

Avaliação da Expressão Gênica e Proteica do Músculo Esquelético de Pacientes com Lesão Medular Submetidos a Treino de Estimulação Elétrica Neuromuscular

Palavras-Chave: Doenças de Medula espinal, Estimulação elétrica, Músculo esquelético.

Autores(as):

Luís Gustavo Inácio de Jesus, IB – UNICAMP.

Milena Gomes Santos, IB – UNICAMP.

Coautores:

Bruno Calsa, FCM – UNICAMP.

Ize Penhas de Lima, FCM – UNICAMP.

Prof. Dr. Jean Marcos de Souza (orientador), FCM – UNICAMP.

INTRODUÇÃO:

Segundo o Ministério da Saúde (2015), a lesão da medula espinal (LM) pode ser definida como todo dano que ocorre nas estruturas que formam o canal medular, dentre eles: medula, cone medular e cauda equina. Sendo assim, é um dos acometimentos mais graves que pode afetar um ser humano, visto que tem grande repercussão física, social e psíquica, que envolve paralisia ou paresia dos membros, alteração dos reflexos, alteração ou perda de sensibilidades, controle de temperatura corporal, entre outros. A LM acarreta em diversas consequências negativas que impactam na qualidade de vida do indivíduo, como: neuropatia, dor crônica, bexiga neurogênica, osteoporose e espasticidade que envolve um aumento do tônus muscular (hipertonía).

Dessa forma, para melhorar a qualidade de vida do indivíduo com lesão medular pode-se realizar a reabilitação com estimulação elétrica neuromuscular (EENM). Para Paolillo (2006), essa técnica consiste na ativação artificial dos músculos esqueléticos, por meio de impulsos elétricos, que proporciona a restauração do movimento, reduz a espasticidade e a rigidez, além do aumento de força e volume do músculo. Isso tudo é possível devido à neuroplasticidade, ou seja, a capacidade do sistema nervoso de mudar, adaptar-se e moldar-se a nível estrutural e funcional, de maneira que a eletroestimulação contribui para o ganho de movimentos, neuroplasticidade, melhor circulação sanguínea, prevenção/redução da osteoporose e prevenção de infecção no trato urinário

O objetivo deste estudo é entender o funcionamento da expressão gênica, proteica e a análise histológica dos músculos de pacientes que apresentam lesão medular e são submetidos ao treino de estimulação elétrica neuromuscular.

METODOLOGIA:

Trata-se de um ensaio clínico não controlado (quase experimental) com pacientes com lesão medular estabelecida e estável. O grupo de participantes voluntários será submetido à biópsia muscular antes da realização da intervenção e após 6 meses de treinamento. O protocolo de intervenção consistirá em

sessões semanais de treino de estimulação elétrica neuromuscular funcional de grupamentos musculares dos membros, descrito em detalhes adiante.

A biópsia muscular será fixada através de técnica de congelação. Serão analisadas propriedades histológicas dos miócitos e tecido muscular, expressão gênica de proteínas relacionadas à sarcopenia e sua expressão proteica correspondente. Os dados serão analisados estatisticamente de maneira pareada, buscando diferenças entre o período antes e depois da intervenção.

Procedimentos

As biópsias foram realizadas antes do início do protocolo de treinamento e logo após completados 6 meses de treinamento. Elas foram realizadas no Laboratório de Biomecânica e Reabilitação do Aparelho Locomotor do Hospital das Clínicas da Universidade Estadual de Campinas. Os voluntários foram submetidos à biópsia muscular por agulha de sucção do músculo vasto lateral da coxa. Esse procedimento permitirá obter uma amostra de aproximadamente 80 mg de músculo.

Análise histológica do músculo esquelético

Cerca de 20 mg de amostra de músculo esquelético foram cuidadosamente dissecadas, livre de sangue e tecido gorduroso visível, rapidamente congeladas em N-hexano resfriado em nitrogênio líquido à -176°C, permitindo fixação e armazenamento da amostra no biorrepositório do Laboratório de Investigação Clínica de Resistência À Insulina (LICRI), sob os cuidados do professor Jean Marcos de Souza. A captura de imagens foi realizada em computador acoplado a um microscópio e conectado a um sistema fotográfico (magnificação de 40x e 200x). A análise quantitativa da área de secção transversa e da proporção dos diferentes tipos de fibras musculares e área coberta por lipídios nas fibras musculares se realizou por meio do programa ImageJ. Os resultados estão expressos em μm .

Avaliação da expressão gênica

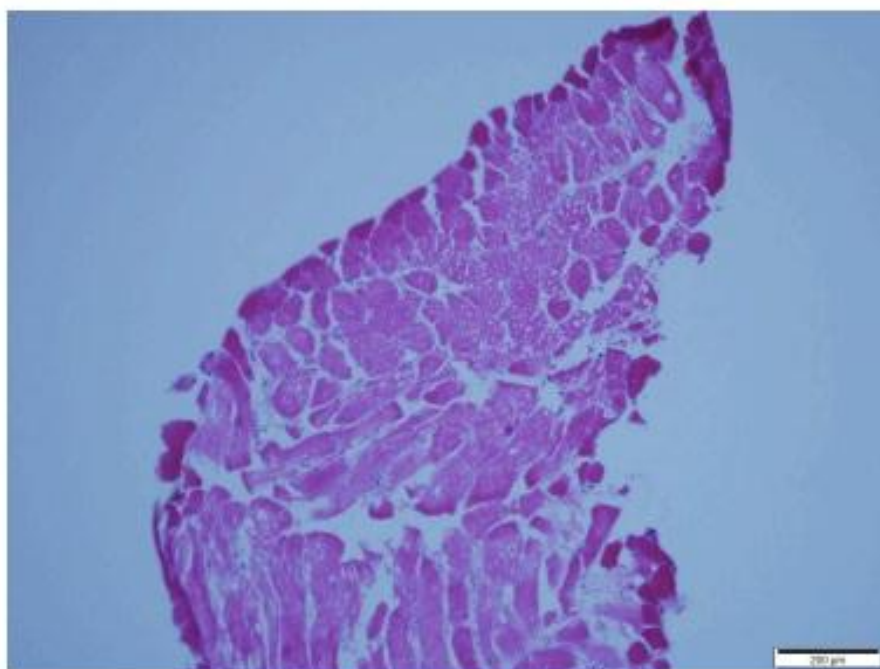
O RNA total foi isolado do músculo usando o reagente TriPure (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA), de acordo com as instruções do fabricante. A quantidade de 1 μg de RNA passou por transcrição reversa através de um kit de cDNA de alta capacidade (Applied Biosystems, San Francisco, CA, USA) e a expressão do RNA será quantificada por rtPCR usando o sistema de detecção StepOnePlus™ e o software StepOne™ v2.2 (Applied Biosystems, San Francisco, CA, USA). Os primers e probes de TaqMan® serão usados para aferir miostatina, MuRF-1 e miogenina. A desidrogenase de gliceraldeído-3-fosfato será usada como controle endógeno.

Expressão proteica

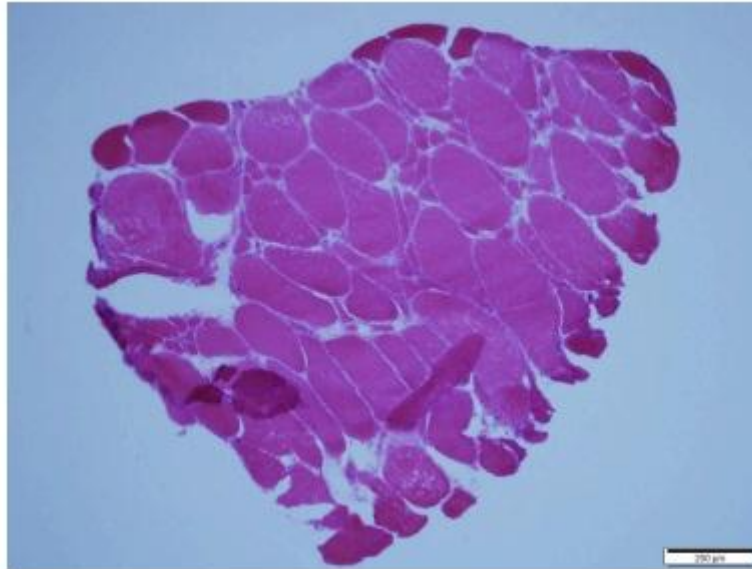
Para a extração de proteína total, 50 mg de tecido pulverizado será homogeneizado com um tampão contendo 15 mM de HEPES, glicerol 10%, NP-40 0.5%, 250 mM de NaCl, 1 mM de EDTA, 1 mM de fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF) e um coquetel de inibidor de fosfatase e protease (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo, USA). Os extratos serão incubados por 15 minutos em gelo e centrifugados a 12000 RPM/4°C. Sobrenadantes serão coletados e a concentração será estimada por ensaio proteico Pierce BCA. A análise de proteínas específicas (miostatina, Pax7, miogenina e atrogin-1) será obtida por Western Blot.

	Identification	Age	LOI	Severity	TRT	Compliance	TWR	Comorbidities	Biopsy
	#1	59	C4	C	6	90%	8	colorectal cancer (cured)	Normal
	#2	37	C6	B	> 60	90%	50	None, para-athlete	Normal
	#3	48	T10	C	12	30%	8	Smoker, depression	Neuropathic pattern
	#4	41	T6	A	> 60	80%	12	None	Normal
	#5	48	C6	C	12	90%	> 60	Smoker	Myopathic pattern
	#6	53	C5	A	>60	90%	12	None	Normal

1 Tabela: LOI: Nível de lesão; TRT: Tempo total de reabilitação (meses); TWR: Tempo total sem reabilitação (meses).



2 Histologia muscular: Paciente com músculo normal.



3 Histologia muscular: Paciente com neuropatia e miopatia muscular leve.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Os dados intervalares serão apresentados como média \pm desvio padrão ou mediana e intervalo interquartil, de acordo com a normalidade dos dados. A normalidade, por sua vez, será verificada pelo teste de Shapiro-Wilk. As variáveis intervalares normalmente distribuídas serão avaliadas pelo teste t de Student e as com distribuição não normal pelo teste de Mann-Whitney.

Caso o pareamento seja possível, as análises serão feitas por teste t de Student pareado e teste de Wilcoxon. Variáveis categóricas, por sua vez, serão analisadas de pelo teste do chi quadrado ou teste exato de Fisher.

Correlações entre os dados de expressão gênica e proteica serão analisados pelas correlações de Pearson e Spearman, a depender da normalidade das amostras. Valores de $P \leq 0,05$ serão considerados estatisticamente significantes. Objetiva-se utilizar para a análise o software SPSS – versão 25 (IBM, Chicago, IL, USA).

CONCLUSÕES:

Diante disso, reabilitação com estimulação elétrica neuromuscular (EENM) pode ajudar na restauração do movimento, redução da espasticidade e aumento da força muscular. Isso é esperado pois graças à capacidade do sistema nervoso de mudar e se adaptar, a chamada neuroplasticidade, que é estimulada pela eletroestimulação.

BIBLIOGRAFIA

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Ações Programáticas Estratégicas. Diretrizes de Atenção à Pessoa com Lesão Medular / Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Ações Programáticas Estratégicas e Departamento de Atenção Especializada. – 2. ed – Brasília: Ministério da Saúde, 2015. 68 p.

VAROTO, Renato; CLIQUET JR, Alberto. Experiencing functional electrical stimulation roots on education, and clinical developments in paraplegia and tetraplegia with technological innovation. *Artificial Organs*, v. 39, n. 10, p. E187-E201, 2015.

PAOLILLO, Alessandra Rossi; PAOLILLO, Fernanda Rossi; CLIQUET JR, Alberto. Reabilitação sensório-motora de tetraplégicos através de estimulação elétrica neuromuscular. *Revista de Terapia Ocupacional da Universidade de São Paulo*, v. 17, n. 2, p. 72-78, 2006.

CASTILLERO, Estíbaliz et al. IGF-I system, atrogenes and myogenic regulatory factors in arthritis induced muscle wasting. *Molecular and cellular endocrinology*, v. 309, n. 1-2, p. 8-16, 2009.