os grupos sham e N+EE não apresentaram valores diferentes de myoD e atrogina-1 se comparados ao N (Fig. 4).

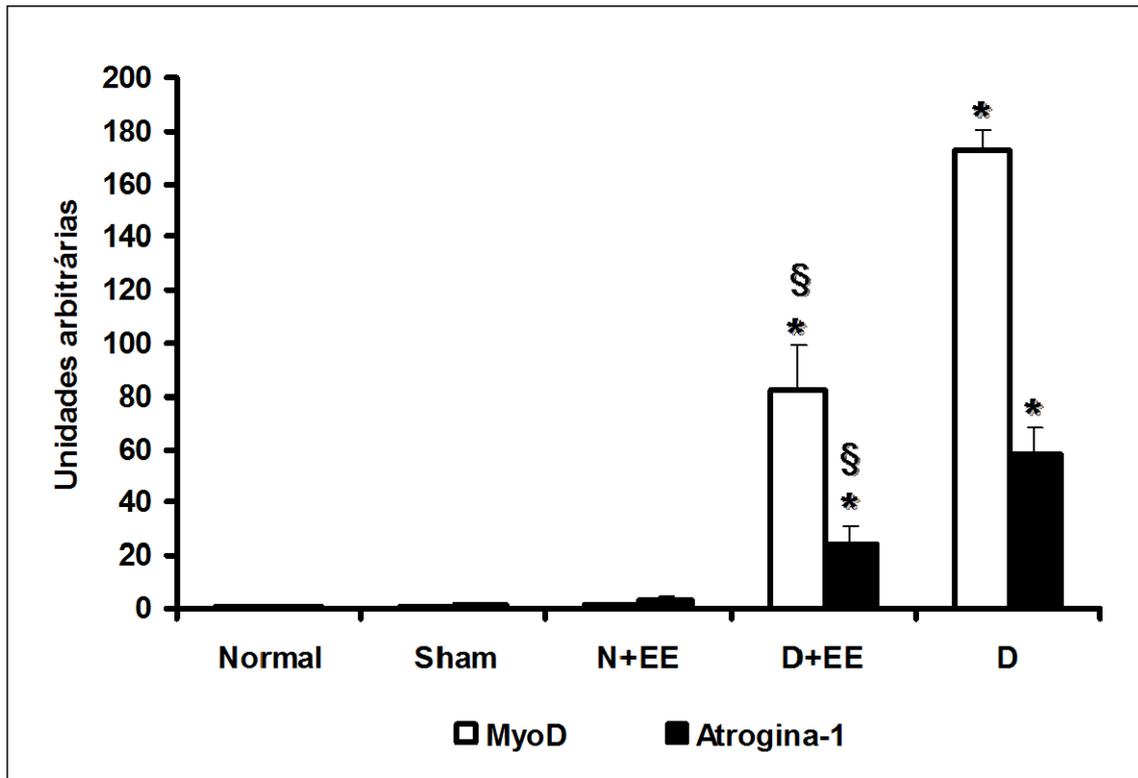


FIGURA 4. Níveis de RNAm de myoD e atrogina-1 em músculo tibial anterior (TA) de rato. Os dados são apresentados em média \pm desvio padrão. Colunas claras, myoD, colunas negras, atrogina-1. Normal, músculos TA normais; Sham, grupo submetido ao procedimento de desnervação sem lesão nervosa; N+EE, músculos TA normais submetidos a avaliação elétrica e a estimulação elétrica (EE) a cada 48 h; D, músculos TA desnervados; D+EE, músculo TA desnervado submetido a avaliação elétrica e a EE a cada 48 h. * $P < 0,05$, grupos D+EE e D comparados ao grupo N; § $P < 0,05$, quando o grupo D+EE é comparado a D. Note que os músculos desnervados submetidos à EE mostraram uma diminuição na expressão gênica de myoD e atrogina-1 quando comparados aos músculos desnervados e não estimulados.

Histologia, imunohistoquímica e microscopia confocal do nervo ciático.

As análises de histologia e imunohistoquímica não mostraram diferenças morfológicas entre os grupos D+EE e D. Em todos os nervos, a análise microscópica do lado proximal ao coto de transecção mostrou a presença de um neuroma terminal (Fig. 5). A coloração por Papanicolau (Fig. 5C e E) mostrou a presença de uma grande quantidade de tecido conjuntivo, caracterizando o neuroma. Imunohistoquímica e imagens confocais com os anticorpos para neurofilamento (branco) e anti-S100 (cinza), Fig. 5D e F, confirmaram a existência de um neuroma ao lado da lesão, pela demonstração da presença de pequenas e irregulares fibras nervosas direcionadas (branco) imersos em um ambiente rico de glia (cinza). Os cortes dos

nervos do grupo D+EE também apresentaram um neuroma terminal ao lado da lesão, como observado pelo Papanicolau (Fig. 5E), anti-neurofilamento e anti-S100 (Fig. 5F).

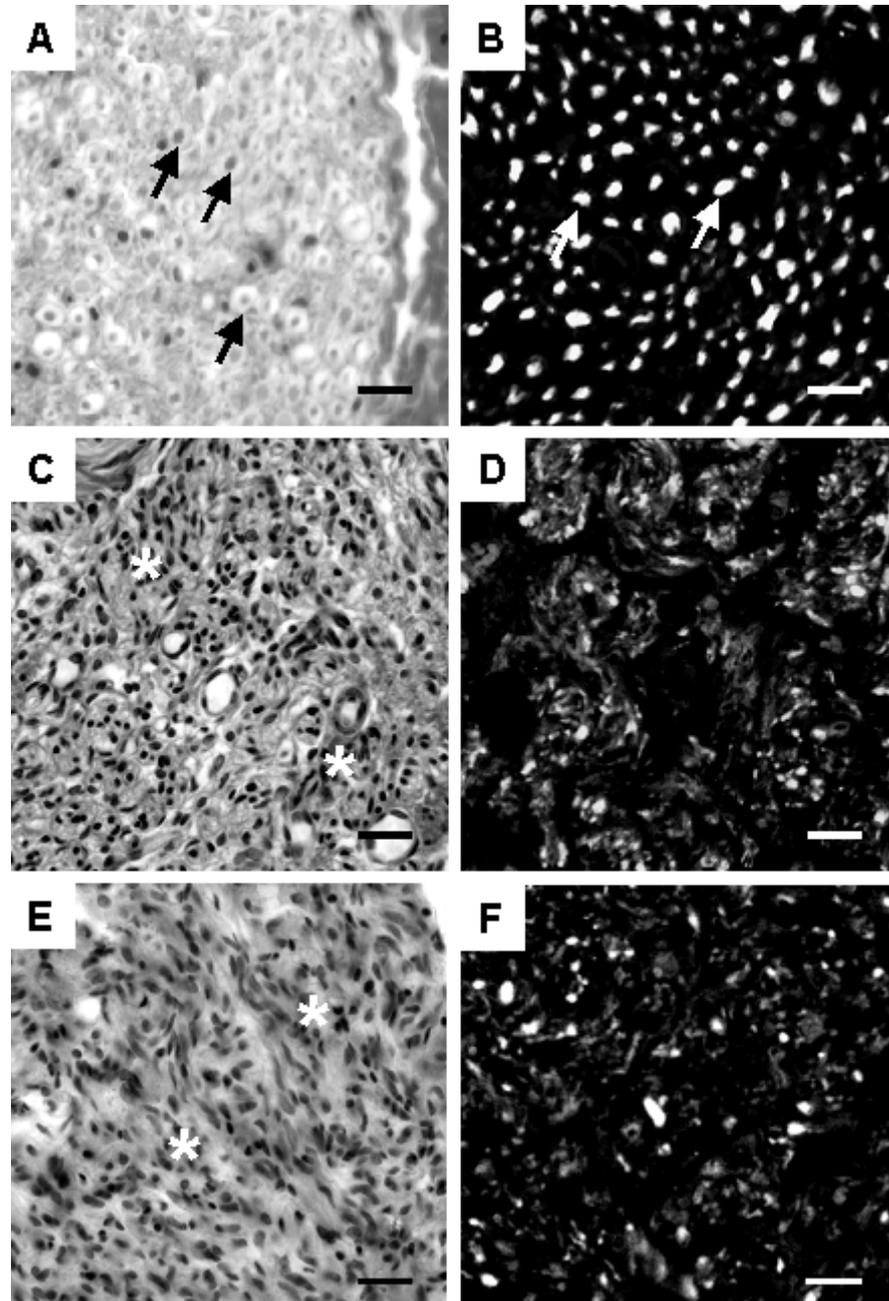


FIGURA 5. Cortes dos nervos ciáticos do controle (A,B), desnervado (C, D) e desnervado tratado com eletroestimulação (E, F). (A,E) Corado por H&E; (C) Corado com Papanicolau; (B,D,F) imagens confocais depois de dupla marcação com anti-neurofilamento (branco) e anti-S100 (cinza). Observe a estrutura normal do nervo (A, B) com axônios delimitados (setas negras em A e brancas em B). A presença de um neuroma terminal imediatamente ao ponto de lesão é observado em C e em E; também podemos notar proliferação de tecido conjuntivo e ausência de organização dos axônios (asteriscos). Imagens confocais (D, F) confirmaram os achados. Barra de escala, 20 μ m.

DISCUSSÃO

O presente estudo mostrou que 20 contrações musculares induzidas por EE a cada 48 h e usando eletrodos de superfície, como normalmente usado na reabilitação, foram capazes de reduzir o acúmulo do RNAm de myoD e atrogina-1 em músculos esquelético desnervado. A expressão destes genes está normalmente elevada depois da desnervação,^{3,4,10,23} indicando que a atividade elétrica promove um efeito regulatório nestes genes em músculos desnervados de rato. Entretanto, o protocolo de EE não preveniu a atrofia das fibras musculares. Embora os resultados deste estudo tenham sido obtidos em músculos de ratos, eles trouxeram novas informações sobre os efeitos da EE sobre a expressão gênica em músculo desnervado. Apesar do fato das dificuldades para executar um estudo semelhante em humanos por razões éticas, futuras investigações usando procedimentos similares de EE em músculos de seres humanos serão necessários para gerar comparações.

Trabalhos prévios mostraram os efeitos benéficos das correntes elétricas em reduzir o aumento da expressão de genes em músculos desnervados.^{4,10,23} Kostrominova et al.²³ mostrou que um protocolo de estimulação elétrica crônico (bursts de 20 pulsos bifásicos, 100 Hz, 9 V, 200 contrações por dia, com 7,2 min de intervalo entre cada contração, durante 2 meses) em músculos extensor longo dos dedos (EDL) desnervados, reduzem a expressão de vários genes aumentados depois da desnervação do músculo esquelético, incluindo a miogenina e calpains (família de proteases ativadas pelo cálcio que é um fator crítico da desestruturação das estruturas do sarcômero no músculo desnervado).

Buonanno et al.⁴ mostrou que depois de 6 a 10 dias de desnervação, os níveis de RNA da myoD, miogenina, myf-5, MRF-4, e receptores de acetilcolina alfa aumentaram em músculo sóleo de rato em aproximadamente 7, 17, 6, 3 e 75 vezes, respectivamente, comparados aos músculos inervados. Entretanto, em músculos desnervados e eletroestimulados (pulso bifásico; tempo on: 1 s; tempo off: 100 s; frequência, 100 Hz;

amplitude, 10-15 mA; duração de pulso, 0,5 ms), os níveis foram aproximadamente 2, 5, 3, 1,4 e 8 vezes maior, respectivamente, comparado aos sóleos inervados.

Estes dados também mostraram que a EE pode regular a expressão gênica de myoD em músculos desnervados. O aumento nos níveis de myoD depois da desnervação é, possivelmente, relacionado não apenas a ativação e a proliferação de células satélites mas também a regulação do ciclo celular.²¹ Na verdade, muitos estudos têm sugerido que a função da indução de myoD durante a desnervação deve funcionar para prevenir a atrofia muscular.²¹ Entretanto, não está claro na literatura se este aumento nos níveis de myoD é uma tentativa do músculo para manter sua estrutura até a reinervação. MyoD parece ter diferentes papéis durante a desnervação, por exemplo, ligando-se a regiões promotoras de muitos genes, como dos receptores de acetilcolina.^{4,18} Além disso, myoD apresenta outras importantes relações com outras vias, incluindo a ubiquitina proteossoma.³⁵ Atrogina-1 pode degradar myoD em períodos embrionários, controlando a ativação e a diferenciação de mioblastos e células satélites. Os efeitos subsequentes do controle da myoD durante a miogênese e regeneração depois de lesões sugere que um aumento na expressão da atrogina-1 pode afetar a regulação e regeneração do músculos esquelético.³⁵

Futuros estudos são necessários para esclarecer a relação entre myoD e atrogina-1. Imediatamente depois da desnervação, os níveis de myoD começam a aumentar, alcançando um pico na primeira semana pós desnervação,^{4,10} sugerindo uma resposta inicial a ausência de estímulo elétrico ou neurotrófico.^{4,10} Entretanto, At t al.¹⁹ mostrou que o aumento do RNA de myoD persiste até 28 dias depois da desnervação, indicando que a myoD possivelmente age como um regulador no processo de regeneração muscular. Entretanto, os níveis de atrogina-1 aumentam progressivamente durante a desnervação, como confirmado pelo aumento na degradação de mioproteínas.³

A influencia elétrica na regulação da expressão de genes é pouco estudada. Huang et al.¹⁸ mostrou que a despolarização da membrana provoca mudanças na cascata da proteína quinase C (PKC) e conseqüentemente na expressão dos MRFs. A excitabilidade normal da membrana mantém a atividade das PKCs, que controlam a expressão de RNAm da myoD e miogenina, provocando um declínio em seus níveis.

A regulação da expressão gênica de myoD e atrogina-1 pela EE poderia ser um primeiro passo da maquinaria gênica para proteger o músculo do aumento da expressão de genes que ocorrem depois da desnervação, como recentemente observado em músculos desnervados submetidos à EE.²³ Entretanto, futuros estudos são necessários para avaliar esta hipótese, uma vez que a regulação foi insuficiente para prevenir a atrofia das fibras musculares em nosso estudo, talvez por causa do baixo número de contrações aplicado. Um trabalho recente,⁸ usando eletrodos implantados, avaliou protocolos de EE usando de 25 a 5000 contrações musculares diárias durante 5 semanas em músculo EDL desnervado de rato. Os autores concluíram que 200 contrações por dia são suficientes para prevenir a atrofia muscular e manter a força contrátil.

O melhor modo para estimular eletricamente músculos desnervados requer que as características de excitabilidade sejam avaliadas. Durante a reabilitação, a excitabilidade muscular é determinada por curvas de amplitude e duração¹ e também pela identificação da cronaxia.²⁸ Estes valores devem ser avaliados periodicamente, permitindo que o terapeuta ajuste os parâmetros elétricos para garantir que o tratamento seja capaz de induzir contração muscular. Este aspecto foi controlado no presente estudo e importantes mudanças na excitabilidade muscular foram detectadas nas medidas de reobase, cronaxia e acomodação. Os músculos desnervados permaneceram hiperexcitados por 28 dias, confirmados pela diminuição nos valores de reobase.^{1,25,28} O grupo N, entretanto, também apresentou uma diminuição na reobase quando submetido ao tratamento elétrico, indicando que não apenas a

desnervação induz alterações na reobase, mas também o tratamento elétrico per se. Esta observação deve ser atribuída a mudanças na condutância de sódio no nervo (N+EE) e no músculo (D+EE), como previamente descrito.^{27,28}

Os valores de cronaxia apresentaram um aumento e depois permaneceram elevados por 28 dias em acordo com estudos prévios.^{1,25,27,28} É bem conhecido que músculos desnervados tornam-se menos responsáveis a pulsos elétricos de curta duração, e que uma longa duração de pulso é necessária para induzir contração.^{25,30} Recentemente, foi mostrado que a cronaxia alcança valores 80 vezes maiores em 28 dias pós desnervação quando comparado aos valores pré desnervação em músculo TA de rato.²⁸ Uma análise de músculos TA desnervados em coelhos mostrou um aumento de 3 vezes nos valores de cronaxia depois de 14 dias de desnervação, mantendo-se estáveis por 24 semanas.¹ Esta alteração no tempo de resposta muscular a pulsos elétricos representa um problema clínico para a estimulação de músculos desnervados.

Nossa análise morfológica dos nervos mostrou que o procedimento cirúrgico usado para induzir a desnervação do músculo (completa interrupção do nervo), levou a formação de um neuroma terminal que inibiu a regeneração das fibras nervosas próximo ao local de lesão. Nenhuma diferença morfológica entre D e D+EE foi detectada, demonstrando que a EE nos músculos não exerce ação sobre a formação do neuroma em nervos seccionados. Este resultado, associado com os valores de cronaxia superiores a 1 ms, confirmaram que os músculos TA foram mantidos desnervados ao longo dos 28 dias de experimento.

Em conclusão, os resultados deste estudo mostraram que 20 contrações musculares, induzidas eletricamente usando eletrodos de superfície e aplicadas em dias alternados baseado na excitabilidade muscular, similar aos protocolos usados na reabilitação clínica de humanos foram capazes de reduzir o acúmulo de RNAm de myoD e atrogina-1 em músculos desnervados, relacionados aos crescimento muscular e atrofia, respectivamente. Embora os

resultados foram obtidos em músculos de rato, eles trazem interessantes informações para a reabilitação em humanos, porque mostram efeitos significativos da EE na expressão de dois genes do trofismo muscular.

Este projeto recebeu apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP; Número do processo: 05/5474-3). T. L. Russo e S. M. Peviani foram bolsistas de doutorado da FAPESP. C. M. Freria foi bolsista de iniciação científica do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), e D. Gigo-Benato foi bolsista de mestrado da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

REFERÊNCIAS

1. Ashley Z, Sutherland H, Lanmuller H, Unger E, Li F, Mayr W, Kern H, Jarvis JC, Salmons S. Determination of the chronaxie and rheobase of denervated limb muscles in conscious rabbits. *Artif Organs* 2005;29(3):212-215.
2. Billington L, Carlson BM. The recovery of long-term denervated rat muscles after Marcaine treatment and grafting. *J Neurol Sci* 1996;144(1-2):147-155.
3. Bodine SC, Latres E, Baumhueter S, Lai VK, Nunez L, Clarke BA, Poueymirou WT, Panaro FJ, Na E, Dharmarajan K, Pan ZQ, Valenzuela DM, DeChiara TM, Stitt TN, Yancopoulos GD, Glass DJ. Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science* 2001;294(5547):1704-1708.
4. Buonanno A, Apone L, Morasso MI, Beers R, Brenner HR, Eftimie R. The MyoD family of myogenic factors is regulated by electrical activity: isolation and characterization of a mouse Myf-5 cDNA. *Nucleic Acids Res* 1992;20(3):539-544.
5. Bustin SA. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol* 2000;25(2):169-193.
6. Cao PR, Kim HJ, Lecker SH. Ubiquitin-protein ligases in muscle wasting. *Int J Biochem Cell Biol* 2005;37(10):2088-2097.
7. Cummings J. Electrical stimulation in denervated muscle. In: Gersh M, editor. *Electrotherapy in Rehabilitation*. 3rd ed. New York: Churchill Livingstone; 1990. p 269-290.
8. Dow DE, Cederna PS, Hassett CA, Kostrominova TY, Faulkner JA, Dennis RG. Number of contractions to maintain mass and force of a denervated rat muscle. *Muscle Nerve* 2004;30(1):77-86.
9. Eberstein A, Eberstein S. Electrical stimulation of denervated muscle: is it worthwhile? *Med Sci Sports Exerc* 1996;28(12):1463-1469.

10. Eftimie R, Brenner HR, Buonanno A. Myogenin and MyoD join a family of skeletal muscle genes regulated by electrical activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88(4):1349-1353.
11. Geddes LA. Accuracy limitations of chronaxie values. *IEEE Trans Biomed Eng* 2004;51(1):176-181.
12. Glass DJ. Molecular mechanisms modulating muscle mass. *Trends Mol Med* 2003;9(8):344-350.
13. Glass DJ. Skeletal muscle hypertrophy and atrophy signaling pathways. *Int J Biochem Cell Biol* 2005;37(10):1974-1984.
14. Gomes MD, Lecker SH, Jagoe RT, Navon A, Goldberg AL. Atrogin-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98(25):14440-14445.
15. Gomes AR, Soares AG, Peviani S, Nascimento RB, Moriscot AS, Salvini TF. The effect of 30 minutes of passive stretch of the rat soleus muscle on the myogenic differentiation, myostatin, and atrogin-1 gene expressions. *Arch Phys Med Rehabil* 2006;87(2):241-246.
16. Harris R. Cronaxia. In: Licht S, Journet A, J G-A, editors. *Electrodiagnóstico y Electromiografía*. Barcelona: Editorial Jims; 1970. p 237-265.
17. Hill M, Goldspink G. Expression and splicing of the insulin-like growth factor gene in rodent muscle is associated with muscle satellite (stem) cell activation following local tissue damage. *J Physiol* 2003;549(Pt 2):409-418.
18. Huang CF, Neville CM, Schmidt J. Control of myogenic factor genes by the membrane depolarization/protein kinase C cascade in chick skeletal muscle. *FEBS Lett* 1993;319(1-2):21-25.

19. Hyatt JP, Roy RR, Baldwin KM, Edgerton VR. Nerve activity-independent regulation of skeletal muscle atrophy: role of MyoD and myogenin in satellite cells and myonuclei. *Am J Physiol Cell Physiol* 2003;285(5):C1161-1173.
20. Hyatt JP, Roy RR, Baldwin KM, Wernig A, Edgerton VR. Activity-unrelated neural control of myogenic factors in a slow muscle. *Muscle Nerve* 2006;33(1):49-60.
21. Ishido M, Kami K, Masuhara M. In vivo expression patterns of MyoD, p21, and Rb proteins in myonuclei and satellite cells of denervated rat skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004;287(2):C484-493.
22. Kandarian SC, Stevenson EJ. Molecular events in skeletal muscle during disuse atrophy. *Exerc Sport Sci Rev* 2002;30(3):111-116.
23. Kostrominova TY, Dow DE, Dennis RG, Miller RA, Faulkner JA. Comparison of gene expression of 2-mo denervated, 2-mo stimulated-denervated, and control rat skeletal muscles. *Physiol Genomics* 2005;22(2):227-243.
24. Lecker SH, Jagoe RT, Gilbert A, Gomes M, Baracos V, Bailey J, Price SR, Mitch WE, Goldberg AL. Multiple types of skeletal muscle atrophy involve a common program of changes in gene expression. *Faseb J* 2004;18(1):39-51.
25. Licht S JA, García-Alsina J. *Electrodiagnóstico & Electromiografía*. Barcelona: Editorial Jims; 1970.
26. Lieber RL. *Skeletal muscle structural, function & plasticity*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2004.
27. Paternostro-Sluga T, Schuhfried O, Vacariu G, Lang T, Fialka-Moser V. Chronaxie and accommodation index in the diagnosis of muscle denervation. *Am J Phys Med Rehabil* 2002;81(4):253-260.

28. Russo T, França C, Castro C, Salvini TF. Alterations of chronaxie, rheobase and accommodation in denervated skeletal muscle submitted to electrical stimulation. *Brazilian Journal of Physical Therapy* 2004;8:169-175.
29. Sakuma K, Watanabe K, Sano M, Uramoto I, Sakamoto K, Totsuka T. The adaptive response of MyoD family proteins in overloaded, regenerating and denervated rat muscles. *Biochim Biophys Acta* 1999;1428(2-3):284-292.
30. Salmons S, Ashley Z, Sutherland H, Russold MF, Li F, Jarvis JC. Functional electrical stimulation of denervated muscles: basic issues. *Artif Organs* 2005;29(3):199-202.
31. Saper CB, Sawchenko PE. Magic peptides, magic antibodies: guidelines for appropriate controls for immunohistochemistry. *J Comp Neurol* 2003;465(2):161-163.
32. Siu PM, Alway SE. Mitochondria-associated apoptotic signalling in denervated rat skeletal muscle. *J Physiol* 2005;565(Pt 1):309-323.
33. Spielholz N. Electrical stimulation of denervated muscle. In: Nelson R, Hayes K, Currier D, editors. *Clinical Electrotherapy*. 3rd ed. Tamford: Appleton & Lange; 1999. p 411-446.
34. Stockholm D, Herasse M, Marchand S, Praud C, Roudaut C, Richard I, Sebille A, Beckmann JS. Calpain 3 mRNA expression in mice after denervation and during muscle regeneration. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001;280(6):C1561-1569.
35. Tintignac LA, Lagirand J, Batonnet S, Sirri V, Leibovitch MP, Leibovitch SA. Degradation of MyoD mediated by the SCF (MAFbx) ubiquitin ligase. *J Biol Chem* 2005;280(4):2847-2856.
36. Walters EH, Stickland NC, Loughna PT. The expression of the myogenic regulatory factors in denervated and normal muscles of different phenotypes. *J Muscle Res Cell Motil* 2000;21(7):647-653.

37. Witzemann V, Sakmann B. Differential regulation of MyoD and myogenin mRNA levels by nerve induced muscle activity. *FEBS Lett* 1991;282(2):259-264.
38. Yoshimura K, Harii K. A regenerative change during muscle adaptation to denervation in rats. *J Surg Res* 1999;81(2):139-146.

6. MANUSCRITO II

Artigo publicado em periódico internacional indexado A (Muscle & Nerve 37: 593-600, 2008). Aceito em 14 de Janeiro de 2008.

A ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA AUMENTA A EXPRESSÃO GÊNICA DA METALOPROTEINASE-2 DE MATRIZ, MAS NÃO MUDA SUA ATIVIDADE EM MÚSCULO DESNERVADO DE RATO.

Thiago Luiz Russo¹, MS, Sabrina Messa Peviani¹, MS, João Luiz Quagliotti Durigan¹, MS, and Tania Fátima Salvini¹, MS, PhD.

¹Departamento de Fisioterapia, Universidade Federal de São Carlos, Rodovia Washington Luís, Km 235, CEP 13565-905, São Carlos, São Paulo, Brasil.

Correspondência para: T. Fátima Salvini; e-mail: tania@power.ufscar.br

Abreviaturas: ANOVA, análise de variância; AST, área de secção transversa; Ct, limiar do ciclo; MEC, matriz extracelular; FES, estimulação elétrica funcional; GAPDH, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase; MMP-2, metaloproteinase-2; MMP-9, metaloproteinase-9; RNAm, ácido ribonucléico mensageiro; JNM, junção neuromuscular; PCR, reação em cadeia de polimerase; TA, tibial anterior; TB, azul de toluidina/1% bórax; TIMPs, inibidor tecidual de metaloproteinases.

RESUMO

A atrofia da fibra muscular após a desnervação ocorre concomitantemente com a proliferação de tecido conjuntivo intramuscular. Estes eventos interferem negativamente sobre as propriedades mecânicas e funcionais dos músculos desnervados comprometendo sua recuperação. A estimulação elétrica (EE) é usada na reabilitação dos seres humanos para tratar músculos desnervados. Entretanto, os efeitos desta terapia sobre a matriz extracelular (MEC) intramuscular permanecem incertos. Metaloproteinases (MMPs) são responsáveis pelo remodelamento da MEC em muitas doenças neuromusculares. Este estudo avalia o efeito da EE na atividade de duas importantes MMPs, a MMP-2 e a MMP-9, ambas envolvidas no remodelamento da MEC em músculos desnervados de rato. Trinta e quatro ratos Wistar (3 meses de idade, $356 \pm 38,7$ g) foram divididos em cinco grupos: desnervado (D); D+EE; sham desnervação; normal (N); e N+EE. Vinte contrações musculares máximas foram induzidas a cada 48 h usando eletrodos de superfície, como geralmente usados na reabilitação de músculos desnervados em humanos. As análises de zimografia e reação em cadeia de polimerase (PCR) em tempo real das MMPs foram usadas para avaliar os músculos depois de 28 dias de desnervação. Tanto o grupo D como o D+EE apresentaram um aumento na atividade da MMP-2 comparado com o grupo N ($P < 0,05$). Além disso, apenas D+EE apresentou aumento da expressão gênica da MMP-2 comparado com o grupo N ($P < 0,05$). A atividade da MMP-9 não foi detectada em nenhum dos grupos. Os resultados deste estudo indicam que a desnervação aumenta a atividade da MMP-2 e a EE regula a expressão gênica da MMP-2 em músculo esquelético desnervado de rato. Estes achados ajudam a esclarecer os efeitos da EE sobre a MEC de músculos desnervados e pode ser útil para o desenho de novas estratégias terapêuticas para a reabilitação de pacientes com músculos desnervados.

Palavras-chave: tecido conjuntivo; atrofia muscular; lesão nervosa; músculo esquelético.

A reabilitação física de músculos desnervados em seres humanos é longa e normalmente incompleta.¹⁷ Uma profunda perda de massa e da habilidade de geração de força ocorre depois da desnervação.^{3,4,9,13,16} Mudanças na demanda em doenças musculares, como depois da desnervação, causa o remodelamento da matriz extracelular (MEC),⁸ e as metaloproteinases de matriz (MMPs) tem um papel crítico nas modificações da MEC.^{1,8,28} MMPs são uma família de enzimas proteolíticas zinco-dependentes composta por mais de 22 membros incluindo subfamílias como colagenases, gelatinases, estromelisinases e MMP do tipo membrana.^{5,28} As MMPs são sintetizadas como uma forma pró ou inativa que precisa ser processada para se tornar ativa. Elas são secretadas por células presentes no músculo esquelético como as células de Schwann, axônios, células satélites e fibroblastos.⁵

Considerando a grande família de MMPs, a MMP-2 (gelatinase A) e a MMP-9 (gelatinase B) são enzimas chaves no processo de remodelamento da MEC no músculo esquelético durante mudanças de demanda de atividade e respostas frente a lesões.⁵ Ambas são conhecidas por degradar a forma não fibrilar de colágeno tipo IV e desnaturar colágenos intersticiais.¹

MMPs têm sido relacionadas com uma variedade de processos de desenvolvimento, funcionais e patológicos do músculo esquelético.^{5,22} Entretanto, seus papéis nos músculos desnervados permanecem incertos. Apenas alguns poucos estudos investigaram o papel das MMPs em doenças neuromusculares.^{1,8,14,15,28,29} Em músculos normais de camundongo, MMP-2 e -9 são localizadas na junção neuromuscular (JNM), células de Schwann e no perineuro de nervos intramusculares.¹⁴ Entretanto, depois da lesão por esmagamento, as MMPs permanecem presentes na JNM,^{8,14} mas também podem ser encontradas ao redor de fibras musculares, capilares, MEC ou células mononucleadas.⁸

Entender como estas MMPs reagem a recursos terapêuticos normalmente usados na reabilitação de músculos desnervados pode ser importante para desenvolver novas estratégias

terapêuticas. A estimulação elétrica (EE) aplicada por eletrodos de superfície é usada para a recuperação de músculos desnervados em humanos^{10, 27} e em modelos animais.²⁵⁻²⁷ Estudos animais têm mostrado, recentemente, que a EE é um potente estímulo capaz de regular a expressão gênica no músculo pós desnervação.^{16,26} Koskinen et al.¹⁵ mostrou que a estimulação elétrica funcional (FES) prolongada de músculos paralisados, em indivíduos com lesão medular, aumentando a quebra de colágeno tipo IV em músculos esqueléticos como resposta ao treino de carga. Entretanto, ainda é incerto como a EE afeta o remodelamento da MEC do tecido muscular depois da lesão nervosa periférica.

Recentemente, nós mostramos que a EE regula fatores musculares como myoD e atrogina-1 relacionados, respectivamente, com vias de hipertrofia e atrofia em músculos de ratos depois da secção total do nervo.²⁶ Baseado nestes resultados nós hipotetizamos que a EE poderia também afetar a atividade das MMPs em músculos desnervados. Ao Proposta deste estudo foi avaliar os efeitos da EE tanto no RNA mensageiro (RNAm) como na atividade gelatinolítica das MMPs em músculos desnervados de rato.

MATERIAIS E MÉTODOS

Trinta e quatro ratos Wistar machos com 3 meses de idade ($356 \pm 38,7\text{g}$) foram usados. Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas em uma sala com as variáveis ambientais controladas e livre acesso a água e alimentação. Os procedimentos experimentais foram aprovados pelo comitê de ética da universidade e o estudo foi conduzido de acordo com as normas nacionais.

Os animais foram randomicamente divididos em 5 grupos: D, músculo tibial anterior (TA) desnervado ($n = 8$); D+EE, TA desnervado submetido a avaliação da excitabilidade elétrica e a EE a cada 48 h ($n = 8$); sham, submetido aos procedimentos experimentais sem lesão nervosa ($n = 5$); N+EE, TA normal submetido a avaliação da excitabilidade elétrica e a EE a cada 48h ($n = 8$); e N, animais normais ($n = 5$). Todos os grupos foram avaliados no 28º dia dos procedimentos experimentais. Esse período de desnervação foi escolhido porque a atrofia muscular^{4,25,31} e as mudanças na composição da MEC e na atividade das MMPs⁸ são maiores nos músculos esqueléticos de rato durante as primeiras semanas pós-desnervação.

O músculo TA foi escolhido porque quase todas as suas fibras atravessam a porção central do ventre do músculo e são distribuídas de tendão a tendão.¹⁸ além disso, ele é um músculo superficial, tornando fácil a identificação da mínima contração visível e permitindo que a EE seja aplicada diretamente sobre a pele usando eletrodos de superfície.

Os ratos foram anestesiados com uma injeção intraperitoneal de xilazina (12 mg/Kg) e quetamina (95 mg/Kg) para os procedimentos cirúrgicos e desnervação, avaliação elétrica, tratamento elétrico e remoção dos músculos. Eles foram mortos com uma overdose de anestésico.

Procedimento de Desnervação.

O procedimento de desnervação foi realizado como previamente descrito.²⁶ Brevemente, 1 cm do nervo ciático direito foi cortado e removido promovendo uma desnervação distal dos músculos da pata traseira, incluindo o músculo TA.

A desnervação do TA foi confirmada durante o período experimental pelas medidas de cronaxia.²⁶ O músculo TA foi considerado desnervado quando apresentava valores de cronaxia maiores que 1 ms.^{10,11,23,25,26} Músculos TA foram desconsiderados quando os valores de cronaxia foram menores ou iguais a 1 ms no 28º dia.

Avaliação elétrica e procedimentos para estimulação.

Um equipamento para a estimulação elétrica que permitia mudanças nos parâmetros elétricos foi usado para avaliar a excitabilidade dos músculos e para o tratamento elétrico.²⁶ Resumidamente, dois eletrodos de superfície foram usados: um eletrodo indiferente (circular, auto-adesivo, com 5 cm de diâmetro) posicionado nas costas do animal; e um eletrodo ativo (metálico com 3 mm de diâmetro) para estimular o músculo TA. Durante os procedimentos da EE, o eletrodo ativo foi mantido em contato com a pele imediatamente acima do TA perpendicular às fibras musculares.

Antes de cada avaliação dos parâmetros elétricos, a região sobre o TA em que a mínima amplitude necessária para induzir uma contração muscular foi identificada. Os parâmetros elétricos (reobase, cronaxia e acomodação) foram avaliados antes de cada tratamento elétrico como descrito previamente.^{25,26}

Os valores identificados durante a avaliação elétrica foram usados para determinar os parâmetros da EE para cada sessão. Para cronaxia maior que 1 ms, uma corrente monofásica exponencial foi usada (frequência: 20 Hz; duração de pulso: duas vezes o valor da cronaxia; tempo on: 3 s; tempo off: 6s). A amplitude de pulso necessária para induzir uma contração

visível foi selecionada. A frequência de estimulação selecionada permitiu uma contração muscular vigorosa usando baixas amplitudes de corrente.⁷

Neste estudo um número pequeno de contrações musculares foi usado para mimetizar o que é normalmente recomendado durante uma única sessão de reabilitação para a recuperação de músculos desnervados em humanos. Além disso, 20 contrações musculares foram escolhidas porque uma longa duração de estimulação foi usada (tempo on: 3 s) podendo induzir fadiga muscular, desde que todas as contrações foram feitas em uma única sessão de tratamento.

Avaliação muscular.

Os animais foram pesados e os músculos TA direitos foram cuidadosamente dissecados e removidos. Os músculos foram então divididos em duas partes a partir da região central do ventre muscular, com o fragmento distal sendo usado para análise morfométrica (medidas de área de secção transversa) e o proximal sendo dividido novamente em outros dois novos pedaços, um para RNAm e outro para a zimografia. Estes dois fragmentos foram congelados em nitrogênio líquido e armazenados em freezer -80°C (Foram Scientific, Marietta, Ohio).

Para a avaliação morfométrica, o fragmento distal foi imediatamente congelado em isopentano, pré-congelado em nitrogênio líquido, e armazenados em freezer a -80°C. Cortes seriados transversais (10 µm) foram então obtidos da região média do ventre dos músculos TA congelados usando um micrótomo criostato (HE 505, Microm, Jean, Alemanha). Os cortes foram corados com 1% azul de toluidina/1% bórax (TB) para avaliar a área de secção transversa (AST) das fibras musculares.^{24,26}

Um corte histológico do ventre muscular de cada músculo TA (n = 5 por grupo) foi usado para as medidas de AST. Estas medidas foram realizadas na região central dos cortes

histológicos. Para obter as imagens, um microscópio de luz (Axiolab; Carl Zeiss, Jena, Alemanha) equipado com uma câmera digital (DSC S75; Sony, Tóquio, Japão) foi usada. A AST de 200 fibras escolhidas aleatoriamente foram medidas usando o software AxioVision 3.0.6 SP4 (Carl Zeiss, Jena, Alemanha).

Para análise do tecido conjuntivo intramuscular, um sistema planimétrico foi usado com pontos de intersecção. A quantificação foi realizada por um retículo com área total de 2500 μm^2 , contendo 56 linhas de intersecção.²⁰ A porcentagem da densidade de tecido conjuntivo foi calculada ao dividir o número total de pontos de coincidência com o tecido conjuntivo (endomísio e perimísio) pelo total de intersecções no plano. Esta análise foi realizada em 5 áreas por corte, incluindo 5 fotos por animal, totalizando 1400 pontos por animal.

Extração dos tecidos e a análise zimográfica foram realizadas de acordo com metodologia atual.¹⁹ A massa molecular da atividade gelatinolítica de cada banda foi determinada por comparação a um marcador de massa molecular de proteína (PageRuler Prestained Protein Ladder; Fermentas Life Sciences, Burlington, Ontário). A atividade das bandas foi identificada como descrita e de acordo seus pesos moleculares (72 kDa: pró-MMP-2; 64 kDa: intermediária MMP-2; 57 kDa: MMP-2 ativa; 92 kDa: pró-MMP-9; 81 kDa: MMP-9 ativa).⁶ A análise quantitativa densitométrica das bandas das proteínas na zimografia foi realizada usando o software GeneTools v3.06 (Syngene, Cambridge, UK).

Isolamento e análise do RNA.

Um fragmento congelado de cada músculo foi homogeneizado e o RNA total foi extraído usando o reagente Trizol (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia) de acordo com as instruções do fabricante. Tanto a extração do RNA quando a síntese de cDNA foram feitas de acordo com estudos prévios.^{24,26}

Oligonucleotídeos Primers.

Os primers foram desenhados para gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH; GenBank, AF106860) usando o software PrimerExpress v2.0 (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia). Menon et al.²¹ descreveu a seqüência do primer para MMP-2. Os primers foram sintetizados pela Imprint (Campinas, São Paulo, Brasil). As seqüências gênicas usadas foram para GAPDH de rato (senso: GATGCTGGTGCTGAGTATGTCG; antisenso: GTGGTGTCAGGATGCATTGCTGA); e a MMP-2 do rato (senso: CTGATAACCTGGATGCAGTCGT; antisenso: CCAGCCAGTCCGATTTGA).

Análise por reação em cadeia de polimerase em tempo real.

Os níveis transcricionais de RNA para os músculos dos grupos experimentais e controle foram analisados simultaneamente e as reações realizadas em duplicata em um LightCycler (Rotor Gene 3000, Cobertt Research, São Francisco, Califórnia) usando um marcador para detecção de fluorescência, o SYBR-green (Applied biosystems, Foster City, Califórnia) e 180 nM de cada primer em um volume final de 50 µl. As condições térmicas de ciclagem para MMP-2 e GAPDH foram: 10 min a 95°C, seguidos por 40 ciclos de 15 s a 94°C., 30 s a 48°C para a MMP-2 e a 56°C para o GAPDH, respectivamente, e 1 min a 72°C. Para cada gene, todas amostras foram amplificadas simultaneamente em duplicata em uma mesma corrida. Dados foram analisados usando limiares de ciclo (Ct) de uma forma comparativa. A expressão do gene alvo foi normalizada pelo GAPDH.^{8,12}

Estatística.

Testes de normalidade e Levene foram feitos primeiramente para confirmar se os dados eram paramétricos. Após isso, a análise de variância one-way ANOVA foi usada para identificar possíveis diferenças entre os grupos. Quando estas diferenças foram observadas, o

teste de Tukey foi utilizado. Para todos os testes, um nível de significância de 5% foi adotado ($P \leq 0,05$).

RESULTADOS

Densidade do tecido conjuntivo.

A desnervação aumentou a densidade de tecido conjuntivo (D: $20,7 \pm 6,4\%$, $P = 0,02$; D+EE: $21,42 \pm 7,6\%$, $P = 0,002$) comparado com valores normais ($7,7 \pm 2,9\%$). Não houve diferença entre os grupos D e D+EE. Além disso, nenhuma diferença foi encontrada na densidade de tecido conjuntivo dos músculos TAs entre os grupos N, Sham ($9,3 \pm 3,6\%$), e N+EE ($9,1 \pm 3,4\%$).

Distribuição da área de secção transversa das fibras musculares.

Os grupos N, Sham e N+EE mostraram uma distribuição na AST heterogênea, variando de 0,1 a valores maior que $7,01 \mu\text{m}^2/\text{g}$ de peso corporal (Fig 1), enquanto os grupos D e D+EE variaram entre 1,01 a $4,0 \mu\text{m}^2/\text{g}$ de peso corporal (Fig 1).

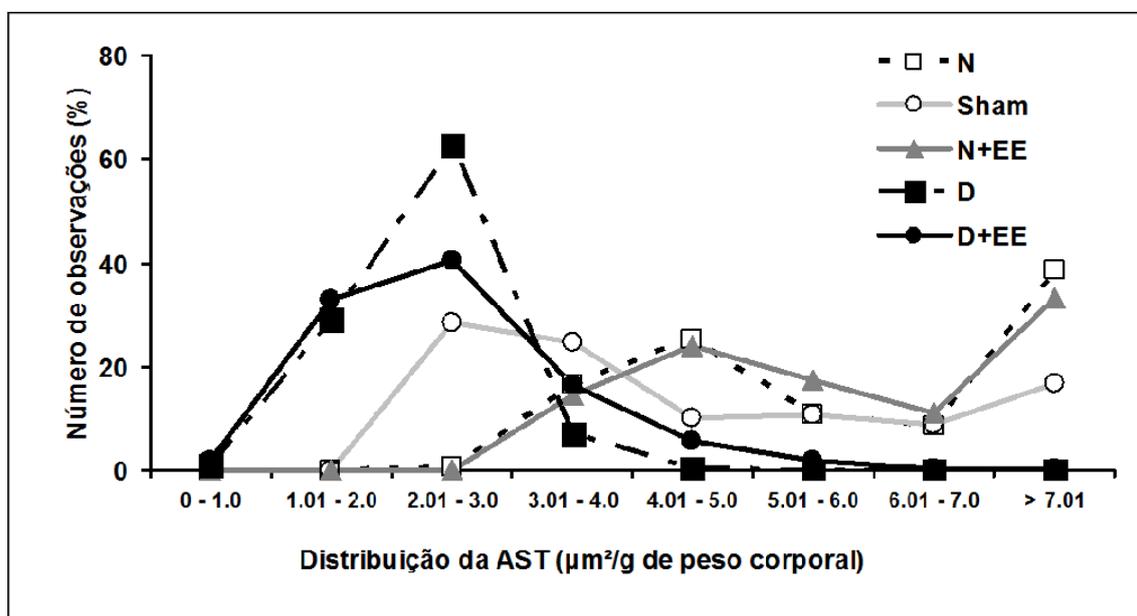


FIGURA 1. Distribuição da área de secção transversa da fibra muscular. Os grupos foram: N, normal; sham, submetido ao procedimento de desnervação sem lesão nervosa; D+EE, músculo TA desnervado submetido a avaliação elétrica e a EE a cada 48 h; D, músculo TA desnervado; N+EE, músculo TA normal submetido a avaliação elétrica e a EE a cada 48 h. Os grupos D e D+EE apresentaram uma diminuição na AST.

Análise zimográfica.

A análise zimográfica mostrou 3 bandas bem definidas (72 kDa / pró-MMP-2, 64 kDa / MMP-2 intermediária e 57 kDa / MMP-2 ativa). Um visível aumento nas três bandas da MMP-2 foi particularmente observado nos grupos D e D+EE (Fig 2).

A análise quantitativa das densidades das bandas mostrou que todas os componentes da MMP-2 aumentaram sua atividade em D comparado ao grupo N (pró: 2,9 vezes, $P = 0,0002$; intermediária: 2,1 vezes, $P = 0,001$; ativa: 5,8 vezes, $P = 0,0002$; Fig 2). O grupo D+EE também apresentou um aumento na atividade da MMP-2 (pró: 3,2 vezes, $P = 0,0001$; intermediária: 2,2 vezes, $P = 0,001$; ativa: 5,9 vezes, $P = 0,0001$) comparado com o grupo N, embora estes valores não foram diferentes daqueles encontrados no grupo D ($P = 0,9$; Fig 2). Nenhuma diferença entre os grupos N, sham e N+EE foi encontrada ($P > 0,05$). A atividade da MMP-9 não foi identificada em nenhum dos grupos avaliados.

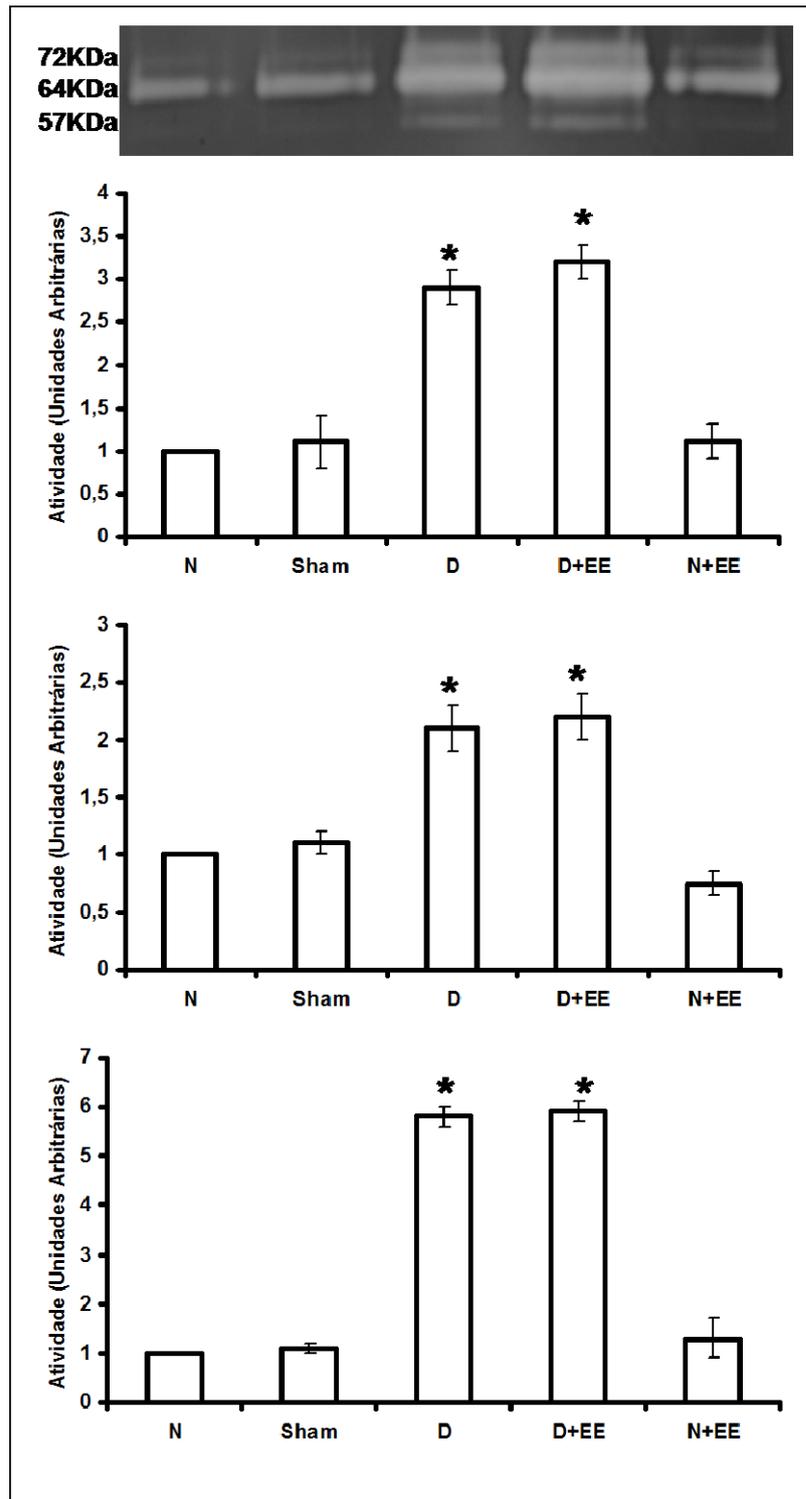


FIGURA 2. Densitometria das bandas de zimografia da MMP-2 em unidades arbitrárias. Ver Figura 1 para identificação dos grupos. (A) Atividade da forma latente da MMP-2 (72 kDa); (B) atividade da forma intermediária da MMP-2 (64 kDa); (C) atividade da forma ativa da MMP-2 (57 kDa). * $P < 0,05$ comparado aos valores de N (A-C). Os grupos D e D+EE apresentaram um aumento significativo na atividade das diferentes formas da MMP-2. A estimulação elétrica em músculos inervados (N+EE) não alterou a atividade da MMP-2. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão.

Expressão gênica da MMP.

Como a MMP-9 não foi detectada pela zimografia, apenas a expressão gênica da MMP-2 foi realizada. A EE aumentou a expressão gênica da MMP-2 em músculos desnervados (D+EE) em cerca de 2,6 e 1,9 vezes comparada com os grupos N ($P = 0,0007$) e D ($P = 0,0006$), respectivamente (Fig 3). Nenhuma diferença entre os grupos N, Sham, D e N+EE foi encontrada.

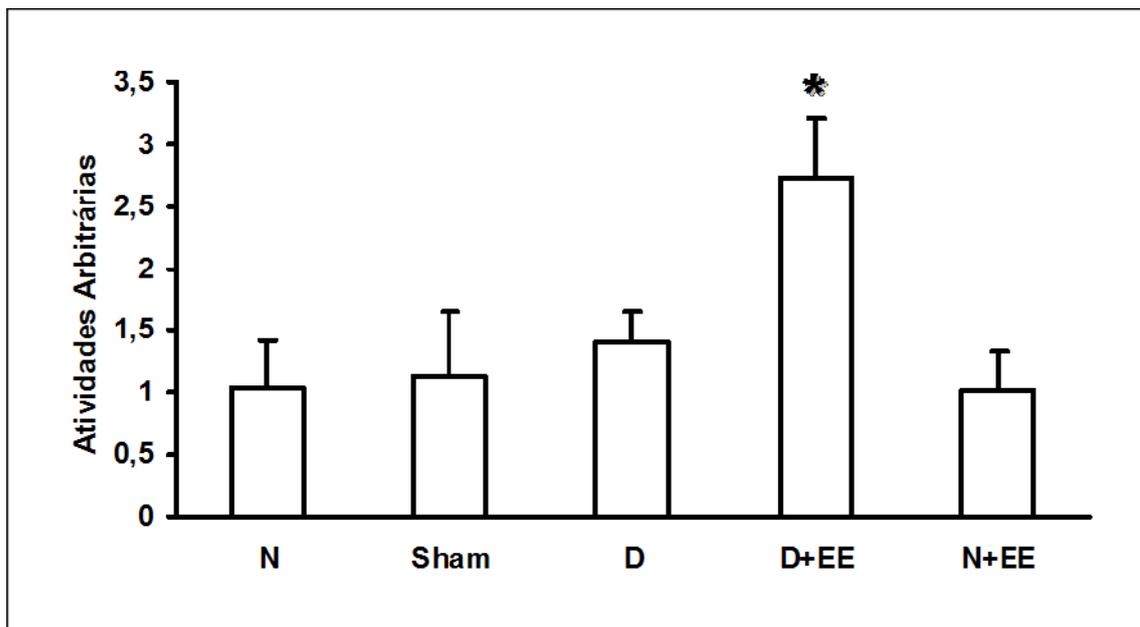


FIGURA 3. Níveis de RNAm da MMP-2 em músculo tibial anterior (TA) de rato. Ver a Figura 1 para a abreviatura. * $P < 0,05$ comparado com N. A EE mostrou que o aumento da expressão gênica da MMP-2 em músculos desnervados. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão.

DISCUSSÃO

O presente estudo trouxe novas informações sobre o particular envolvimento da MMP-2 na adaptação muscular pós-desnervação. Além disso, nossos resultados suportam a premissa que a EE é efetiva na regulação da expressão gênica da MMP-2.

Estudos prévios mostraram que a EE é um potente estímulo capaz de evitar ou reduzir a degeneração em músculos desnervados.^{9,16} Entretanto, estes modelos experimentais usam modelos de estimulação elétrica por longos períodos e com eletrodos implantadas para tratar músculos desnervados, diferente da prática na reabilitação em seres humanos, na qual eletrodos de superfície são usados diretamente sobre a pele.³⁰ Neste estudo, a EE foi aplicada por eletrodos de superfície e as alterações na excitabilidade musculares foram também consideradas para identificar os melhores parâmetros elétricos para a estimulação. Estes procedimentos tentam mimetizar a prática dentro da reabilitação em seres humanos.

Recentemente, nós encontramos que um protocolo clínico de EE reduz o acúmulo do RNAm de myoD e atrogina-1 em músculos desnervados de rato.²⁶ MyoD e atrogina-1 são relacionados respectivamente a vias hipertróficas¹³ e atróficas⁴. Os presentes resultados mostraram que a EE pode também elevar a expressão gênica da MMP-2 em músculo desnervado de rato, esclarecendo os efeitos de protocolos clínicos de EE e sugerindo que a EE pode agir no remodelamento da MEC em músculos desnervados.

Koskinen et al.¹⁵ estudou os mecanismos de ação da EE em indivíduos com lesão medular. O programa de treinamento para os lesados medulares consistiu de estimulação elétrica funcional das pernas por 30 min, 3 vezes por semana durante 1 ano, seguido por um treinamento de uma vez por semana durante 6 meses. Eles observaram que a EE pode elevar a atividade gelatinolítica da pró-MMP-2 sugerindo um aumento na capacidade de degradação do colágeno tipo IV muscular nestes indivíduos, que indica um processo adaptativo de

remodelamento do colágeno intramuscular em resposta ao treinamento elétrico do músculo esquelético.

A ausência dos efeitos da EE sobre a atividade gelatinolítica da MMP-2 nos grupos D+EE e N+EE pode ser atribuída a diferenças experimentais entre o nosso estudo e o de Koskinen et al.,¹⁵ como a composição dos músculos, modelos de desnervação e protocolos de estimulação. Além do mais, a EE deve regular músculos paréticos e desnervados diferentemente. Entretanto, mais estudos são necessários para testar esta hipótese. Apesar das diversas discrepâncias entre o modelo de Koskinen e o nosso, ambos encontraram que a EE aplicada com eletrodos de superfície regula as vias da MMP-2.

Muitos investigadores já detalharam a presença e a localização das MMPs no músculo desnervado,^{8,14,28} contudo suas funções nestes músculos ainda não são bem compreendidas. Demestre et al.⁸, em um experimento bem conduzido, mostrou um aumento no RNAm da MMP-2 após 20 dias após lesão do nervo ciático por esmagamento. Eles atribuíram o aumento na expressão da MMP ao brotamento axonal. Eles também mostraram evidências para sugerir que logo após a desnervação, formas latentes de MMPs são ativadas e então devem contribuir para as subseqüentes mudanças degenerativas.⁸ Na fase inicial da desnervação não houve aumento de RNAm da MMP-2. Contudo, formas latentes de gelatinase (MMP-2, -8, -9 e -14) em tecido muscular foram ativados pela diminuição de inibidores teciduais de MMPs (TIMPs).

Um fato interessante do nosso estudo foi o aumento da atividade gelatinolítica da MMP-2 nos dois grupos desnervados (D e D+EE), sem nenhuma diferença entre eles. Nós acreditamos que este aumento na atividade gelatinolítica foi relacionada não apenas ao aumento na proliferação de tecido conjuntivo, mas também a ativação de formas latentes de MMP-2 já presentes na MEC corroborando aos achados de Demestre et al.⁸ O presente estudo sugere que o aumento na atividade gelatinolítica da MMP-2 não é exclusivamente envolvida

nos brotamentos axonais mas também estão envolvidos no remodelamento da MEC relacionados com a atrofia muscular e a proliferação de tecido conjuntivo. Se a MMP-2 é considerada uma importante enzima envolvida no processo de brotamento axonal,⁸ a EE poderia também facilitar a reinervação muscular, porque altas taxas de RNAm de MMP-2 foram observadas no grupo D+EE. Contudo, estudos envolvendo diferentes modelos de desnervação que permitam a reinervação muscular, como os modelos de esmagamento nervoso deveriam ser investigados para validar esta hipótese. Além disso, nós consideramos que a EE pode ser um potente estímulo capaz de regular a expressão gênica da MMP-2 em músculos desnervados, mas não em inervados. Entretanto, mais estudos são necessários para identificar a quantidade de estimulação elétrica necessária para modificar a síntese protéica ou atividade de MMP-2.

Um achado interessante deste estudo é que nós não detectamos a atividade da MMP-9 em nenhum dos grupos avaliados. Entretanto, outros estudos^{8,28} identificaram a atividade da MMP-9 em doenças neuromusculares em humanos²⁸ e em desnervação por axoniotmesis.⁸ Parece que diferenças marcantes entre este estudo e os outros são relacionadas a diferentes modelos de desnervação utilizados.

Embora EE tenha um importante efeito aumentando a expressão gênica da MMP-2, a distribuição da AST das fibras musculares mostrou que 20 contrações induzidas por EE foram insuficientes para evitar a atrofia das fibras musculares com a desnervação. O protocolo de EE provavelmente falhou para manter a área da fibra muscular porque o número de contrações é importante para prevenir a atrofia muscular durante a desnervação. Estudos prévios⁹ mostraram que 200 contrações por dia são necessárias para prevenir a atrofia da fibra muscular.

Este projeto recebeu apoio financeiro da Fundação de Amparo À Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). T. L. Russo e S. M. Peviani foram bolsistas de doutorado da FAPESP e J. L. Durigan do CNPq.

REFERÊNCIAS

1. Ahtikoski AM, Tuominen H, Korpelainen JT, Takala TE, Oikarinen A. Collagen synthesis and degradation in polyneuropathy and myopathies. *Muscle Nerve* 2004;30:602– 608.
2. Bar-Shai M, Carmeli E, Coleman R, Rozen N, Perek S, Fuchs D, et al. The effect of hindlimb immobilization on acid phosphatase, metalloproteinases and nuclear factor-kappaB in muscles of young and old rats. *Mech Ageing Dev* 2005;126: 289–297.
3. Billington L, Carlson BM. The recovery of long-term denervated rat muscles after Marcaine treatment and grafting. *J Neurol Sci* 1996;144:147–155.
4. Bodine SC, Latres E, Baumhueter S, Lai VK, Nunez L, Clarke BA, et al. Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science* 2001;294:1704–1708.
5. Carmeli E, Moas M, Reznick AZ, Coleman R. Matrix metalloproteinases and skeletal muscle: a brief review. *Muscle Nerve* 2004;29:191–197.
6. Carvalho RF, Dariolli R, Justulin JLA, Sugizaki MM, Politi Okoshi M, et al. Heart failure alters matrix metalloproteinase gene expression and activity in rat skeletal muscle. *Int J Exp Pathol* 2006;87:437– 443.
7. Cummings J. Electrical stimulation in denervated muscle. In: Gersh M, editor. *Electrotherapy in rehabilitation*, 3rd ed. New York: Churchill Livingstone; 1990. p 269–290.
8. Demestre M, Orth M, Wells GM, Gearing AJ, Hughes RA, Gregson NA. Characterization of matrix metalloproteinases in denervated muscle. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2005;31: 545–555.
9. Dow DE, Cederna PS, Hassett CA, Kostrominova TY, Faulkner JA, Dennis RG. Number of contractions to maintain mass and force of a denervated rat muscle. *Muscle Nerve* 2004;30:77–86.
10. Eberstein A, Eberstein S. Electrical stimulation of denervated muscle: is it worthwhile? *Med Sci Sports Exerc* 1996;28:1463–1469.

11. Harris R. Cronaxia. In: Licht S, Jornet A, Garcia-Alsina J, editors. *Electrodiagnóstico y electromiografía*. Barcelona: Editorial Jims; 1970. p 237–265.
12. Hughes PM, Wells GM, Perry VH, Brown MC, Miller KM. Comparison of matrix metalloproteinase expression during Wallerian degeneration in the central and peripheral nervous systems. *Neuroscience* 2002;113:273–287.
13. Ishido M, Kami K, Masuhara M. In vivo expression patterns of MyoD, p21, and Rb proteins in myonuclei and satellite cells of denervated rat skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004;287:C484–493.
14. Kherif S, Dehaupas M, Lafuma C, Fardeau M, Alameddine HS. Matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 in denervated muscle and injured nerve. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1998;24:309–319.
15. Koskinen SO, Kjaer M, Mohr T, Sørensen FB, Suuronen T, Takala TE. Type IV collagen and its degradation in paralysed human muscle: effect of functional electrical stimulation. *Muscle Nerve* 2000;23:580–589.
16. Kostrominova TY, Dow DE, Dennis RG, Miller RA, Faulkner JA. Comparison of gene expression of 2-mo denervated, 2-mo stimulated-denervated, and control rat skeletal muscles. *Physiol Genomics* 2005;22:227–243.
17. Kouyoumdjian JA. Peripheral nerve injuries: a retrospective survey of 456 cases. *Muscle Nerve* 2006;34:785–788.
18. Lieber RL. *Skeletal muscle structural, function & plasticity*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2004.
19. Marqueti RC, Parizotto NA, Chrigger RS, Perez SEA, Selistrede-Araujo HS. Androgenic – anabolic steroids associated with mechanical loading inhibit matrix metalloproteinase activity and affect the remodeling of the Achilles tendon in rats. *Am J Sports Med* 2006;34:1274–1280.

20. Mathieu O, Cruz-orive LM, Hoppeler H, Weibel ER. Measuring error and sampling variation in stereology: comparison of the efficiency of various methods for planar image analysis. *J Microsc* 1981;121:75– 88.
21. Menon B, Singh M, Singh K. Matrix metalloproteinases mediate beta-adrenergic receptor-stimulated apoptosis in adult rat ventricular myocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* 2005;289:C168–176.
22. Page-McCaw A, Ewald AJ, Werb Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007;8:221–233.
23. Paternostro-Sluga T, Schuhfried O, Vacariu G, Lang T, Fialka-Moser V. Chronaxie and accommodation index in the diagnosis of muscle denervation. *Am J Phys Med Rehabil* 2002;81:253–260.
24. Peviani SM, Gomes AR, Moreira RF, Moriscot AS, Salvini TF. Short bouts of stretching increase myo-D, myostatin and atrogen-1 in rat soleus muscle. *Muscle Nerve* 2007;35: 363–370.
25. Russo T, França C, Castro C, Salvini TF. Alterations of chronaxie, rheobase and accommodation in denervated skeletal muscle submitted to electrical stimulation. *Braz J Phys Ther* 2004;8:169 –175.
26. Russo TL, Peviani SM, Freria CM, Gigo-Benato D, Geuna S, Salvini TF. Electrical stimulation based on chronaxie reduces atrogen-1 and myoD gene expressions in denervated rat muscle. *Muscle Nerve* 2007;35:87–97.
27. Salmons S, Ashley Z, Sutherland H, Russold MF, Li F, Jarvis JC. Functional electrical stimulation of denervated muscles: basic issues. *Artif Organs* 2005;29:199 –202.
28. Schoser BG, Blottner D. Matrix metalloproteinases MMP-2, MMP-7 and MMP-9 in denervated human muscle. *Neuroreport* 1999;10:2795–2797.

29. Schoser BG, Blottner D, Stuerenburg HJ. Matrix metalloproteinases in inflammatory myopathies: enhanced immunoreactivity near atrophic myofibers. *Acta Neurol Scand* 2002;105:309–313.
30. Sheffler LR, Chae J. Neuromuscular electrical stimulation in neurorehabilitation. *Muscle Nerve* 2007;35:562–590.
31. Spielholz N. Electrical stimulation of denervated muscle. In: Nelson R, Hayes K, Currier D, editors. *Clinical electrotherapy*, 3rd ed. Stamford, CT: Appleton & Lange; 1999. p 411–446.8

7. MANUSCRITO EM PREPARAÇÃO.

A ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA, O ALONGAMENTO E SUA COMBINAÇÃO REGULAM A EXPRESSÃO GÊNICA EM MÚSCULO DESNERVADO DE RATO.

Thiago Luiz Russo¹, PhD, Sabrina Messa Peviani¹, PhD, João Luiz Quagliotti Durigan¹, MS, PhD e Tania Fátima Salvini¹, MS, PhD.

¹Departamento de Fisioterapia, Universidade Federal de São Carlos, Rodovia Washington Luís, Km 235, CEP 13565-905, São Carlos, São Paulo, Brasil.

Agradecimentos:

Este projeto recebeu apoio financeiro da Fundação de Amparo À Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP – número do processo: 05/5474-3) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). T. L. Russo e S. M. Peviani foram bolsistas de doutorado da FAPESP (números de processo: 05/54209-1 e 05/55773-8, respectivamente) e J. L. Durigan do CNPq. Também gostaríamos de agradecer a Teresa F. F. Piassi pelo suporte técnico.

Correspondência para: T. Fátima Salvini. Telefone: (0055-16) 33518345 / FAX: (0055-16) 33512081. E-mail: taniasalvini@power.ufscar.br

Título de página: Estimulação elétrica, alongamento e expressão gênica.

RESUMO

A desnervação causa inúmeras mudanças na expressão gênica do músculo esquelético refletindo na perda de massa muscular e incapacidade para realizar atividades de vida diária nos seres humanos. É necessário desenvolver e caracterizar novas estratégias de tratamento na reabilitação de músculos desnervados em seres humanos. A estimulação elétrica (EE) e o alongamento (Al) são comumente utilizados na reabilitação de músculos desnervados, contudo, a compreensão de seus efeitos sobre a expressão gênica do músculo ainda necessita de mais estudos. O propósito deste estudo foi avaliar os efeitos da EE, do Al bem como sua associação (EE+Al) sobre a expressão gênica da myoD, atrogina-1 e miostatina, e também sobre a massa muscular durante as fases iniciais da desnervação em músculo tibial anterior (TA) de rato. Trinta animais foram divididos em cinco grupos: (1) normal (N); (2) TA desnervado (D); (3) TA desnervado e submetido à EE diária (D+EE); (4) TA desnervado submetido ao Al diário (D+Al); (5) TA desnervado submetido concomitantemente a EE e Al diariamente (D+EE+Al). Reação em cadeia de polimerase (PCR) em tempo real, avaliação da área de secção transversa (AST) das fibras musculares, imunohistoquímica para as moléculas de adesão celular neural (NCAM) e avaliação da excitabilidade muscular foram usadas para investigar os efeitos destes recursos físicos sobre a adaptação do músculo desnervados. A EE, o Al e EE+Al reduziram o acúmulo de RNA mensageiro (RNAm) de myoD e atrogina-1, bem como mantiveram os níveis normais de miostatina nos músculos desnervados. Além disso, nenhum dos recursos preveniu a perda de a atrofia das fibras musculares com a desnervação. Entretanto, estes recursos não atrapalharam a expressão de NCAM em músculos desnervados. Em conjunto, estes resultados trazem novas informações sobre os efeitos da EE e do alongamento, realizados como recomendados na reabilitação de músculos desnervados de seres humanos, sobre a adaptação do músculo desnervado.

Palavras-chave: Músculo esquelético, expressão gênica, reabilitação, atrofia, axoniotmesis.

Abreviaturas: Al, alongamento; AST, área de secção transversa; EE, estimulação elétrica; GAPDH, gliceraldeído-3-fosfato deidrogenase; MRFs, fatores regulatórios miogênicos; myoD, fator de diferenciação miogênico; NCAM, molécula de adesão celular neural; PCR, reação em cadeia de polimerase; RNAm, ácido ribonucléico mensageiro; TA, tibial anterior; TB, azul de toluidina/1% bórax.

INTRODUÇÃO

A reabilitação dos músculos desnervados é um desafio para a reabilitação (Sheffler & Chae, 2007; Ashley et al., 2008). A recuperação de músculo desnervado leva muito tempo e geralmente é incompleta, dificultando a realização das atividades de vida diária. Estas limitações funcionais são principalmente provocadas pelas inúmeras modificações degenerativas no músculo esquelética decorrentes da desnervação. Uma das conseqüências mais importantes é a atrofia das fibras musculares (Bodine et al., 2003; Dow et al., 2004; Russo et al., 2007) associada à perda na capacidade de geração de força muscular (Dow et al., 2004).

A manutenção do tecido muscular adulto é fortemente ligada a uma série de processos moleculares bastante organizados entre a síntese e a degradação de proteínas, sendo este processo dependentes da demanda (Glass, 2004; Lagirand-Cantaloube et al., 2008). Na ausência do nervo, os músculos têm sua atividade diminuída ou abolida, trazendo conseqüências como altas taxas de quebra de proteína superiores às de síntese o que causa atrofia (Glass, 2005; Jones et al., 2004; Liu et al., 2007).

Muitos genes são diretamente envolvidos nestes processos como os fatores regulatórios miogênicos (MRFs) em que o fator de diferenciação miogênico (myoD) possui um papel importante. Tem sido demonstrado que myoD é bastante sensível tanto ao aumento quanto a redução do estresse mecânico, bem como a ausência ou presença de atividade elétrica (Legerlotz & Smith, 2008). Sua expressão aumenta depois da desnervação (Buonanno et al., 1992; Ishido et al., 2004; Russo et al., 2007), o que tem sido interpretado como uma tentativa de prevenir a atrofia muscular (Ishido et al., 2004; Russo et al., 2007) uma vez que myoD é capaz de induzir a proliferação e a diferenciação de células satélites (Sabourin & Rudnicki, 2000). Além disso, aumentos na expressão de myoD também deveriam ser considerados como uma tentativa do músculo para recuperar sua sensibilidade para a

atividade neural, uma vez que há também um aumento na expressão de receptores de acetilcolina depois da desnervação (Buonanno et al., 1992) e myoD regula a expressão das subunidades alfa (Bessereau et al., 1994).

A atrofia observada nos músculos desnervados envolve um programa comum de proteólise pela ativação da via ubiquitina-proteossoma (Bodine et al., 2001; Jackman & Kandarian, 2004). Neste programa, uma das enzimas mais importantes responsável pela identificação das proteínas que serão degradadas pelo proteossoma é a atrogina-1 (Gomes et al., 2001) também conhecida como *Muscle Atrophy F-Box* (MAFbx) (Bodine et al., 2001). A atrogina-1 contém um domínio F-box, um motivo característico da família das ubiquitina ligases E3 chamado de SCF (para Skp1, Cull1, F-box) (Glass et al., 2003). Então, atrogina-1 é responsável pela especificidade no recrutamento do substrato (Gomes et al., 2001; Lagirand-Cantaloube et al., 2008).

Em vários modelos de atrofia do músculo esquelético, incluindo a desnervação (Bodine et al., 2001), atrogina-1 é regulada positivamente e parece ser essencial para a acelerada perda de proteína muscular, regulando o tamanho do músculo pela quebra de proteínas (Bodine et al., 2001; Gomes et al., 2001) ou ao inibir vias de hipertrofia (Tintignac et al., 2005; Lagirand-Cantaloube et al., 2008).

Outro importante gene envolvido no controle de massa muscular é a miostatina. Ela é um membro da família dos fatores de crescimento e transformação beta (TGF- β), sendo um regulador negativo do crescimento muscular (Sharma et al., 2001). Seu papel no músculo desnervado parece ser de inibir a hipertrofia muscular e não induzir a atrofia (Wehling et al., 2000; Zhang et al., 2006). Estudos prévios mostraram que existe uma significativa relação linear negativa entre o aumento da miostatina (proteínas e RNAm) e os graus de atrofia no músculo gastrocnêmio de rato durante 56 dias de desnervação pós neurotomia do nervo

ciático (Zhang et al., 2006). Portanto, a miostatina é um bom gene alvo para entender a adaptação muscular em modelos de atrofia.

Na tentativa de recuperar músculos desnervados, dois importantes recursos de tratamento são usados para a reabilitação em seres humanos: a estimulação elétrica (EE) e o alongamento (AI). Estudos anteriores mostraram que a EE é capaz de deter a atrofia muscular (Dow et al., 2004; 2005) bem como controlar as alterações moleculares decorrentes da desnervação (Kostrominova et al., 2005; Russo et al., 2007). Parece que o número total de contrações por dia é o fator mais importante para evitar as modificações degenerativas dos músculos desnervados (Dow et al., 2004; Kostrominova et al., 2005). Resultados prévios mostravam que mesmo poucas contrações (20 contrações a cada 48 h) são capazes de diminuir a acumulação de RNAm de myoD e atrogina-1 em músculo desnervado de ratos, mas não são capazes de impedir a atrofia da fibra muscular (Russo et al., 2007). Por outro lado, Dow et al. (2004) mostrou que 200 contrações diárias são suficientes para prevenir a atrofia e degeneração advinda da desnervação em músculo extensor longo dos dedos de rato, indicando um efeito protetor da EE.

Contudo, a EE permanece como uma ferramenta de grande controvérsia para o tratamento músculos desnervados (Eberstein & Eberstein, 1999). Alguns estudos têm mostrado que a EE pode apresentar um efeito diverso sobre o nervo, estimulando ou prejudicando sua recuperação de acordo com os parâmetros elétricos usados (Lu et al., 2008). Entretanto, para investigar os efeitos da EE sobre fatores que participam das interações entre nervos e músculos seria importante traçar estratégias de tratamento que estimulem os músculos desnervados de uma maneira segura sem atrapalhar o processo normal de reinervação destas fibras. A molécula de adesão celular neural é um importante candidato para a investigação desta interação. Em músculos inervados sua expressão é geralmente baixa e restrita basicamente a junção neuromuscular (Covault & Sanes, 1986) ou marcando células

satélites NCAM⁺ (Ishido et al., 2006), enquanto que em músculos desnervados a expressão de NCAM está aumentada ao redor e dentro de fibras atroficas (Gosztanyi et al., 2001).

O alongamento é bem descrito como um potente estímulo capaz de induzir síntese protéica (Goldspink, 1999; Goldspink et al., 2002; Salvini et al., 2006), manter a amplitude de movimento e flexibilidade no músculo esquelético (Feland et al., 2001). Além disso, o alongamento é um procedimento largamente recomendado e utilizado nas atividades físicas e reabilitação. Entretanto, seus efeitos sobre a resposta dos músculos desnervados não estão totalmente descritos. Apenas alguns poucos trabalhos investigaram os efeitos do alongamento sobre os músculos desnervados. Loughna e Morgan (1999) mostraram que o alongamento poderia regular a expressão gênica da cadeia pesada da miosina pela tensão gerada, independente da inervação. Além disso, Sakakima e Yoshida (2003) observaram que o alongamento aplicado 40 min por dia, 6 vezes por semana, minimiza a atrofia em fibras de contração lenta nas primeiras duas semanas pós desnervação em músculo sóleo de rato.

Entretanto, estes protocolos não refletem o que é normalmente proposto na reabilitação de músculos desnervados em seres humanos, isto é, ao invés de longos períodos de imobilização em uma posição alongada, são recomendados apenas algumas repetições de alongamento mantidos por não mais que alguns poucos minutos (Peviani et al., 2007).

Outra estratégia de tratamento é a combinação entre a EE e o alongamento. Juntos estes dois estímulos são capazes de produzir um potente efeito hipertrófico, induzindo a um dramático aumento de síntese protéica em músculos inervados, decorrente do aumento da carga nestes músculos causada pela contração induzida pelo estímulo elétrico em uma posição alongada (Williams et al, 1986).

Portanto, a proposta deste estudo foi investigar os efeitos da EE, do alongamento e sua associação sobre a regulação da expressão gênica, área de secção transversa das fibras musculares e a expressão de NCAM em músculos desnervados de rato. Este estudo traz novas

informações sobre como os recursos físicos, amplamente recomendados e usados na reabilitação de lesões nervosas periféricas em seres humanos, agem na adaptação do músculo esquelético desnervado, e ajuda a traçar estratégias para recuperar músculos com este tipo de condição.

MATERIAIS E MÉTODOS

Cuidados com os animais e grupos experimentais.

Trinta ratos Wistar machos, 3 meses de idade ($265,8 \pm 17,6$ g) foram usados. Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas em uma sala com controle de temperatura e livre acesso à água e ração peletizada. O Comitê de Ética da Universidade aprovou os procedimentos experimentais e o estudo foi conduzido de acordo com normas nacionais para cuidado e experimentação de animais de laboratório.

Os animais foram randomizados e divididos em cinco grupos: (1) normal (N, $n = 6$), animais sem intervenção mantidos livres na gaiola por 7 dias; (2) músculo tibial anterior (TA) desnervado (D, $n = 6$) submetido a duas avaliações de excitabilidade elétrica (pré-desnervação e no sexto dia de experimento); (3) músculo TA desnervado submetido a avaliação da excitabilidade elétrica e a EE diariamente (D+EE, $n = 6$); (4) músculo TA desnervado submetido ao alongamento diariamente (D+Al, $n = 6$) e a duas avaliações da excitabilidade muscular (pré-desnervação e no sexto dia de experimento); e (5) músculo TA desnervado submetido a avaliações de excitabilidade e a EE associada ao alongamento diariamente (D+EE+Al, $n = 6$). Os músculos contralaterais também foram investigados e considerados como um controle interno de cada grupo.

O músculo TA foi escolhido porque quase todas suas fibras atravessam o meio do ventre do músculo e são distribuídas de tendão a tendão (Lieber, 2004). Além disso, ele é um músculo superficial, tornando fácil a identificação da mínima contração visível e permitindo que a EE seja aplicada diretamente na pele acima do músculo (tratamento seletivo do músculo) usando eletrodos de superfície.

Os ratos foram anestesiados com uma injeção intraperitoneal de xilazina (12 mg/Kg) e quetamina (95 mg/Kg) para os procedimentos cirúrgicos, desnervação, avaliação dos parâmetros elétricos, tratamentos com EE, alongamento e EE+Al, e remoção dos músculos.

Os animais foram sacrificados com overdose de anestésico no 7º dia dos procedimentos experimentais. Este período de desnervação foi escolhido porque a atrofia dos músculos esqueléticos de rato é maior durante as primeiras semanas depois da desnervação (Bodine et al., 2001).

Processo de desnervação.

Uma axoniotmese do nervo ciático foi o processo de desnervação realizado, seguindo descrição prévia (Jungnickel et al., 2006; Seo et al., 2006). Resumidamente, depois do rato ser anestesiado, uma pequena incisão foi feita na pele e fáscia próxima ao trocânter direito entre os músculos glúteo máximo e bíceps femoral para a exposição do nervo ciático. Ele foi esmagado duas vezes durante 10 s com intervalo de 5 s entre cada esmagamento com uma pinça plana de relojoeiro número cinco (D. L. Micof). Após isso, a fáscia e pele foram suturadas de distal para proximal, com fios de sutura. Este procedimento promove a desnervação dos músculos da pata posterior do animal, incluindo o TA. A mesma pessoa realizou o esmagamento para ter certeza que o local de lesão, duração e pressão da manobra fossem semelhantes em todos os grupos desnervados. Este modelo de lesão nervosa é caracterizada pela degeneração axonal e nenhum sinal de reinervação muscular durante os primeiros 10 dias pós-lesão nervosa (Carmignoto et al., 1983; Carter et al., 1998).

Avaliação elétrica e procedimentos para a estimulação elétrica.

A estimulação elétrica foi realizada como previamente descrito (Russo et al., 2004; 2007; 2008). Sucintamente, com a pele depilada, limpa e coberta por uma camada de gel

condutor, dois eletrodos foram posicionados: um eletrodo indiferente (eletrodo auto-adesivo circular, 5 cm de diâmetro) foi posicionado nas costas do animal; e o eletrodo ativo (eletrodo metálico, 3 mm de diâmetro) foi usado para estimular o músculo TA; ele era pequeno o bastante para estimular apenas este músculo. Durante o procedimento de EE, este eletrodo foi mantido em contato com a pele diretamente acima do músculo TA, perpendicular às fibras musculares. Os parâmetros elétricos (reobase, cronaxia e acomodação) foram avaliados antes de cada sessão de tratamento de EE e como apresentado na descrição dos grupos experimentais (Russo et al., 2007). Os valores identificados durante a avaliação elétrica foram usados para determinar os parâmetros para a EE em cada sessão, como previamente descrito (Russo et al., 2004; 2007). Para cronaxia > 1 ms, uma corrente monofásica exponencial foi usada (frequência, 50 Hz; duração de pulso, duas vezes o valor da cronaxia; tempo on, 1 s; e tempo off, 3 s). Os grupos D e D+Al foram submetidos a avaliações de excitabilidade muscular no momento pré-desnervação e no dia anterior a eutanásia (6^o dia). Por outro lado, tanto o grupo D+EE como o D+EE+Al foram submetidos a avaliações diárias da excitabilidade totalizando sete. Eles começaram no momento pré-desnervação e foram até o 6^o dia.

Depois da avaliação da excitabilidade muscular, a intensidade de estímulo (amplitude) necessária para induzir uma contração máxima do músculo TA foi identificada (dorsiflexão do tornozelo direito). Cada sessão de EE produzia 200 contrações máximas do músculo TA, aplicadas diariamente por 6 dias e iniciando 24 h pós-desnervação. Estas contrações máximas foram separadas em quatro séries de 50 contrações com cada série durando 3,2 min e 10 min de descanso entre cada série a fim de minimizar a fadiga muscular (Cummings, 1990). O protocolo de EE pode ser visualizado no diagrama (Fig 1). Duzentas contrações diárias foram utilizadas, pois foi demonstrado a sua efetividade ao manter a massa e a força muscular (Dow

et al., 2004) assim como regular a expressão de genes aumentados durante a desnervação (Kostrominova et al., 2005).

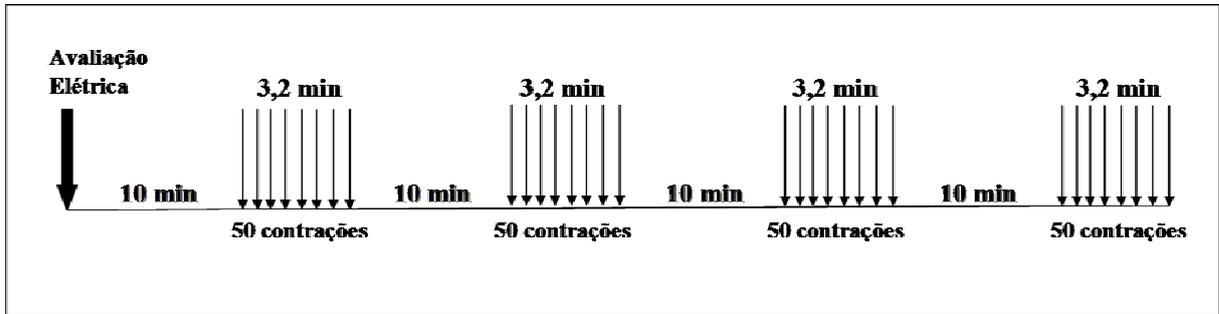


FIGURA 1: Representação esquemática da sessão de estimulação elétrica e a avaliação elétrica. As setas representam as séries de EE de uma única sessão.

Alongamento muscular

Após o rato ser anestesiado, o tornozelo esquerdo foi mantido fixado por meio de um pedaço de fita em flexão plantar máxima para alongar o músculo TA direito (modificado de Gomes et al., 2006). Cada sessão de alongamento foi realizada uma vez por dia e consistiu de quatro séries de 3,2 minutos cada, com 10 minutos de intervalo entre elas, a fim de mimetizar o período de tempo utilizado no protocolo de EE e para permitir posteriores comparações entre EE, alongamento e a sua associação (EE+Al). O pedaço de fita foi removido durante o intervalo de descanso.

Associação entre EE e alongamento (EE+Al)

Para verificar a associação entre a EE e o alongamento, o músculo TA direito foi submetido a ambos os estímulos concomitantemente (EE+Al). Os músculos TA foram mantidos em posição alongada máxima por um pedaço de fita como descrito acima e, em seguida, submetidos à EE como descrito anteriormente (4 séries de 3,2 min com intervalo de 10 min). O pedaço de fita foi removido durante o intervalo de descanso.

Avaliação Muscular

Os animais foram pesados e os músculos TA direitos foram cuidadosamente dissecados e removidos. Os músculos foram então divididos em duas partes iguais no ventre muscular. O fragmento distal foi utilizado para as medidas da AST e congelado em isopentano. A porção proximal foi usado para análise de RNAm sendo rapidamente congelada em nitrogênio líquido e armazenado a -80°C (Forma Scientific, Marietta, OH).

Cortes histológicos (10 μm) da região central de cada músculo TA ($n = 6$ por grupo) foram obtidos usando um criostato (Micron HE 505, Jena, Alemanha), corados com azul de toluidina / 1% de bórax (TB) e avaliados por microscopia de luz (Axiolab, Carl Zeiss, Jena, Alemanha) para avaliar a morfologia muscular e o total do número de fibras musculares. Fotos de 5 diferentes regiões foram obtidas usando um microscópio equipado com uma câmera digital (Sony DSC S75, Tóquio, Japão) foram feitas para avaliar a área de secção transversa (AST) das fibras musculares. A AST de 70 fibras escolhidas aleatoriamente de cada foto foram medidas usando o software Axiovision 3.0.6 SP4 (Carl Zeiss, Jena, Alemanha) totalizando 350 fibras por animal. Além disso, uma foto contemplando toda a área de secção de cada músculo foi tirada e todas as fibras foram contadas usando o software UTHSCSA Image Tool 3.0 (desenvolvido pela Universidade do Texas e disponível no endereço eletrônico: <http://ddsdx.uthscsa.edu/dig/itdesc.html>).

Imunohistoquímica

Foram usados os seguintes anticorpos para a imunohistoquímica: anti-neural cell adhesion molecule (anti-NCAM) de coelho (diluição de 1:100, número do catálogo AB5032; Chemicon International, Temecula, CA) foi utilizado como anticorpo primário e rhodamine red anti-rabbit IgG de cabra (diluição de 1:150, número do catálogo Rb394; Molecular Probes, Eugene, OR) como secundário. Os cortes histológicos foram fixados com 4% de paraformaldeído em 0,2 M de tampão fosfato (PB) durante 10 min em temperatura ambiente,

bloqueados com 0,1 M de glicina em PBS durante 5 min e permeabilizados em 0,2% de Triton X-100-PBS por 10 min. Os cortes foram então incubados com uma solução contendo o anticorpo primário, 3% de normal goat serum e 0,3% Triton X-100 - 0,1 M PB *overnight* em uma câmara fechada à 4°C. Depois de lavar os cortes com 0,1 M PB (3 vezes de 10 min cada), foi adicionado a solução contendo o anticorpo secundário e 0,3% Triton X-100 - 0,1 M PB durante 2 h em sala escura. Após isto, uma solução de hoechst (1 µg/ml, número catálogo B2261, Sigma) foi adicionada ao primeiro de três banhos de 0,1 PB para a marcação dos núcleos. Os cortes foram montados com Vectashield mounting médium para fluorescência com 4,6-diamidino-2phenylindole (número de catálogo H-1200; Vector Laboratories) e cobertos com lamínula. Fotomicrografias foram feitas dos cortes corados usando um microscópio de fluorescência (Axiolab, Carl Zeiss, Jena, Alemanha) equipado com um filtro de rodamina. Fotos em 20 e 40 vezes foram feitas.

Isolamento e análise do RNA.

Um fragmento de cada músculo foi homogeneizado e o RNA total isolado usando o reagente Trizol (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia) de acordo com as instruções do fabricante. A extração de RNA foi dissolvida em tris-HCl e ácido etilenodiaminotetracético pH 7,6 e quantificado por espectrofotometria. A pureza foi avaliada pela determinação da relação entre as absorvâncias a 260 e 280 nm. Todas as amostras tinham relações acima de 2,2. A integridade do RNA foi então confirmada por inspeção com brometo de etídio (Invitrogen, Carlsbad, CA) corando o RNA ribossômico 18S e 28S quando expostos à luz ultravioleta.

Transcrição reversa (RT).

Nós transcrevemos reversamente 1 µg de RNA para sintetizar cDNA. A mistura da reação para RT continha 1 µg de RNA celular, 5x o tampão de RT, uma mistura de dNTP

(Promega, Madison, Wisconsin) contendo 0,2 mmol.L⁻¹ cada de dATP, dCTP, dGTP e 0,1 mol.L⁻¹ de dTTP, 1 µl de oligo (dT) primer (Invitrogen) e 200U da enzima M-MLV RT (Promega). Foi encubada a 70°C por 10 min, 42°C por 60 min e finalmente aquecida a 95°C por 10 min antes de serem colocadas rapidamente em gelo.

Oligonucleotídeos primers.

Os primers foram desenhados para GAPDH (GenBank, AF106860) usando o software Primer Express 2.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA). MyoD, atrogina-1 e miostatina foram previamente descritos (Peviani et al., 2007) assim como o GAPDH (Russo et al., 2008). Todas as seqüências foram sintetizadas pela Imprint (Campinas, São Paulo, Brasil).

Análise por reação em cadeia de polimerase em tempo real.

Os níveis de RNA transcritos para os diferentes músculos dos grupos experimentais e controle foram analisados simultaneamente e as reações foram feitas em duplicata em um Lightcycler (Rotor Gene 3000, Cobertt Research, São Francisco, EUA) usando o SYBR green, um fluorófilo para detecção (Applied Biosystems), e 180 nM de cada primer em um volume final de 50 µl. Condições térmicas de ciclagem para os genes alvo foram descritas (Peviani et al., 2007; Russo et al., 2008). Para cada gene, todas as amostras foram amplificadas simultaneamente em duplicata na mesma corrida. Os resultados foram analisados usando um limiar de ciclo (Ct) comparativamente. O gene alvo foi normalizado pelo GAPDH uma vez que este gene parece não ser afetado pela desnervação (Hughes et al., 2002; Demestre et al., 2005).

Estatística

Os testes Shapiro-Wilk e Levene foram aplicados para avaliar a normalidade e homogeneidade dos dados. O ANOVA one-way foi então usado para identificar possíveis diferenças entre os grupos. Quando estas diferenças foram observadas, o teste de Tukey foi aplicado. Para todos os testes, um nível de significância de 5% foi escolhido ($P \leq 0,05$).

RESULTADOS

Músculos contra-laterais.

Nenhuma diferença em todas as variáveis foi encontrada entre os músculos contra-laterais e o grupo N ($P > 0,05$, resultados não apresentados).

Parâmetros elétricos.

As medidas de pré-desnervação (PD) dos grupos D, D+EE, D+Al e D+EE+Al foram obtidas e consideradas como valores normais de reobase, cronaxia e acomodação (Fig. 2)

A desnervação diminuiu os valores de reobase em D+EE e D+EE+Al começando no 3^o e 5^o dias, respectivamente, comparado ao momento PD ($P < 0,05$; Fig 2A). Depois de 6 dias de desnervação, todos os grupos mostraram um declínio significativo na reobase (D: -50%; D+EE: -43%; D+Al: -39%; D+EE+Al: -46%) comparado a PD ($P < 0,05$), sendo que no final (6^o dia) não houve diferença entre os grupos desnervados ($P > 0,05$; Fig 2A).

Os valores de cronaxia aumentaram exponencialmente no 4^o dia em D+EE e no 5^o dia em D+EE+Al comparado a PD ($P < 0,05$; Fig 2B). Os maiores valores de cronaxia foram alcançados por todos os grupos no 6^o dia comparado aos valores PD (D: 5,6 vezes; D+EE: 7,6 vezes; D+Al: 5,4 vezes; D+EE+Al: 6,9 vezes; $P < 0,05$). Nenhuma diferença foi encontrada entre os grupos no 6^o dia ($P > 0,05$; Fig 2B).

Acomodação diminuiu seus valores no primeiro dia de desnervação nos grupos D+EE e D+EE+Al comparado a PD ($P < 0,05$), e foi mantida nestes níveis até o 6^o dia (Fig 2C). No final, todos os grupos mostraram uma redução significativa comparada à acomodação PD (D: -73%; D+EE: -64%; D+Al: -64%; D+EE+Al: -51%). Semelhante as outras variáveis, nenhuma diferença foi encontrada entre os grupos ($P > 0,05$; Fig 2C).

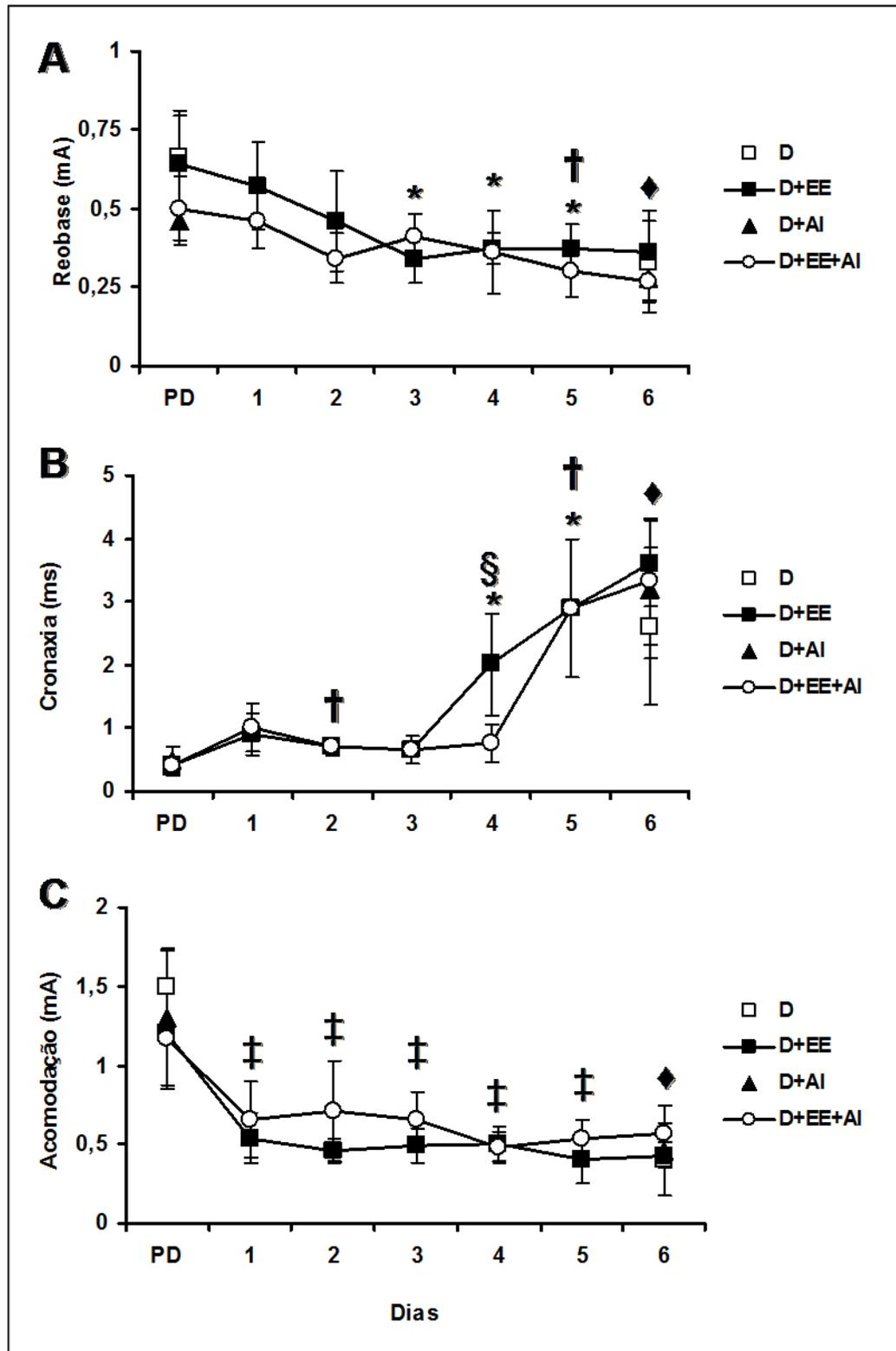


FIGURA 2: Variáveis elétricas obtidas dos músculos tibial anterior (TA) durante a avaliação elétrica ao longo do período experimental. Dados pré-desnervação (PD) foram obtidos de todos os grupos desnervados e foram considerados como valores normais de rebase, cronaxia e acomodação. Os dados estão apresentados como média \pm desvio padrão. D, músculo TA desnervado submetido a avaliação elétrica PD e no 6^o dia; D+EE, músculo TA desnervado submetido a avaliação e a EE todos os dias; D+Al, músculo TA desnervado submetido a avaliação elétrica PD e no 6^o dia, mas também alongado todos os dias; D+EE+Al, músculo

TA desnervado submetido a avaliação elétrica e a EE enquanto era alongado diariamente. (A) Valores de reobase: *P < 0,05 quando D+EE é comparado aos seus próprios valores PD; †P < 0,05 quando D+EE+AI é comparado a seus próprios valores PD; ‡P < 0,05 quando todos os grupos são comparados aos seus próprios valores PD. (B) Valores de Cronaxia: *P < 0,05 quando D+EE é comparado aos seus próprios valores PD; †P < 0,05 quando D+EE+AI é comparado a seus próprios valores PD; §P < 0,05 quando D+EE é comparado a D+EE+AI; ‡P < 0,05 quando todos os grupos são comparados aos seus próprios valores PD. (C) Valores de acomodação: ‡P < 0,05 quando os grupos D+EE e D+EE+AI são comparados aos seus próprios valores PD; ‡P < 0,05 quando todos os grupos são comparados aos seus próprios valores PD. Observe que todos os grupos reduziram os valores de reobase e acomodação no 6º dia comparado a PD. A cronaxia aumentou em todos os grupos desnervados acima de 1 ms confirmando que os músculos TA estavam desnervados.

Peso corporal e dos músculos TA.

Apenas os grupos N e D ganharam peso corporal durante o período experimental (Tabela 1), contudo nenhuma diferença foi observado no peso final entre os grupos ($P > 0,05$). A desnervação diminuiu o peso dos músculos TA (D: $-25.6 \pm 5\%$; D+EE: $-26.6 \pm 4\%$; D+AI: $-27.9 \pm 2\%$; D+EE+AI: $-24 \pm 2\%$) comparado ao grupo N ($P < 0,05$; Tabela 1). Nenhuma diferença foi encontrada nos pesos dos músculos TA dentre os grupos desnervados ($P > 0,05$).

Histologia muscular, AST das fibras musculares, número total de fibras musculares e porcentagem de fibras com núcleos centralizados.

A Figura 3 mostra a evidente atrofia muscular em todos os grupos desnervados (Fig 3B-E) comparado ao grupo N (Fig. 3A). As medidas da AST das fibras musculares confirmaram que todos os músculos desnervados diminuíram suas áreas comparados ao grupo N (D: -32.3% ; D+EE: -40.9% ; D+AI: -36.6% ; D+EE+AI: -37.4% , $P < 0.05$). Não houve diferença na AST das fibras musculares nos grupos desnervados ($P > 0,05$; Tabela 1). O número total de fibras musculares foi avaliado e nenhuma diferença entre todos os grupos experimentais foi encontrada ($P > 0,05$; Tabela 1). A EE aumentou semelhantemente o número de núcleos centralizados em D+EE e D+EE+AI comparado ao grupo N (D+EE: $P=0.0007$; D+EE+AI: $P=0.001$; Tabela 1, Fig 3C, E-F) e também quando comparado aos

grupos D e D+Al ($P < 0,05$). Tanto D quando D+Al não apresentaram alterações no número de núcleos centralizados comparativamente com o grupo N e entre si ($P < 0,05$; Tabela 1).

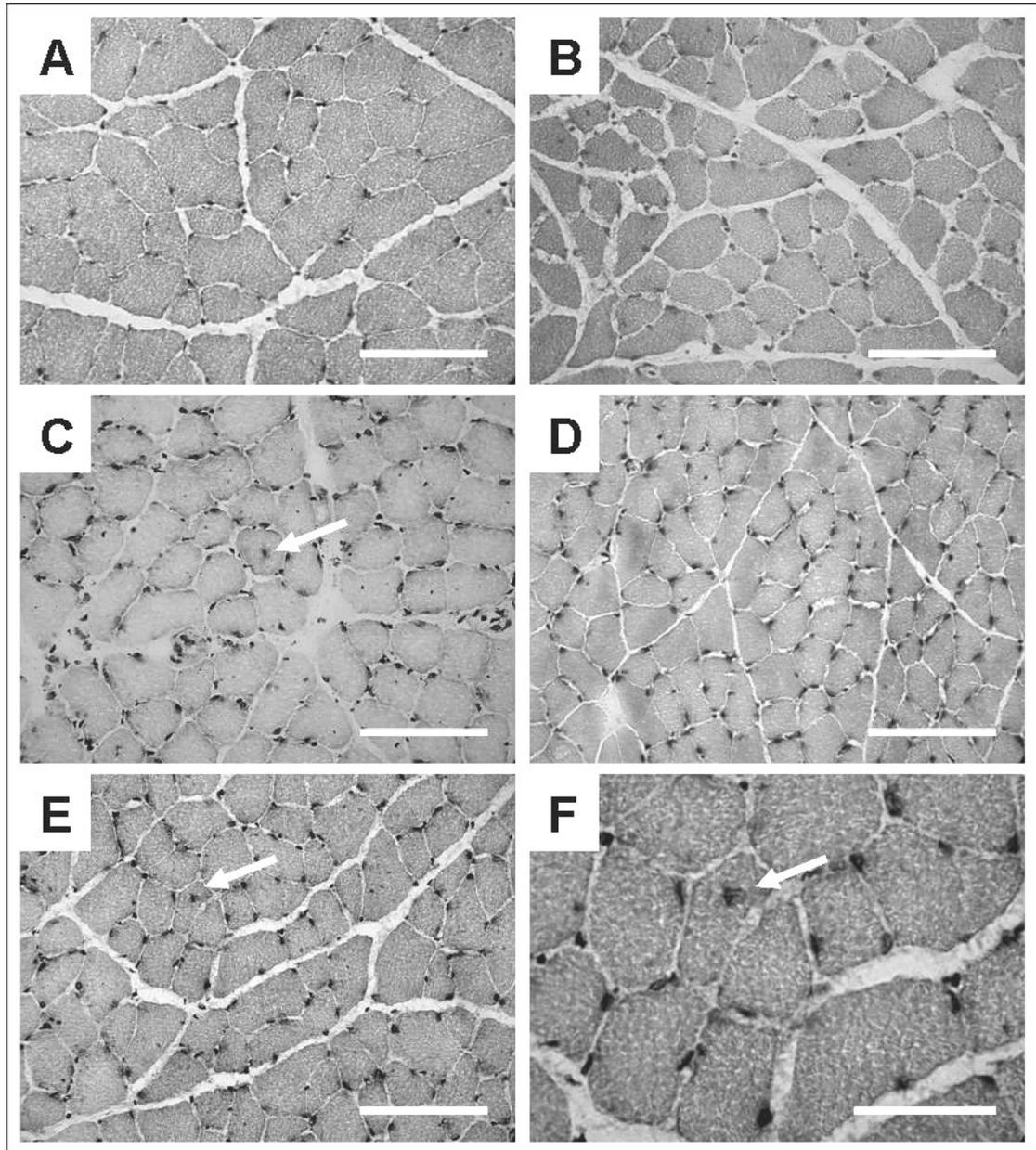


FIGURA 3. Cortes histológicos dos músculos tibial anterior (TA) corados com azul de toluidina (TB). (A) N, músculo TA normal; (B) D, músculo TA desnervado; (C) D+EE, músculo TA desnervado submetido diariamente à EE; (D) D+Al, músculo TA desnervado alongado diariamente; (E) D+EE+Al, músculo TA desnervado eletroestimulado e alongado simultaneamente todos os dias; (F) fibra muscular com núcleo centralizado observado no grupo D+EE+Al ampliado (100x). Setas claras indicam fibras musculares com núcleos centralizados nos grupos submetidos à EE (C e E). Observe que todos os grupos desnervados (B-E) apresentaram nítida atrofia das fibras musculares comparado com os músculos normais (A). Músculos desnervados submetidos à EE apresentaram algumas fibras com núcleo centralizado (C, E-F). Barra, 100 μ m.

Tabela 1: Descrição dos grupos e avaliação dos músculos tibial anterior (TA).

	N	D	D+EE	D+Al	D+EE+Al
Peso					
Corporal	257,9 ± 36,4	254,3 ± 33,9	249,3 ± 35,6	247,7 ± 35,6	285,3 ± 41,4
Inicial (g)					
Peso					
Corporal	286,6 ± 39,3 [§]	274,7 ± 32,4 [§]	247,3 ± 27,7	247,5 ± 20,5	273,1 ± 32,3
Final (g)					
Peso do					
músculo TA	0,53 ± 0,05	0,41 ± 0,08*	0,34 ± 0,04*	0,33 ± 0,04*	0,39 ± 0,05*
(g)					
AST	2857,7 ±	1933,1 ±	1688,4 ±	1812,8 ±	1788,3 ±
(µm²)	650,2	336,9*	198,5*	276,7*	468,6*
Número de					
fibras	8287 ± 1724	7929 ± 1535	7772 ± 1162	8934 ± 517	7446 ± 1217
musculares					
Porcentagem					
de núcleos					
centralizados	0,11 ± 0,02	0,09 ± 0,01	0,26 ± 0,04* [†]	0,12 ± 0,06	0,27 ± 0,07* [†]
(%)					

N, músculo TA normal; D, músculo TA desnervado; D+EE, músculo TA desnervado submetido à EE diária; D+Al, músculo TA desnervado submetido ao alongamento diário; D+EE+Al, músculo TA desnervado submetido ao mesmo tempo a EE e alongamento. Os resultados são apresentados como média ± desvio padrão. [§]P < 0,05 comparado ao peso inicial; *P < 0,05 comparado ao grupo normal; [†]P < 0,05 comparado a D e D+Al. Observe que todos os grupos desnervados tiveram seus pesos musculares e as AST das fibras diminuídos se comparados ao grupo N, sem nenhuma diferença entre eles. Músculos desnervados submetidos à EE, associada ou não ao alongamento, aumentaram a porcentagem do número total de fibras com núcleo centralizado.

Imunohistoquímica para NCAM.

A Figura 4A-B mostra a localização da expressão de NCAM em músculos normais (Fig 4A) e em desnervados (Fig 4B). O padrão da expressão de NCAM em músculos normais foi baixo, restrito às terminações nervosas, vasos e algumas fibras normais (Fig. 4A). Por outro lado, a desnervação aumentou a expressão de NCAM como representado pelo grupo D+EE+AI (Fig. 4B). NCAM pode ser observado em muitas fibras atroficas e sua expressão em todos os grupos desnervados foi semelhante, sem nenhuma diferença marcante entre eles (dados não apresentados). Além disso, a dupla marcação usando NCAM (Fig 4C), um marcador de células satélite, e hoechst (Fig 4D), um marcador nuclear, mostrou apenas algumas poucos núcleos expressando NCAM⁺ quando sobrepostas (Fig 4E), exclusivamente nos grupos D+EE e D+EE+AI.

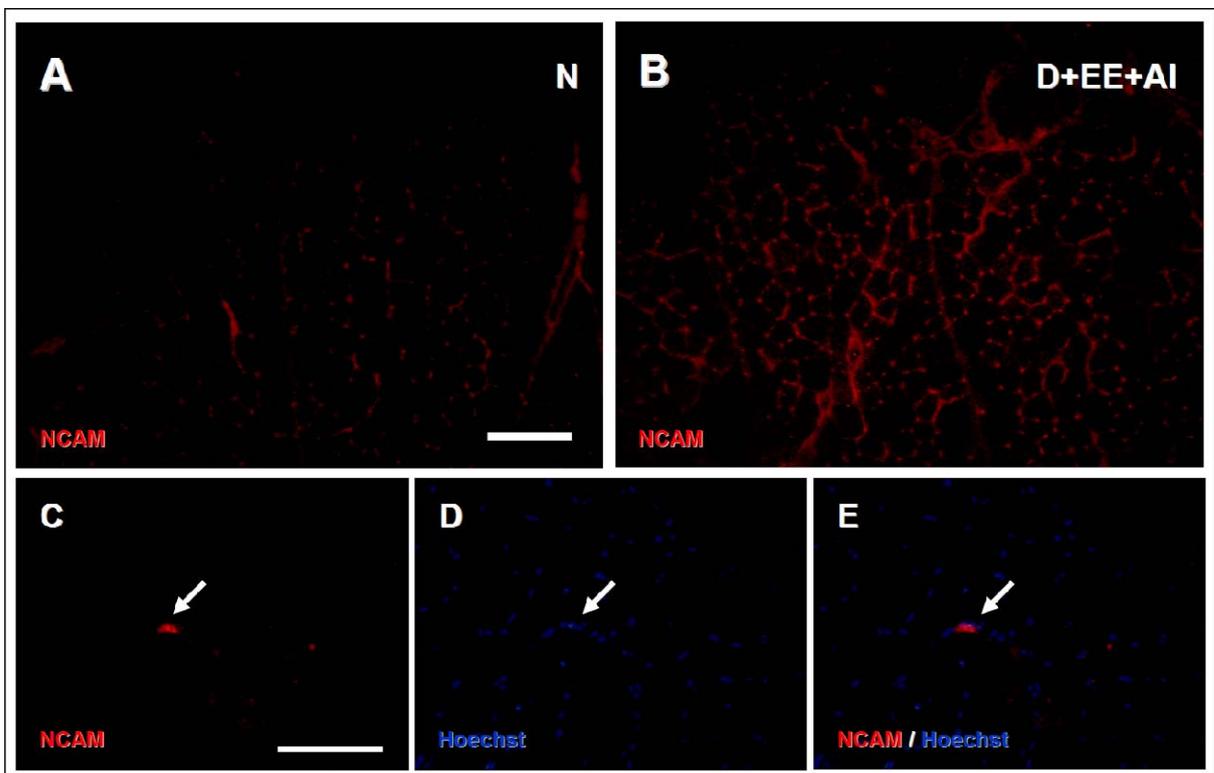


FIGURA 4. Análise em imunofluorescência da molécula de adesão celular neural (NCAM) realizada em músculo tibial anterior (TA). A expressão da NCAM (vermelho) e sua localização em músculos normais (A) e em D+EE+AI (B). Nenhuma diferença marcante na expressão e localização da NCAM foi encontrada entre os grupos desnervados (resultados não

apresentados). Figuras C, D e E mostram, respectivamente, a expressão de NCAM (marcando uma célula satélite), hoechst (azul), confirmando a marcação do núcleos e sua sobreposição. Apenas os grupos D+EE e D+EE+Al apresentaram núcleos NCAM⁺, mesmo que raros.

Expressão gênica da myoD, atrogina-1 e miostatina por PCR em tempo real.

Expressão gênica da myoD: Sua expressão foi aumentada em todos os grupos desnervados (D, D+EE, D+Al e D+EE+Al) no 7^o dia comparado a N (Fig 5A, P<0,05). Este aumento na expressão gênica de myoD foi mais pronunciado no grupo D onde alcançou os maiores níveis comparado a D+EE, D+Al e D+EE+Al (Fig 5A, P < 0,05). Todos os recursos físicos (EE, alongamento e a combinação EE+Al) diminuíram o acúmulo da myoD nos grupos desnervados comparado com D (Fig 5A, P < 0,05). Entretanto, D+EE apresentou os níveis mais baixos de myoD comparado a D+Al e D+EE+Al (Fig 5A, P < 0,05). Nenhuma diferença foi encontrada entre D+Al e D+EE+Al (Fig 5A, P > 0,05).

Expressão gênica da atrogina-1: A expressão da atrogina-1 apresentou o mesmo padrão observado em myoD (Fig 5B). Os níveis de RNAm de atrogina-1 aumentaram em todos os grupos desnervados (D, D+EE, D+Al e D+EE+Al) comparado a N (Fig 5B, P < 0,05). Entretanto, o grupo D apresentou os maiores valores de atrogina-1 comparado aos outros grupos desnervados (P < 0,05). Os grupos D+Al e D+EE+Al reduziram quase pela metade o acúmulo de atrogina-1 comparado ao grupo D (Fig 5B, P < 0,05), sem diferença entre estes grupos alongados (D+Al *versus* D+EE+Al – P > 0,05). O grupo D+EE apresentou os valores mais baixos de atrogina-1 quando comparado a todos os outros grupos desnervados (quase 3 vezes menos que em D; Fig 5B, P < 0,05).

Expressão gênica da miostatina: Apenas o grupo D teve seus níveis de RNAm para miostatina aumentados comparado a N (Fig 5C, P < 0,05) e também aos outros grupos (Fig 5C, P < 0,05). A expressão da miostatina foi mantida inalterada em D+EE, D+Al e D+EE+Al os quais apresentaram níveis similares aos encontrados no grupo N (Fig 5C, P > 0,05).

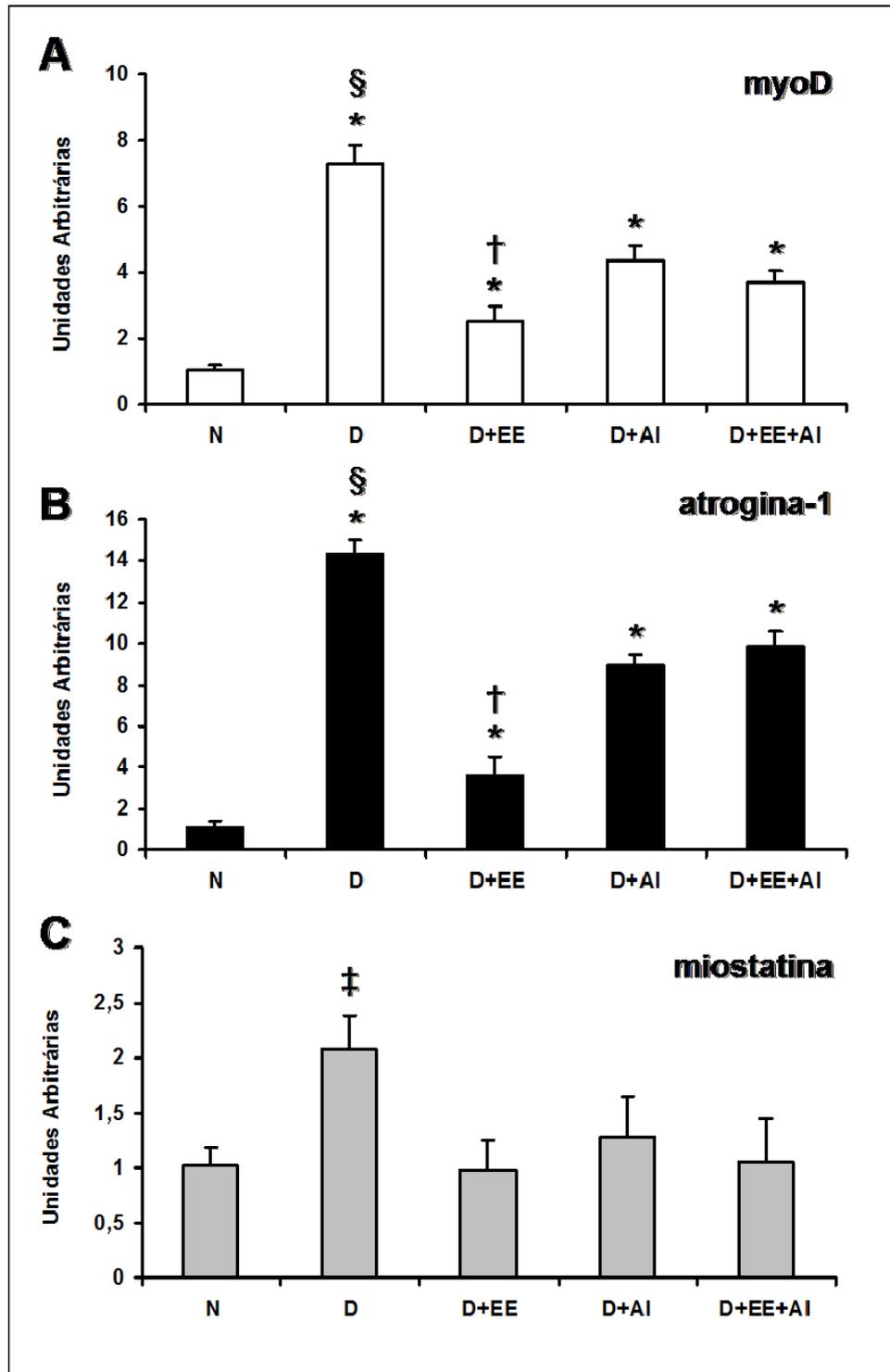


FIGURA 5: Níveis de RNAm de myoD (A), atrogina-1 (B) e miostatina (C) em músculo tibial anterior de rato. Os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão. Os grupos são descritos na legenda da figura 3. * $P < 0,05$ comparado ao grupo N; § $P < 0,05$ comparado a D+EE, D+AI e D+EE+AI; † $P < 0,05$ comparado a D+AI e D+EE+AI; ‡ $P < 0,05$ comparado a todos os grupos. Observe que o grupo D apresentou os maiores valores de myoD, atrogina-1 e miostatina comparado aos outros grupos. Estimulação elétrica, alongamento e sua associação reduziram o acúmulo de myoD e atrogina-1 nos grupos desnervados (A-B) bem como mantiveram os níveis de miostatina normais (C). O grupo D+EE apresentou os valores mais baixos de myoD e atrogina-1 dentre todos os grupos desnervados (A-B).

DISCUSSÃO

O presente estudo trouxe novas informações sobre os efeitos da EE, do alongamento, bem como sua associação sobre a adaptação do músculo desnervado. Foi mostrado que todos os recursos físicos, aplicados como recomendados na reabilitação de músculos desnervados, podem reduzir a acumulação de myoD e atrogina-1 em músculos desnervados e também manter a expressão gênica da miostatina em níveis normais, agindo em importantes vias da regulação muscular. Juntos, estes resultados mostraram que tanto um estímulo de contração como o alongamento podem regular estes genes em músculos desnervados.

O aumento da expressão gênica da myoD devido à desnervação já é conhecido (Eftimie et al., 1991; Hyatt et al., 2003; Ishido et al., 2004; Russo et al., 2007). Este aumento de myoD tem sido interpretado como uma tentativa de prevenir a atrofia muscular, uma vez que a myoD está relacionada com a ativação e proliferação das células satélites (Para revisão ver Legerlotz & Smith, 2008). Aumentos na expressão da atrogina-1 (Bodine et al., 2001) e miostatina (Liu et al., 2007) também são encontrados nos músculos desnervados.

Está bem descrito em vários modelos de desuso que os níveis de RNAm da atrogina-1 aumentam rapidamente antes da perda de massa ser detectada e mantém-se elevados durante o período em que a proteólise é acelerada, sugerindo que a atrogina-1 possui um papel importante para iniciar e manter o processo de proteólise (Bodine et al., 2001; Zhang et al., 2007).

Por fim, a miostatina mostrou uma relação direta entre a atrofia e os níveis de RNAm e proteínas em músculos desnervados de rato depois de 7 dias de lesão nervosa por esmagamento (Liu et al., 2007). Estes autores consideraram que a miostatina tem uma função de inibir a hipertrofia e não de induzir atrofia. Estes mecanismos inibitórios estão provavelmente relacionados à diminuição das taxas de proliferação das células satélites (Dominigué & Gerard, 2006).

O presente estudo permite hipotetizar algumas possíveis explicações e mecanismos envolvendo a regulação de myoD, atrogina-1 e miostatina nos músculos desnervados submetidos aos recursos físicos.

Tem sido proposto que myoD e outros MRFs são fortemente regulados pela atividade elétrica servindo como intermediários entre a atividade elétrica e a expressão de outros genes músculo-específicos, como os receptores alfa de acetilcolina (α -AChR) (Hyatt et al., 2003; Legerlotz & Smith, 2008). O presente estudo mostrou claramente que a expressão de myoD é regulada negativamente em músculos desnervado quando submetido à EE. Além disso, este estudo pela primeira vez mostrou que myoD também é afetado pelo alongamento intermitente em músculos desnervados. Estudos prévios já haviam mostrado que o alongamento passivo pode aumentar a expressão de myoD em músculos inervados (Gomes et al., 2006; Peviani et al., 2007). Associada a estas informações é possível interpretar que tanto a contração causada pela EE como a tensão causada pelo alongamento interferem em vias hipertróficas.

Quanto a regulação da atrogina-1, a via IGF1/PI3K/Akt, que é capaz de induzir hipertrofia pela ativação das vias de síntese protéica pode suprimir a ativação das vias de atrofia pela regulação da atrogina-1 e MuRF1 (Latres et al., 2005). Sendo a EE e o alongamento dois estímulos capazes de induzir síntese protéica via IGF-1 (Williams et al., 1986), é possível que a atividade do músculo poderia regular negativamente a expressão da atrogina-1 por um mecanismo compensatório.

As mudanças no músculo causadas pelo alongamento são transmitidas por uma proteína chamada titina, presente no sarcômero que vai da linha M à Z, especificamente em uma região chamada titin-cap ou teletonina, que pode interferir em mecanismos de resposta celular (Tskhovrebova & Trinick, 2003). Um destes mecanismos envolve a inativação da miostatina ao impedir a sua secreção e também ao inativá-la pela formação de um complexo latente (Dominique & Gerard, 2006). Deste modo, a EE e o alongamento, ao aumentar o

estresse mecânico dentro do sarcômero poderiam regular negativamente a miostatina via titin-cap.

Outro interessante achado é que a associação entre o alongamento e a EE não potencializou seus efeitos sobre a expressão gênica. Parece que o estímulo de tensão provocado pelo alongamento é o mais importante fator na adaptação do músculo, uma vez que D+EE+AI apresentou valores de expressão similares aos encontrados em D+AI. Novas investigações deveriam considerar diferentes parâmetros de EE a fim de aumentar a tensão muscular, como por exemplo, maiores valores de amplitude de pulso, deste modo seria possível verificar se as similaridades entre D+EE+AI e D+AI se manteriam.

Apesar dos efeitos protetores sobre a regulação da expressão gênica, todos os recursos físicos falharam em deter a atrofia nos músculos desnervados, que ocorreu basicamente pela diminuição na AST das fibras musculares e não pela diminuição no número de fibras. O presente estudo aplicou protocolos de EE e alongamento como recomendado na reabilitação das lesões nervosas periféricas em seres humanos. A EE aplicada usando eletrodos de superfície, considerando as mudanças de excitabilidade muscular (modificações da rebase e cronaxia) e realizada em uma única sessão, enquanto o alongamento foi realizado de um modelo intermitente, e não cronicamente como é normalmente relatado na literatura (Goldspink et al., 1991).

O número total de 200 contrações diárias foi usado neste estudo, pois esta quantidade de estimulação mostrou ser capaz de deter a atrofia das fibras musculares (Dow et al., 2004) e as mudanças moleculares (Kostrominova et al., 2005) em músculo extensor longo dos dedos de rato pós 2 meses de desnervação. Contudo, parece que o intervalo de descanso entre cada sessão de estimulação é o fator mais importante para a proteção da massa muscular em músculos desnervados (Dow et al., 2005). Os dados presentes corroboram com esta premissa uma vez que 200 contrações não foram suficientes para deter a atrofia muscular. Bons

resultados foram encontrados apenas quando intervalos de até 8 horas foram empregados em cada sessão de estimulação (Dow et al., 2005), mostrando que longos períodos sem estimulação induzem as mudanças degenerativas nos músculos desnervados e que estes curtos intervalos de descanso entre as contrações é o fator regulador chave na atrofia muscular causada pela desnervação (Dow et al., 2005).

Por outro lado, os aumentos de atrogina-1 e miostatina observados no grupo D não foram refletidos em maior atrofia das fibras musculares. O mesmo raciocínio é válido para os genes que foram regulados negativamente pela EE, alongamento e EE+Al. Estes resultados sugerem que baixos níveis destes genes são suficientes para induzir atrofia. Além disso, é possível interpretar que a regulação de myoD, atrogina-1 e miostatina nos grupos desnervados e submetidos aos recursos físicos seria uma estratégia para poupar a maquinaria gênica durante a desnervação, isto é, o estímulo contrátil poderia por ele mesmo agir na homeostase muscular. Contudo, outros estudos deveriam ser realizados para testar esta hipótese.

Um achado curioso foi a presença de núcleos centralizados em algumas fibras musculares dos grupos submetidos à EE associada ou não ao alongamento, mostrando que processos regenerativos foram ativados pela EE. Além disso, a presença de núcleos NCAM⁺ em D+EE e D+EE+Al poderia significar mobilização de células satélites. Dedkov e cols (2003) mostraram que núcleos NCAM⁺ (possivelmente indicando a ativação de células satélites) estavam dentro das fibras musculares. Eles especulam que esta expressão de NCAM deve preceder a incorporação destes núcleos dentro das células musculares, sugerindo que NCAM possui um papel chave ao promover a entrada das células satélite na fibra muscular. Além disso, a detecção de NCAM em células satélites reflete o status funcional momentâneo da célula, sendo passível de mudanças de acordo com a demanda, seja ela local ou sistêmica.

Além do mais, a localização de NCAM ao redor das fibras musculares atroficas em todos os grupos desnervados mostrou que todos os recursos físicos não atrapalharam a

expressão de fatores de adesão neural, o que é muito importante para o processo de reinervação das fibras musculares.

Um outro aspecto clínico relevante apresentado pelo presente estudo foi que as modificações de excitabilidade ocorreram em um curto período de tempo. Os músculos desnervados tornaram-se hipoexcitáveis a pulsos elétricos de curta duração depois de 6 dias de desnervação, e nenhum dos recursos físicos alterou a excitabilidade muscular. Além disso, o aumento nos valores de cronaxia confirmou que todos os músculos eram desnervados no 6º dia pós desnervação. Esta constatação mostra que os músculos desnervados (cronaxias maiores que 1 ms) não respondem a pulsos de curta duração e que curvas de excitabilidade devem ser realizadas para encontrar os melhores parâmetros para produzir contração neste tipo de músculo (Ashely et al., 2005; Russo et al., 2004; 2007; 2008).

Futuros estudos deveriam investigar se diferentes sessões de estimulação ao longo do dia com eletrodos de superfície confirmariam os resultados encontrados por Dow e cols (2005). Além disso, alternar a EE e o alongamento ao longo do dia poderia ser uma boa estratégia para a distribuição de estímulo contrátil.

Em resumo, o presente estudo mostrou que protocolos clínicos de EE e alongamento são capazes de regular a expressão gênica de myoD, atrogina-1 e miostatina em músculo desnervado de rato, mas estes recursos falharam em deter a atrofia das fibras musculares. A EE parece estimular o processo regenerativo em músculos desnervados, no entanto, ela não potencializa os efeitos do alongamento em D+EE+Al. Este estudo trouxe novas informações sobre como a EE, o alongamento e sua combinação, aplicados como recomendado na reabilitação de músculos desnervados em seres humanos, pode regular a expressão gênica e a massa muscular, contribuindo para desenvolver novas estratégias de terapia.

REFERÊNCIAS

Ashley Z, Sutherland H, Lanmuller H, Unger E, et al. Determination of the chronaxie and rheobase of denervated limb muscles in conscious rabbits. *Artif Organs* 2005;29:212-215.

Ashley Z, Sutherland, Russold M, Lanmüller H, Winfried M, Jarvis JC, Salmons S. Therapeutic stimulation of denervated muscles: the influence of pattern. *Muscle Nerve* 38: 875-886, 2008.

Bessereau JL, Stratford-Perricaudet LD, Piette J, Le Poupon C, Changeux JP. In vivo and in vitro analysis of electrical activity-dependent expression of muscle acetylcholine receptor genes using adenovirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:1304-8.

Bodine SC, Latres E, Baumhueter S, Lai VK, et al. Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science* 2001;294:1704-1708.

Buonanno A, Apone L, Morasso MI, Beers R, et al. The MyoD family of myogenic factors is regulated by electrical activity: isolation and characterization of a mouse Myf-5 cDNA. *Nucleic Acids Res* 1992;20:539-544.

Carmignoto G, Finesso M, Siliprand R, Gorio A. Muscle reinnervation – I restoration of transmitter release mechanisms. *Neuroscience* 1983; 8:393-401.

Carter AJ, Kristmundsdottir F, Gilmour J, Glasby MA. Changes in muscle cytoarchitecture after peripheral nerve injury and repair. A quantitative and qualitative study. *J Hand Surg* 1998;23:365-369.

Covault J, Sanes JR. Distribution of NCAM in synaptic and extrasynaptic portions of developing and adult skeletal muscle. *J Cell Biol* 1986;102:716-30.

Cummings J. Electrical stimulation in denervated muscle. In: Gersh M, editor. *Electrotherapy in Rehabilitation*. 3rd ed. New York: Churchill Livingstone; 1990. p 269-290.

Dedkov EI, Borisov AB, Wernig A, Carlson BM. Aging of skeletal muscle does not affect the response of satellite cells to denervation. *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 2003, 51(7): 853-863.

Demestre M, Orth M, Wells GM, Gearing AJ, Hughes RA, Gregson NA. Characterization of matrix metalloproteinases in denervated muscle. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2005;31: 545–555.

Dominique JE, Gérard C. Myostatin regulation of muscle development: Molecular basis, natural mutations, physiopathological aspects. *Experimental cell research* 312 (2006) 2401-2414.

Dow DE, Cederna PS, Hassett CA, Kostrominova TY, et al. Number of contractions to maintain mass and force of a denervated rat muscle. *Muscle Nerve* 2004;30:77-86.

Dow DE, Faulkner JA, Dennis RG. Distribution of rest periods between electrically generated contractions in denervated muscles of rats. *Artificial Organs* 2005 29(6):432-435.

Eberstein A, Eberstein S. Electrical stimulation of denervated muscle: is it worthwhile? *Med Sci Sports Exerc* 1996;28:1463-1469.

Eftimie R, Brenner HR, Buonanno A. Myogenin and MyoD join a family of skeletal muscle genes regulated by electrical activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88:1349-1353.

Feland JB, Myrer JW, Schulthies SS, Fellingham GW, Measom GW. The effect of duration of stretching of the hamstring muscle group for increasing range of motion in people aged 65 years or older. *Phys Ther* 2001;81:1110-7.

Glass DJ. Molecular mechanisms modulating muscle mass. *Trends Mol Med* 2003;9(8):344-350.

Glass DJ. Skeletal muscle hypertrophy and atrophy signaling pathways. *Int J Biochem Cell Biol* 2005;37:1974-1984.

Goldspink G. Changes in muscle mass and phenotype and the expression of autocrine and systemic growth factors by muscle in response to stretch and overload. *J Anat.* 1999;194:323-34.

Goldspink G, Williams P., Simpson H. Gene expression in response to muscle stretch. *Clin Orthop Relat Res* 2002;1:S146-S152.

Goldspink DF, Easton J, Winterburn SK, Williams PE, Goldspink GE. The role of passive stretch and repetitive electrical stimulation in preventing skeletal muscle atrophy while reprogramming gene expression to improve fatigue resistance. *J Card Surg* 1991;6:218-224.

Gomes MD, Lecker SH, Jagoe RT, Navon A, et al. Atrogin-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:14440-14445.

Gomes AR, Soares AG, Peviani S, Nascimento RB, et al. The effect of 30 minutes of passive stretch of the rat soleus muscle on the myogenic differentiation, myostatin, and atrogin-1 gene expressions. *Arch Phys Med Rehabil* 2006;87:241-246.

Gosztanyi G, Naschold U, Grozdanovic Z, Stoltenburg-Didinger G, Gossrau R. Expression of Leu-19 (CD56, NCAM) and nitric oxide synthase (NOS) I in denervated and reinnervated human skeletal muscle. *Microsc Res Tech* 2001;55:187-97.

Hughes PM, Wells GM, Perry VH, Brown MC, Miller KM. Comparison of matrix metalloproteinase expression during Wallerian degeneration in the central and peripheral nervous systems. *Neuroscience* 2002;113:273-287.

Huang CF, Neville CM, Schmidt J. Control of myogenic factor genes by the membrane depolarization/protein kinase C cascade in chick skeletal muscle. *FEBS Lett* 1993;319:21-25.

Hyatt JP, Roy RR, Baldwin KM, Edgerton VR. Nerve activity-independent regulation of skeletal muscle atrophy: role of MyoD and myogenin in satellite cells and myonuclei. *Am J Physiol Cell Physiol* 2003;285:C1161-1173.

Ishido M, Kami K, Masuhara M. In vivo expression patterns of MyoD, p21, and Rb proteins in myonuclei and satellite cells of denervated rat skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004;287:C484-493.

Ishido M, Uda M, Masuhara M, Kami K. Alterations of M-cadherin, neural cell adhesion molecule and beta-catenin expression in satellite cells during overload-induced skeletal muscle hypertrophy. *Acta Physiol (Oxf)* 2006;187:407-18.

Jackman RW, Kandarian SC. The molecular basis of skeletal muscle atrophy. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2004;287:C834-C843.

Jungnickel J, Haase K, Konitzer J, Timmer M, Grothe C. Faster nerve regeneration after sciatic nerve injury in mice over-expressing basic fibroblast growth factor. *J Neurobiol* 2006;66:940-948.

Jones SW, Hill RJ, Krasney PA, O'Conner B, Peirce N, Greenhaff PL. Disuse atrophy and exercise rehabilitation in humans profoundly affects the expression of genes associated with the regulation of skeletal muscle mass. *FASEB J* 2004; 18:1025-1-7.

Kostrominova TY, Dow DE, Dennis RG, Miller RA, et al. Comparison of gene expression of 2-mo denervated, 2-mo stimulated-denervated, and control rat skeletal muscles. *Physiol Genomics* 2005;22:227-243.

Latres E, Amini AR, Amini AA, Griffiths J, Martin FJ, Wei Y, Lin HC, Yancopoulos GD, Glass DJ. Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) inversely regulates atrophy-induced genes via the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/mammalian target of rapamycin (PI3K/Akt/mTOR) pathway. *J Biol Chem* 2005;280:2737-44.

Lagirand-Cantaloube J, Offner N, Csibi A, Leibovitch MP, Batonnet-Pichon S, Tintignac LA, Segura CT, Leibovitch SA. The initiation factor eIF3-f is a major target for atrogen1/MAFbx function in skeletal muscle atrophy. *EMBO J* 2008;27:1266-1276.

- Legerlotz K, Smith HK. Role of MyoD in denervated, disused, and exercised muscle. *Muscle Nerve*. 2008;38:1087-1100.
- Lieber RL. *Skeletal muscle structural, function & plasticity*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2004.
- Liu M, Zhang D, Shao C, Liu J, Ding Fei, Gu X. Expression pattern of myostatin in gastrocnemius muscle of rats after sciatic nerve crush injury. *Muscle Nerve* 35: 649-656, 2007.
- Lu MC, Ho CY, Hsu SF, Lee HC, Lin JH, Yao CH, Chen YS. Effects of electrical stimulation at different frequencies on regeneration of transected peripheral nerve. *Neurorehabil Neural Repair* 2008;22:367-73.
- Peviani SM, Gomes AR, Moreira RF, Moriscot AS, Salvini TF. Short bouts of stretching increase myo-D, myostatin and atrogen-1 in rat soleus muscle. *Muscle Nerve* 2007;35:363-370.
- Russo TL, França C, Castro C, Salvini TF. Alterations of chronaxie, rheobase and accommodation in denervated skeletal muscle submitted to electrical stimulation. *Brazilian Journal of Physical Therapy* 2004;8:169-175.
- Russo TL, Peviani SM, Freria CM, Gigo-Benato D, Geuna S, Salvini TF. Electrical stimulation based on chronaxie reduces atrogen-1 and myoD gene expressions in denervated rat muscle. *Muscle Nerve* 2007;35:87-97.
- Russo TL, Peviani SM, Durigan JLQ, Salvini TF. Electrical stimulation increases matrix metalloproteinase-2 gene expression but does not change its activity in denervated rat muscle. *Muscle Nerve* 2008;37:593-600
- Sabourin LA, Rudnicki MA. The molecular regulation of myogenesis. *Clin Genet* 2000; 57:16-25.

- Seo TB, Han IS, Yoon JH, Hong KE, Yoon SJ, Namgung UK. Involvement of Cdc2 in axonal regeneration enhanced by exercise training in rats. *Med Sci Sports Exerc* 2006;38: 1267-1276.
- Salvini TF, Coutinho EL, Russo TL, DeLuca C. One-minute bouts of passive stretching after immobilization increase sarcomerogenesis in rat soleus muscle. *Braz J Morphol Sci* 2006;23:271-277.
- Sharma M, Langley B, Bass J, Kambadur R. Myostatin in muscle growth and repair. *Exerc Sport Sci Rev* 2001;29:155-8.
- Tintignac LA, Lagirand J, Batonnet S, Sirri V, et al. Degradation of MyoD mediated by the SCF (MAFbx) ubiquitin ligase. *J Biol Chem* 2005;280:2847-2856.
- Tskhovrebova L, Trinick J. Titin: properties and family relationships. *Nature reviews*. Vol 4, September 2003.679-689.
- Wehling M, Cai B, Tidball JG. Modulation of myostatin expression during modified muscle use. *FASEB J* 2000;14:103-10.
- Williams P, Watt P, Bicik V, Goldspink G. Effect of stretch combined with electrical stimulation on the type of sarcomeres produced at the ends of muscle fibers. *Exp Neurol* 1986;93:500-9.
- Zhang D, Liu M, Ding F, Gu X. Expression of myostatin RNA transcript and protein in gastrocnemius muscle of rats after sciatic nerve resection. *J Muscle Res Cell Motil* 2006;27:37-44.
- Zhang P, Chen X, Fan M. Signaling mechanisms involved in disuse muscle atrophy. *Medical hypotheses* 2007 69, 310-321.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A estimulação elétrica, aplicada em sessões diárias ou em dias alternados, usando eletrodos de superfície e considerando as modificações de excitabilidade muscular, é capaz de regular importantes genes de vias de hipertrofia, atrofia, regulação de massa e remodelamento de matriz extracelular no músculo desnervado de rato. Contudo, seu efeito não é suficiente para impedir a perda de massa muscular causada pela desnervação.

Além disso, este estudo mostrou que o estímulo mecânico, seja ele uma contração muscular eletricamente induzida ou o alongamento intermitente, é capaz de regular a expressão gênica do músculo desnervado, entretanto, a quantidade de estímulo e como é sua distribuição ao longo do dia parece ser chave na preservação da massa muscular. Estudos futuros devem focar diferentes intervalos de estimulação a fim de detectar o ponto em que os estímulos hipertróficos se sobrepõem aos atróficos.

PARTE II

9. APRESENTAÇÃO

A parte II desta tese refere-se aos resultados parciais do trabalho realizado em parceria com o Prof. Antonio Musarò (Departamento de Histologia e Embriologia Médica – Università degli studio di Roma – “La Sapienza”, Roma, Itália). Para efeito didático, ela foi organizada da seguinte maneira: capa, resumo, introdução, breve apresentação da metodologia e resultados.

Em virtude do tempo em que estive no exterior e a problemas de padronização dos protocolos, apenas resultados qualitativos são apresentados.



Departamento de Histologia e Embriologia Médica
Università degli studio di Roma – “La Sapienza”

**EFEITOS DO AUMENTO DO ESTRESSE OXIDATIVO SOBRE A
REGENERAÇÃO MUSCULAR: IMPLICAÇÕES PARA A
PATOGENESE DA ESCLEROSE LATERAL AMIOTRÓFICA**

THIAGO LUIZ DE RUSSO

Orientador Estrangeiro: Dr. Antonio Musarò¹

Coorientadora Brasileira: Dra. Tania de Fátima Salvini²

ROMA
2007

¹Professor Associado ao Departamento de Histologia e Embriologia Médica da Universidade de Roma “La Sapienza”, Roma, Itália.

²Professora Titular do Departamento de Fisioterapia da Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, Brasil.

RESUMO

A esclerose lateral amiotrófica (ELA) é uma doença neurodegenerativa que afeta a função e a sobrevivência de motoneurônios superiores e inferiores no sistema nervoso central. Parcela significativa dos indivíduos com ELA apresenta uma mutação no gene que codifica a enzima superóxido dismutase-1 (SOD1), acarretando em aumento de espécies reativas ao oxigênio (ROS). A mutação da SOD1 restrita ao músculo acarreta inúmeras alterações como a atrofia e perda de força muscular, aumento de citocinas pró-inflamatórias e ativação de células microgлияis na medula espinhal. Tais modificações indicam que o músculo esquelético apresenta um importante papel na patogênese da ELA. Assim, o entendimento e a caracterização dos mecanismos relacionados ao processo de regeneração dos músculos que apresentam a mutação da SOD1 são relevantes, pois se trata de um processo coordenado em que múltiplos fatores são seqüencialmente ativados (recapitulando o processo de miogênese) para manter e preservar a estrutura e função muscular. A hipótese aqui gerada foi a de que o aumento do estresse oxidativo nestes músculos poderia interferir na coordenação deste processo. Para tal, camundongos com mutação da SOD1 restrita a um promotor muscular (MLC/SOD1) foram submetidos a uma lesão muscular com cardiotoxina. Os músculos foram avaliados 2, 5 e 10 dias após a lesão. Os músculos quadríceps femoral e tibial anterior foram avaliados. Análises histológicas mostraram uma falha no final do processo regenerativo muscular 10 dias pós-lesão. Marcadores moleculares do processo miogênico como Pax7, myoD, miogenina e desmina mostraram um atraso na expressão destes fatores comparado ao controle selvagem. Os resultados parciais deste estudo sugerem que o aumento do estresse oxidativo no músculo retarda a expressão de importantes fatores necessários para o processo de reparo do tecido muscular, trazendo informações dos processos regulatórios nestes tipos de músculo, comum nas doenças neuromusculares como a ELA e durante o processo de envelhecimento.

INTRODUÇÃO

A esclerose lateral amiotrófica (ELA) é uma doença neurodegenerativa que afeta a função e a sobrevivência de motoneurônios superiores e inferiores no sistema nervoso central (Abe et al., 1996; Lino et al., 2002; Musarò et al., 2007). A evolução clínica da doença é evidenciada por progressiva fraqueza e atrofia muscular (Abe et al., 1996; Musarò et al., 2006) que culmina na morte do indivíduo por falência dos músculos respiratórios (Bruijn et al., 2004) após 2 a 5 anos dos primeiros sintomas (Abe et al., 1996). Sua incidência é expressiva (1 em cada 2000 indivíduos) e os mecanismos que causam a ELA ainda não são entendidos (Bruijn et al., 2004) indicando que estudos para investigar os fatores envolvidos na gênese desta doença são relevantes para guiar estratégias terapêuticas farmacológicas para prevenir e/ou reabilitar estes indivíduos.

Aproximadamente 10% dos casos de ELA apresentam um forte componente genético, são as formas familiares (Bruijn et al., 2006). Vinte por cento dos casos familiares são causados por uma mutação dominante no gene que codifica a forma citosólica da Cu/Zn superóxido dismutase (SOD1) (Brown Jr, 1995). Normalmente, a SOD1 é uma enzima importante para a homeostase dos radicais livres nos tecidos, pois sua função é converter anions superóxido (um produto tóxico da fosforilação oxidativa mitocondrial) em peróxido de hidrogênio, o qual será transformado em água (Brown Jr, 1995). Um fato interessante sobre essa alteração é que a mutação em si é responsável pelo ganho de características tóxicas e não são relacionadas a um aumento ou diminuição da sua expressão (para revisão ver Bruijn et al., 2004).

Como a ELA afeta primariamente os motoneurônios é razoável assumir que o acúmulo da proteína mutante nos motoneurônios causasse a doença. Entretanto, Lino e cols (2002) mostraram que o acúmulo da SOD1 mutante em motoneurônios não é um fator crítico para o desenvolvimento da ELA e que outras células (como os astrócitos) devem ser responsáveis

pela degeneração neuronal. Clement e cols (2003) confirmaram essa hipótese ao usar animais quimeras, isto é, que apresentavam células normais e células mutantes em todos os tecidos, e mostraram que a ação neurodegenerativa da forma mutante SOD1 age por uma atividade dominante e parácrina das células não neuronais.

Tais informações indicam que a patogênese da ELA é bastante complexa e envolve diferentes tipos de células e que o acúmulo de toxicidade causada por apenas um tipo celular não seria suficiente para desenvolver a doença. Além disso, demais tecidos relacionados a ELA merecem ser averiguados. Um tecido que ainda foi pouco investigado e que possivelmente contribui para a gênese da ELA é o músculo esquelético, pois se sabe que a interação músculo e nervo é importante no trofismo neuromuscular. As fibras musculares adultas sinalizam a sobrevivência neuronal, o crescimento axonal e a manutenção das conexões sinápticas (Lieber et al., 2002).

Recentemente, foi mostrado que com a injeção intramuscular de um adeno-vírus associado ao gene do fator de crescimento ligado à insulina-1 (IGF-1) é possível prolongar a vida e atrasar a progressão da ELA em animais mutantes SOD1 (Kaspar et al, 2003), indicando que o transporte axoplasmático retrógrado pode ser uma via de ação terapêutica e que o músculo é importante nessa interação. Além disso, animais que coexpressavam a forma mutante da SOD1^{G93A} (uma variação da SOD1) e também o IGF-1 muscular (mIGF-1) apresentaram um efeito protetor tanto para os músculos quanto para os motoneurônios (Dobrowolny et al., 2005). Estes achados mostraram que a estrutura e função da fibra muscular são importantes para retardar e amenizar a severidade da ELA e que a expressão do mIGF-1 é importante na preservação dos motoneurônios durante a ELA, sendo este fator um forte candidato no tratamento desta enfermidade.

A partir da informação que o músculo pode exercer um papel importante sobre os sintomas da ELA (Dobrowolny et al, 2005), o próximo passo seria entender qual o papel do

músculo na patogênese da ELA. Para tal um modelo animal que expressava a forma mutante do gene da SOD1 foi gerado sob controle transcricional de um promotor muscular específico, a cadeia leve da miosina (MLC). Nestes músculos ocorre um acúmulo de espécies reativas ao oxigênio (ROS) levando a progressiva atrofia da fibra muscular e redução de força muscular, mudança na composição das membranas e disfunção mitocondrial. Outras alterações observadas foram o aumento de marcadores moleculares ligados à atrofia muscular como FoxO e NFkB e também com citocinas pró-inflamatórias e ativação de células microgлияis na medula espinhal.

Diante deste panorama complexo que envolve a gênese da ELA, o objetivo deste estudo foi entender e caracterizar os mecanismos relacionados no processo de regeneração dos músculos que apresentam a mutação da SOD1. O estudo da regeneração muscular é relevante, pois se trata de um processo coordenado em que múltiplos fatores são sequencialmente ativados (recapitulando o processo de miogênese) para manter e preservar a estrutura e função muscular (Pelosi et al., 2007). A regeneração e reparo muscular podem ser gerados por um modelo de cardiotoxina e ocorrendo em quatro fases independentes: degeneração, inflamação, regeneração e fibrose. A lesão resulta em uma rápida necrose das miofibras e ativação da inflamação, contribuindo para a remoção de material necrótico e também a secreção de várias citocinas e fatores de crescimento estimulando a ativação das células satélites (Pelosi et al., 2007). A hipótese aqui gerada foi que o aumento do estresse oxidativo nestes músculos poderia interferir na coordenação deste processo. Avançar sobre o conhecimento deste processo adaptativo muscular permite traçar estratégias terapêuticas para tornar a regeneração muscular mais eficiente ou mesmo acelerá-la em situações em que o estresse oxidativo está aumentado no músculo. Assim sendo, a proposta deste estudo foi investigar os mecanismos moleculares e estruturais relacionados ao processo de regeneração em animais transgênicos MLC/SOD1.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais e grupos

Camundongos wild-type (normais) e transgênicos com a mutação no gene SOD1 presente no gene da miosina de cadeia leve (MLC; dados não publicados), machos de 3 meses de idade, foram usados neste estudo. Os animais foram mantidos em biotério próprio do Departamento de Histologia e Embriologia Médica da Universidade de Roma, com controle do ciclo claro-escuro (12:12h) e livre acesso a ração e água. O estudo foi submetido e aprovado pelo comitê de ética em pesquisa animal da universidade de Roma. O protocolo é intitulado: O papel do IGF-1 nas doenças musculares, sob responsabilidade do Prof. Antônio Musarò.

Trinta animais, sendo 12 selvagens (WT) e 18 MCL/SOD foram submetidos a injeções de cardiotoxina em ambos músculos TA e quadríceps direitos. Estes músculos foram avaliados em 2, 5 e 10 dias após a lesão. Os músculos TA e quadríceps contra-laterais (esquerdos) foram usados como controle (K). Abaixo encontram-se a descrição dos grupos

1) *Cardiotoxina 2 dias* (Ctx 2d): animais submetidos a injeção de cardiotoxina e analisados 2 dias pós lesão;

2) *Cardiotoxina 5 dias* (Ctx 5d): animais submetidos a injeção de cardiotoxina e analisados 5 dias pós lesão;

3) *Cardiotoxina 10 dias* (Ctx 10d): animais submetidos a injeção de cardiotoxina e analisados 10 dias pós lesão;

Todos os procedimentos foram realizados com os animais anestesiados. Para tal, uma solução de quetamina e xilazina foi utilizada.

Lesão por Cardiotoxina

Os músculos TA e quadríceps foram lesados em todo o seu comprimento por 4 diferentes injeções de cardiotoxina (Latoxan^(France) 5 µl a 10 µM por injeção). Este tipo de cardiotoxina provoca uma lesão homogênea e uniforme como previamente descrito (Pelosi et al., 2007).

Avaliação muscular

Os músculos quadríceps e TA coletados foram congelados em isopentano pré-resfriado em nitrogênio líquido. Os músculos foram armazenados em freezer a -80°C. Os músculos TA foram usados para análises de imunohistoquímica, imunofluorescência e morfometria. Já os músculos quadríceps foram utilizados para análises de proteína (Western-blot).

Análise histológica muscular

A análise histológica teve como objetivo a caracterização da área de lesão e a proliferação do tecido conjuntivo. Para tal, cortes musculares congelados com 8 µm de espessura foram obtidos em micrótomo criostato e submetidos às seguintes colorações, como previamente descrito por Pelosi e cols (2007): 1) *Hematoxilina e eosina*: para avaliação da morfologia geral, caracterização da área de infiltrado inflamatório; 2) *Tricômio de Masson*: a fim de caracterizar as modificações no tecido conjuntivo muscular.

Com o intuito de caracterizar e quantificar o número de células musculares necróticas a coloração de azul de Evans foi utilizada. Sucintamente, uma solução de azul de Evans foi injetada na veia da cauda do animal 6 horas antes do sacrifício e retirada dos músculos. Os músculos foram congelados e armazenados como descrito acima. Cortes histológicos musculares congelados foram fixados em acetona resfriada (-20°C) durante 15 min e depois

lavados em PBS contendo Hoechst (1:3000) para a marcação dos núcleos das células. Os cortes foram montados em meio aquoso contendo 4',6'-diadimidino-2-fenilidole nuclear (Vectashield; Vector laboratories). Fibras necróticas foram observadas por fluorescência em microscópio invertido (modelo Axioskop 2 plus; Carl Zeiss Microimaging, Inc).

Western Blot

Cem miligramas de músculo quadríceps foram homogeneizados em um tampão de lise (Ripa buffer: 10 mM Tris-HCl, pH 7,4; 150 mM NaCl; 1% Nonideto P-40; 1% deoxicolato de sódio; 0,1% SDS; 10% glicerol) com inibidores de proteases (10 mM sodiopirofosfato; 10 mM NaF; 1 mM SnV_4 ; 2 mM PMSF; 10 $\mu\text{g/ml}$ de inibidores de leupeptina, tripsina, aprotinina e antipaina). As amostras foram agitadas durante 30 min a 4°C e depois centrifugadas por 30 min também a 4°C. As proteínas totais foram quantificadas por espectrofotômetro pelo método de Bradford a 550 nm e comparadas a uma curva de concentração de BCA. Quantidades iguais de proteína foram separadas em um gel SDS-PAGE a 12%. Um padrão pré-corado foi usado para averiguar a massa molecular das proteínas (Kalidoscope Prestained Standards, Bio-Rad). Posteriormente, as proteínas foram transferidas para uma membrana por eletroforese (25 mA por 12 h). Estas membranas foram avaliadas com Red Ponceau para confirmação da qualidade da corrida e a presença das proteínas. Para incubação dos anticorpos, as membranas passaram pelos seguintes passos: 3 banhos de 10 min cada de TBST; 1 banho de 1 h em 5% de leite em pó dissolvido em TBST. As membranas foram incubadas *overnight* a 4°C com o anticorpo primário dissolvido em 1 ml de TBST. Os anticorpos primários usados foram os seguintes: miogenina (1:100); myoD (1:100); pax7 (1:20); desmina (1:80). A α -tubulina (1:500) foi usada como controle endógeno. Após incubação, as membranas foram lavadas 3 vezes de 10 min cada em TBST e passaram por incubação com o anticorpo secundário (anti-rat IgG, horseradish peroxidase linked whole

antibody (from goat); 1:7000 em 0,1% de leite em pó em TBST). Por fim, as membranas foram lavadas 3 vezes em TBST. O sinal foi detectado usando um filme quimioluminescente (High performance chemiluminescence film, Amersham).

Análise densitométrica

A análise densitométrica das bandas foi realizada usando o software de imagem GeneTools v3.06 software (Syngene, Cambridge, UK). Os sinais foram normalizados pela α -Tubulina.

RESULTADOS PRELIMINARES

A análise histológica dos músculos tibial anterior (TA) mostrou uma redução da área de secção transversa das fibras musculares dos grupos MLC/SOD controle (MLC/SOD K) comparados ao controle wild type (WT K) observadas pelas colorações de hematoxilina e eosina (Fig. 1) e tricômio de Masson (Fig. 2). Após 2 dias de lesão pela cardiotoxina, podemos observar uma grande área de necrose (Fig. 1, 2 e 3) tanto nos grupos wild type quando nos transgênicos MLC/SOD. No 5^o dia pós-lesão em wild type (WT 5d) e MLC/SOD 5d observamos uma proliferação de tecido conjuntivo (Fig. 1 e 2) e algumas poucas fibras necróticas (Fig. 3). Contudo, no 10^o dia pós-lesão notamos um acúmulo de tecido conjuntivo nos músculos transgênicos com várias pequenas fibras musculares com núcleos centralizados, mas com um padrão arquitetônico ainda desorganizado se comparadas a wild type 10d (Fig. 1 e 2). Não foram observadas fibras necróticas em 10 dias para wild type e MLC/SOD (Fig. 3).

A análise protéica dos músculos quadríceps transgênicos lesados mostrou um atraso na expressão de fatores de ativação de células satélites como Pax7 (Fig. 4), desmina (Fig. 5) e myoD (Fig. 6) comparado aos músculos wild type lesados. Além disso, a miogenina, que é um importante fator de diferenciação de mioblastos também apresentou um retardo de expressão nos músculos transgênicos lesados comparado aos normais lesados (Fig. 7).

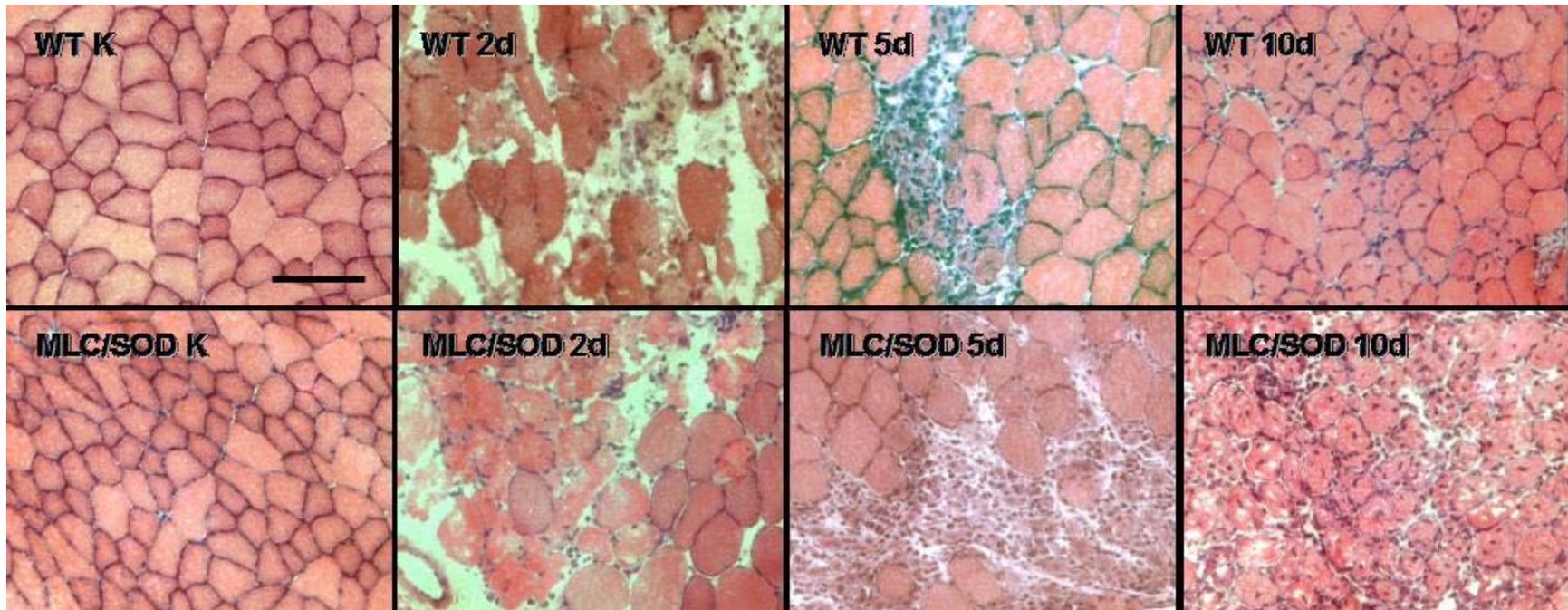


FIGURA 1: Cortes histológicos transversais de músculos tibial anterior (TA) de camundongos wild type (normais) e MLC/SOD corados com hematoxilina e eosina. Os músculos foram avaliados 2, 5 e 10 dias pós-lesão por cardiotoxina. Na porção superior da figura estão apresentados os animais wild type controle (K), 2 dias, 5 dias e 10 dias pós-lesão respectivamente. Abaixo a mesma ordem dos animais MLC/SOD. Note que as fibras musculares do grupo MLC/SOD K apresentam menor área de seção transversa se comparado ao wild type K. Não foram observadas diferenças significativas entre os animais wild type e MLC/SOD 2 e 5 dias após lesão. Note a presença de fibras com lesão de membrana 2 dias pós lesão e o aumento no infiltrado inflamatório no 5º dia. No 10º dia pós lesão os animais MLC/SOD mostraram um aumento significativo da proliferação de tecido conjuntivo comparado a wild type 10d.

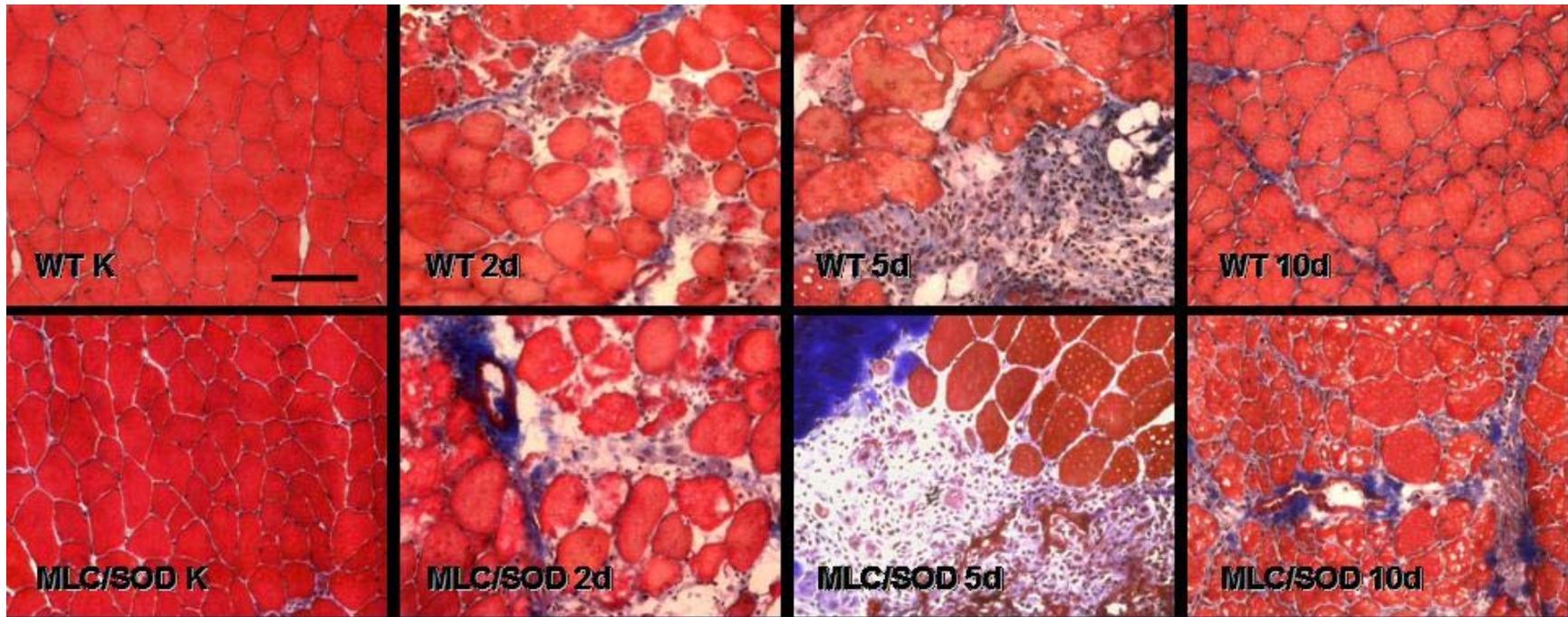


FIGURA 2: Cortes histológicos transversais de músculos tibial anterior (TA) de camundongos wild type (normais) e MLC/SOD corados com tricômio de Masson. Os músculos foram avaliados 2, 5 e 10 dias pós-lesão por cardiotoxina. Na porção superior da figura estão apresentados os animais wild type controle (K), 2 dias, 5 dias e 10 dias pós-lesão respectivamente. Abaixo a mesma ordem dos animais MLC/SOD. Observe um aumento da deposição de colágeno no 10º dia pós-lesão nos animais MLC/SOD comparado aos músculos wild type 10 dias.

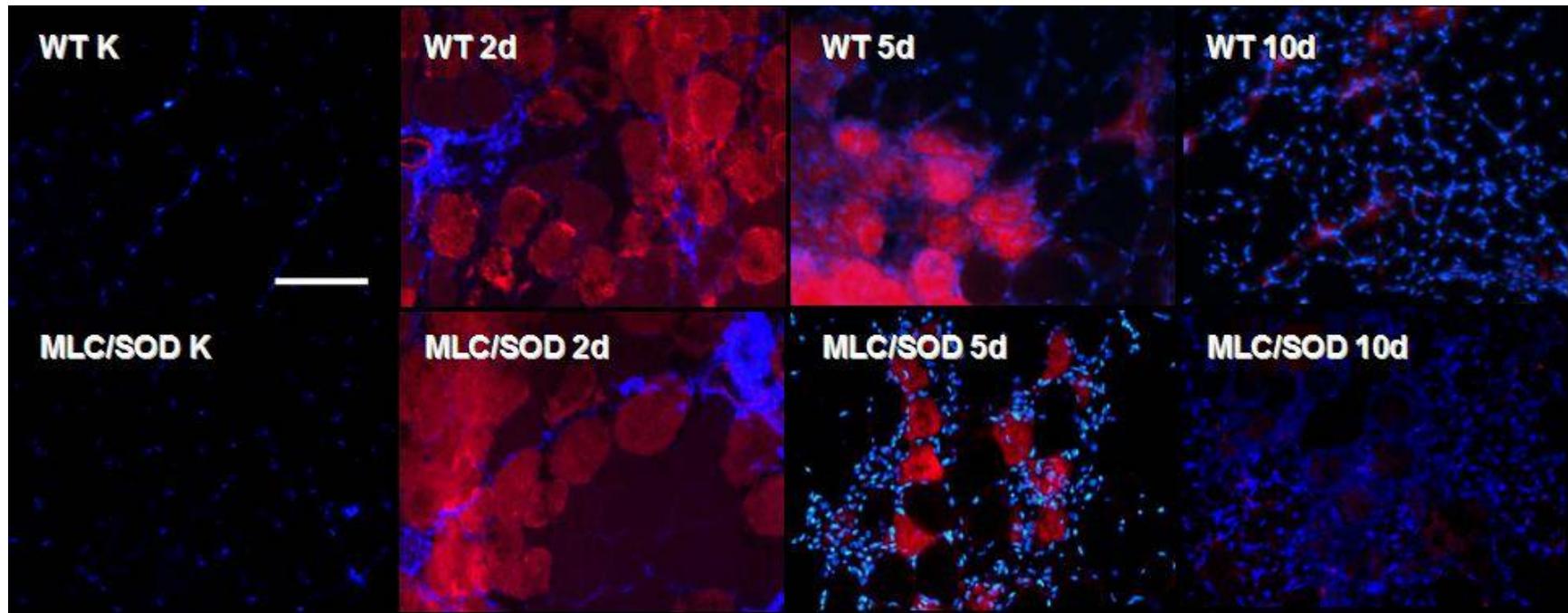


FIGURA 3: Cortes histológicos transversais de músculos tibial anterior (TA) de camundongos wild type (normais) e MLC/SOD submetidos ao azul de Evans (marcação de fibras necróticas) e hoechst (marcação de núcleos). Os músculos foram avaliados 2, 5 e 10 dias pós-lesão por cardiotoxina. Na porção superior da figura estão apresentados os animais wild type controle (K), 2 dias, 5 dias e 10 dias pós-lesão respectivamente. Abaixo a mesma ordem dos animais MLC/SOD. Não foram observadas diferenças significativas no número e padrão das fibras necróticas pós-lesão entre os grupos.

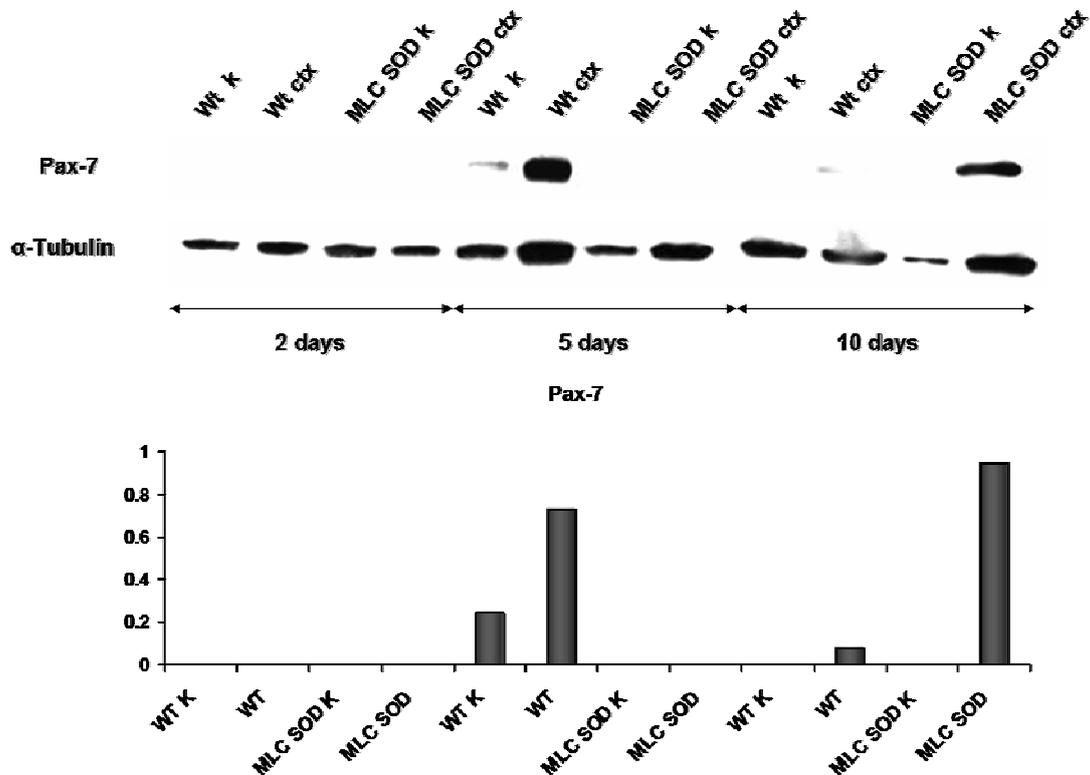


FIGURA 4: Níveis de proteína de Pax7 em músculos quadríceps (TH) avaliados por Western blot e quantificados por densitometria de camundongos selvagens/wild type (normal) e MLC/SOD (transgênicos). Os músculos TH direitos (lesados) e esquerdos (controle contra-lateral) dos grupos wild type e MLC/SOD foram avaliados 2, 5 e 10 dias pós-lesão. Na porção superior da figura está apresentado o blot e na parte inferior a representação gráfica da avaliação densitométrica. Observe um atraso na expressão de Pax7 no grupo MLC/SOD comparado ao wild type.

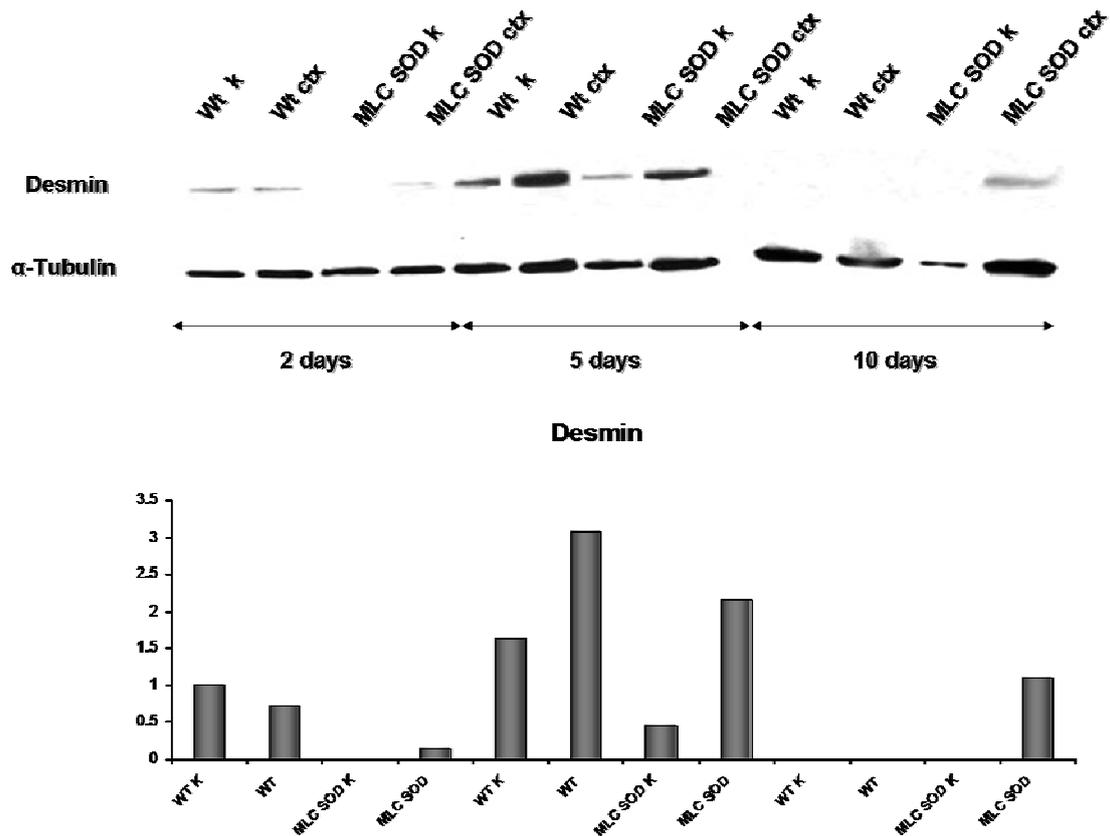


FIGURA 5: Níveis de proteína de desmina em músculos quadríceps (TH) avaliados por Western blot e quantificados por densitometria de camundongos selvagens/wild type (normal) e MLC/SOD (transgênicos). Os músculos TH direitos (lesados) e esquerdos (controle contra-lateral) dos grupos wild type e MLC/SOD foram avaliados 2, 5 e 10 dias pós-lesão. Na porção superior da figura está apresentado o blot e na parte inferior a representação gráfica da avaliação densitométrica. Observe um atraso na expressão de desmina no grupo MLC/SOD comparado ao wild type.

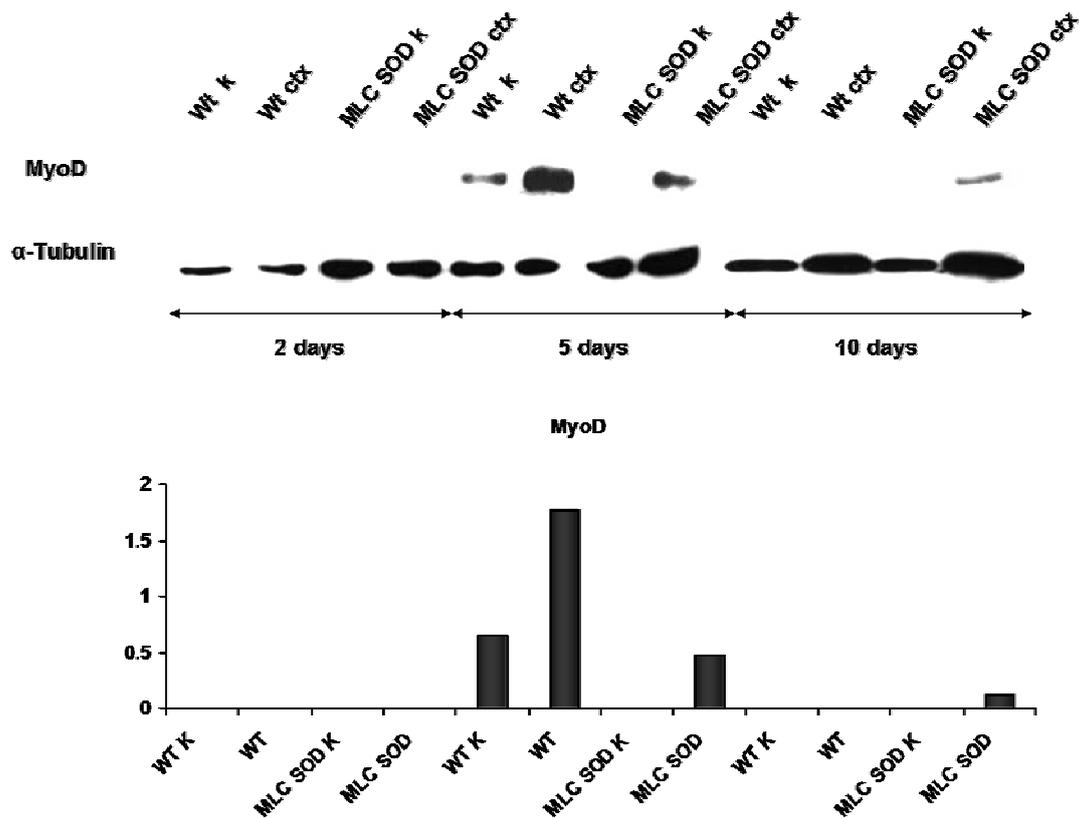


FIGURA 6: Níveis de proteína de myoD em músculos quadríceps (TH) avaliados por Western blot e quantificados por densitometria de camundongos selvagens/wild type (normal) e MLC/SOD (transgênicos). Os músculos TH direitos (lesados) e esquerdos (controle contra-lateral) dos grupos wild type e MLC/SOD foram avaliados 2, 5 e 10 dias pós-lesão. Na porção superior da figura está apresentado o blot e na parte inferior a representação gráfica da avaliação densitométrica. Observe um atraso na expressão de myoD no grupo MLC/SOD comparado ao wild type.

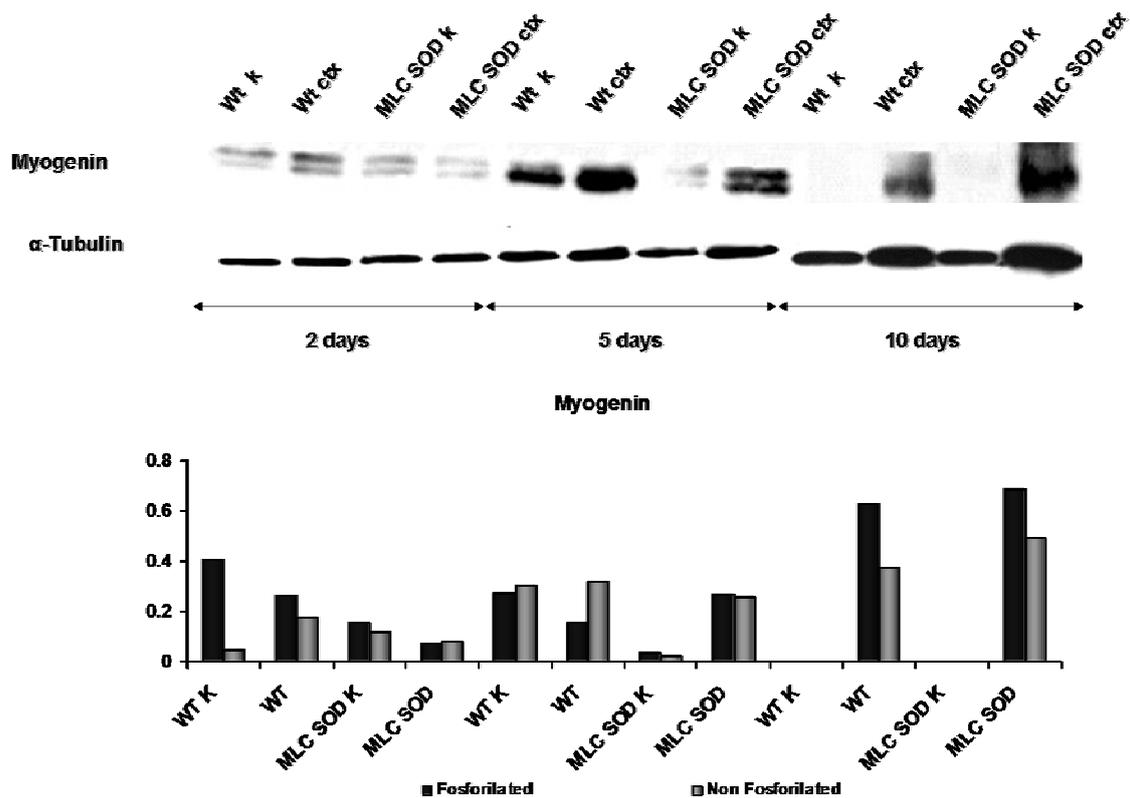


FIGURA 7: Níveis de proteína de miogenina em músculos quadríceps (TH) avaliados por Western blot e quantificados por densitometria de camundongos selvagens/wild type (normal) e MLC/SOD (transgênicos). Os músculos TH direitos (lesados) e esquerdos (controle contra-lateral) dos grupos wild type e MLC/SOD foram avaliados 2, 5 e 10 dias pós-lesão. Na porção superior da figura está apresentado o blot e na parte inferior a representação gráfica da avaliação densitométrica. Observe um atraso na expressão de miogenina no grupo MLC/SOD comparado ao wild type.

10. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste estudo em que realizamos em colaboração com o Prof. Antonio Musarò observamos que marcadores moleculares envolvidos com a ativação de células satélites (Pax7, desmina e myoD) e na diferenciação dos mioblastos (como a miogenina) apresentavam um atraso na sua expressão nos músculos transgênicos MLC/SOD1 comparados ao processo normal de reparo. Além disso, análises histológicas mostraram um aumento de tecido conjuntivo no 10 dias pós-lesão por cardiotoxina comparado a animais normais também com lesão.

Os resultados deste estudo abrem novas perspectivas para o entendimento e a caracterização deste processo de reparo além de propor generalizações para outras situações em que ocorre o aumento do estresse oxidativo no músculo como no envelhecimento (Conboy et al., 2003). Avançar sobre o conhecimento deste processo adaptativo muscular permitirá traçar estratégias terapêuticas para tornar a regeneração muscular mais eficiente ou mesmo acelerá-la em situações em que o estresse oxidativo está aumentado no músculo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abe K, Aoki M, Ikeda M, Watanabe M et al. Clinical characteristics of familial amyotrophic lateral sclerosis with Cu/Zn superoxide dismutase gene mutations. *J Neurol Sci.* 1996;136:108-116.

Brujin LI, Miller TM, Cleveland DW. Unraveling the mechanisms involved in motor neuron degeneration in ALS. *Annu Rev Neurosci.* 2004;27:723-749.

Clement AM, Nguyen MD, Roberts EA, Garcia ML et al. Wild-type nonneuronal cells extend survival of SOD1 mutant motor neurons in ALS mice. *Science.* 2003;113-117.

Conboy IM, Conboy MJ, Smythe GM, Rando TA. Notch-mediated restoration of regenerative potential to aged muscle. *Science.* 2003;302:1575-1577.

Dobrowolny G, Giacinti C, Pelosi L, Nicoletti C, Winn N, Barberi L, Molinaro M, Rosenthal N, Musarò A. Muscle expression of a local Igf-1 isoform protects motor neurons in an ALS mouse model. *JCB.* 2005;168(2):193-199.

Kaspar BK, Lladò J, Sherkat N, Rothstein JD, Gage FH. Retrograde viral delivery of IGF-1 prolongs survival in a mouse ALS model. *Science.* 2003;301:839-842.

Lieber R. *Skeletal muscle structural, function, & plasticity*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2002, 2nd edition.

Lino MM, Schneider C, Caroni P. Accumulation of SOD1 mutants in postnatal motoneurons does not Cause motoneuron pathology or motoneuron disease. *J Neurosci.* 2002;22(12):4825-4832.

Musarò A, Dobrowolny G, Rosenthal N. The neuroprotective effects of a locally acting IGF-1 isoform. *Exper Gerontol.* 2007;47:76-80.

Pelosi L, Giacinti C, Nardis C, Borsellino G et al. Local expression of IGF-1 accelerates muscle regeneration by rapidly modulating inflammatory cytokines and chemokines.

FASEB. 2007;21:1393-1402.